



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

Facultad De Ciencias Químicas

**Tesis Profesional Para Obtener el Título de Licenciado en
Químico Farmacobiólogo.**

**Efecto de *Coriandrum sativum* en la expresión de IRS-2,
Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ de tejido adiposo; en un
modelo inducido de hiperglicemia en ratas Long Evans.**

Que Presenta

pQ.F.B. Calva Cruz Oscar De Jesús

Director de tesis

c.D.C. Samuel Treviño Mora

Asesor Metodológico

D.C. Maura Cárdenas García.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles, ocupan el primer lugar en mortalidad a nivel mundial. Aunque los datos no son precisos; la federación internacional de diabetes indica que aproximadamente el 8.2 % de las muertes mundiales en 2011 fueron por complicaciones de enfermedades como la diabetes específicamente. A su vez, la OMS predice, que para 2030 la diabetes se convertirá en la séptima causa de muerte a nivel mundial. Dichos índices obligan a que los enfoques de terapéutica, farmacológica y asociada a distintos parámetros, cambie permanentemente. Ésta disciplina de la ciencia ha sentado bases específicas para los tratamientos de alteraciones asociadas a obesidad, síndrome metabólico, diabetes, por mencionar las más conocidas, teniendo grupos de fármacos que promueven la regulación específica de cada uno de ellos. Sin embargo, esto no evita los efectos colaterales de los fármacos, situación generada en su mayoría por la falta de estudios a distintos niveles sistémicos en los sujetos a los cuales se les administra. De tal modo que la importancia resultante de este hecho, es la necesidad de nuevas terapias y un conocimiento más preciso sobre sus efectos y mecanismo de acción sean obligatorios. En este proyecto, se obtuvo de un modelo animal experimental, cuyas característica metabólica constante es un cuadro hiperglicémico, desarrollado a partir del incremento de lípidos en su dieta y por ende del aporte calórico. Una vez obtenido el modelo, las ratas fueron sometidas a la combinación de la dieta hipercalóricas de origen lipídico con aporte glúcido, a distintos tiempos, para conocer los efectos proporcionados por la ingesta de semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*), mismo que se emplea a nivel de etnofarmacología tradicional mexicana como hipoglucemiante. El efecto de la ingesta fue evaluado a 3 niveles: el primero perfil sérico y zoométrico (glucosa, triglicéridos, colesterol total, fracción c-HDL, talla, peso y perímetro abdominal), el segundo a nivel histológico del tejido adiposo (Morfología y expresión de proteína GLUT-4) y a un tercer nivel de expresión genética de los mediadores de respuesta metabólica de el tejido adiposo blanco (IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, las desregulaciones metabólicas provocadas por dietas hipercalóricas representan una de las causas principales en las alteraciones fisiometabólicas tales como SM, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular y DM. De hecho la federación internacional de diabetes informa que hasta el 2013 existen 387 millones de personas con DM2 y esta es considerada una pandemia. En la población mexicana son un grave problema de salud con más de 10 millones de pacientes diagnosticados, aunque la OMS presume que al menos el doble permanece sin diagnóstico.

El estudio de dichas patologías se ha enfocado a los signos y síntomas, dándole importancia a los condicionamientos metabólicos, dentro de los cuales el tejido adipocitario es uno de los de mayor relevancia, sin embargo, las vías de señalización involucradas no están del todo esclarecidas y por lo tanto se complica el tratamiento farmacológico y/o alternativo, pues se encuentra totalmente dirigido además de ser más complicado para el control de la patología.

Pregunta central

¿La ingesta de semilla de cilantro ejerce cambios en los niveles de mRNA de (IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ) y la proteína GLUT-4 cuando existe una desregulación metabólica?

JUSTIFICACIÓN

El dilucidar la alteración de rutas metabólicas por un alto consumo calórico dentro de las dietas, así como, las proteínas involucradas en las vías de señalización es imprescindible para desarrollar tratamientos para el control de la patología. Del mismo modo, el encontrar tratamientos alternativos que tengan un impacto positivo es preponderante; los polifenoles y aceites esenciales han mostrado un efecto benéfico en el control y tratamiento de enfermedades metabólicas, así como de DM2.

La semilla de cilandro contiene cantidades considerables de los metabolitos anteriormente mencionados por lo que se vislumbra como un potencial tratamiento ortomolecular contra las complicaciones metabólicas.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar el comportamiento de la expresión de IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ en tejido adiposo de ratas de la cepa Long-Evans con desregulación metabólica, tras la exposición a dietas en distintas condiciones, como se explicara más adelante.

Objetivos Particulares:

- Evaluar el estado zoométrico y metabólico de lípidos y glúcidos de relevancia, en los distintos grupos de trabajo, sometidos a distintas dietas.
- Cuantificar el contenido de triglicéridos en tejido adiposo, en los distintos grupos de trabajo con su respectiva dieta.
- Analizar los cambios en los RNAm de IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ en los distintos grupos de trabajo, sometidos a distintas dietas.
- Evaluar el comportamiento de los transportadores de GLUT-4 en tejido adiposo en los distintos grupos de trabajo, sometidos a distintas dietas.

HIPÓTESIS

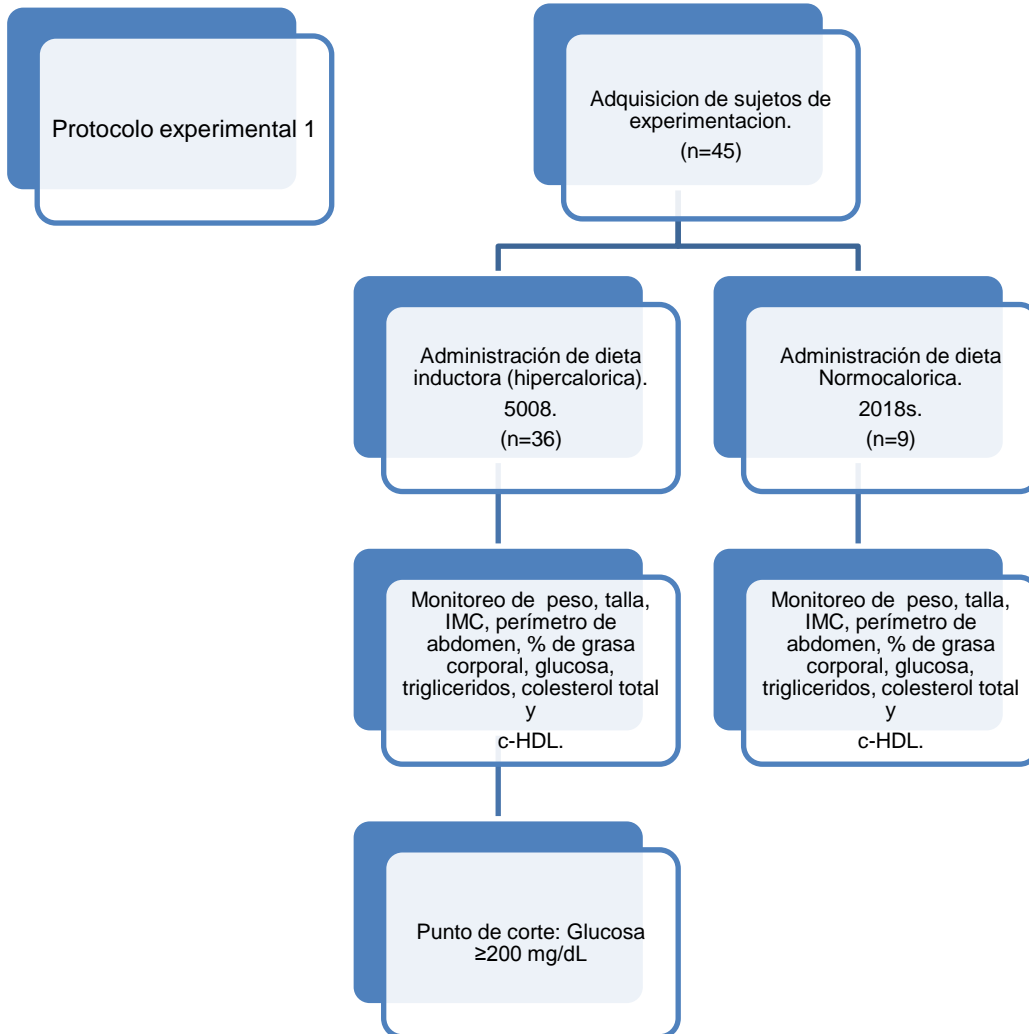
Hipótesis nula

La ingestión de semilla de cilantro molida en la dieta no produce cambios en la expresión de IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ sobre tejido adiposo en ratas de la cepa Long-evans con desregulación metabólica.

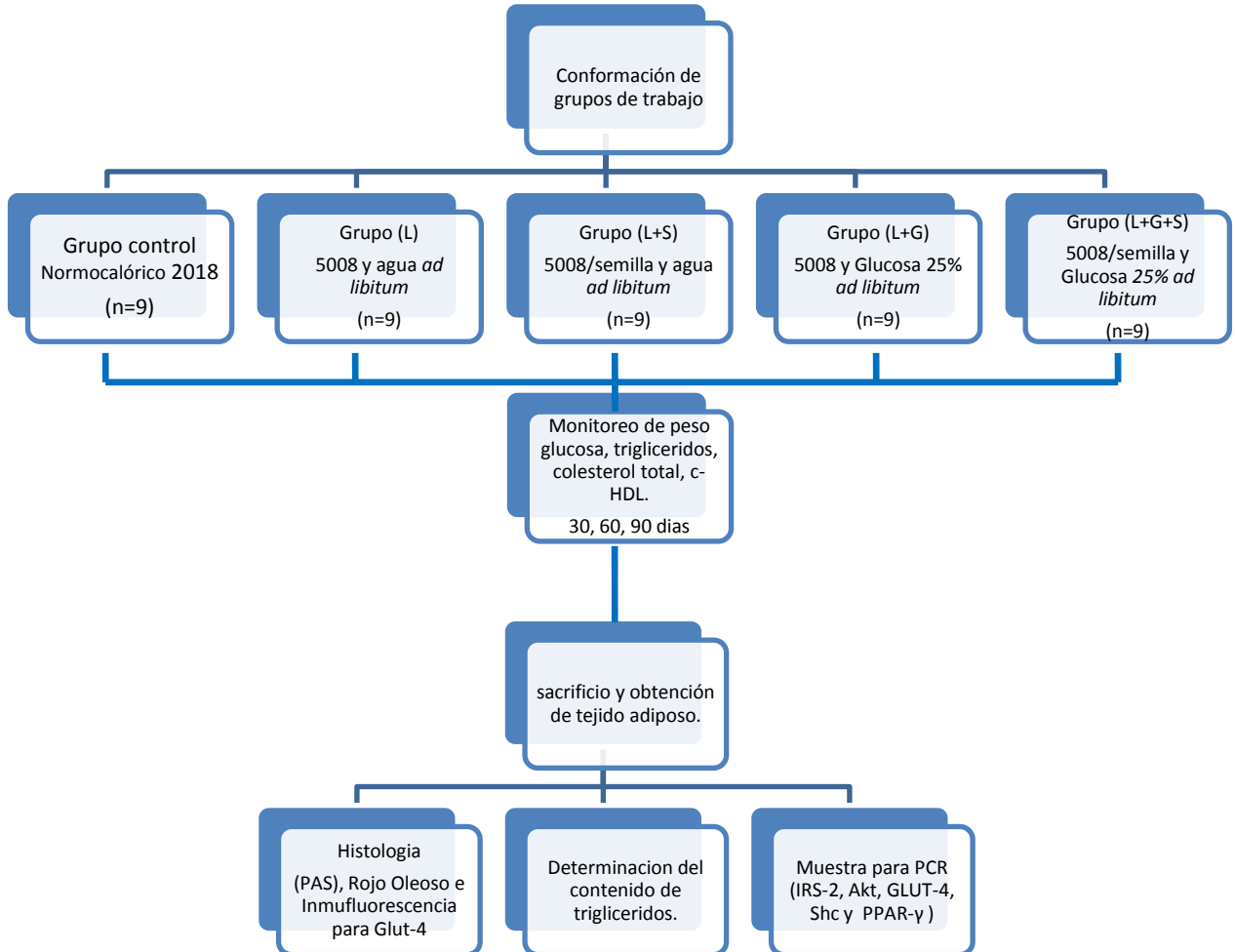
Hipótesis alternativa

La ingestión de semilla de cilantro molida en la dieta produce cambios en la expresión de IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ sobre tejido adiposo en ratas de la cepa Long-evans con desregulación metabólica

DIAGRAMA DE TRABAJO



Protocolo experimental 2



MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de experimentación, inducción del modelo y caracterización.

Se obtuvieron y emplearon ratas macho de la cepa Long-Evans provenientes del bioterio Claude Bernard de la BUAP. Los animales se mantuvieron dentro del mismo en condiciones de temperatura de $24^{\circ} \pm 2^{\circ}$ y un porcentaje de humedad de 50%. Con ciclos de obscuridad 12/12 horas. La dieta inicial de los animales consistió en alimento normocalórico Harlan 2018 hasta alcanzar los 130 g de peso aproximadamente. Posterior a este tiempo, se realizó la separación del grupo control normocalórica (9 sujetos) y los restantes para inducir el estado hiperglicémico mediante una dieta hipercalórica de origen lipídico (5008 LabDiet), cuya exposición se efectuó durante 60 días.

Posterior a este lapso de tiempo, se mantuvo la dieta normocalórica el grupo control 2018 denominado **C** y la dieta 5008 en los grupos expuestos a la dieta hipercalórica, se subdividió en 4 grupos de 9 individuos cada uno: el primero de ellos fue el grupo de trabajo denominado **L** que continuó expuesto a la dieta hipercalórica hiperlipídica. El grupo 2: **L + S**, basó su alimentación en la ingesta del alimento 5008 mezclado con semilla de cilantro en polvo y reconstituido. El tercer grupo **L + G**, ingirió alimento 5008 LabDiet y como bebida, agua glucosada al 25% *ad libitum*. Por último, el cuarto grupo: **L + G + S**, cuya alimentación se basó en la ingesta de alimento 5008 mezclado con la semilla de cilantro en polvo más agua glucosada al 25% *ad libitum*. De esta forma, (**C**) fungió como control negativo, y a los grupos (**L**) y (**L+G**) como controles positivos sin tratamiento, para los grupos (**L+S**) y (**L+G+S**) respectivamente, con tratamiento basado en el consumo de semilla de cilantro. Este acondicionamiento persistió durante 90 días (con cohortes cada 30 días), tiempo durante el cual se realizó la medición de peso, perímetro de abdomen, talla (medición de la punta de la nariz a la punta de la cola) como medidas zoométricas.

Determinación de parámetros séricos

Para la obtención de las muestras sanguíneas correspondientes, se suspendió la alimentación de los animales, así como su consumo de agua entre 4 y 5 horas previas a la toma del espécimen. Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilazina en concentración de 0.2 mL/100 g vía intraperitoneal. Una vez que se produce el efecto de sedación, se obtienen las muestras mediante punción cardiaca, extrayendo entre 600 y 800 μ L de sangre, colocándola en tubos sin anticoagulante para su posterior centrifugación y separación del suero. Cada uno de los tubos eppendorf se centrifugó a 9000 r.p.m. durante 10 minutos, congelando las muestras hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes. A cada muestra obtenida se determinó glucosa, colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL; mediante las reacciones de kits comerciales en un espectrofotómetro semiautomatizado BTS-350 de Bio Systems.

Determinaciones tisulares

Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron después de realizar la punción cardiaca a los animales. Se procedió a realizar el sacrificio de los animales y se realizó la perfusión de los tejidos utilizando SSI fría. Rápidamente se obtuvieron 4 muestras de tejido adiposo de aproximadamente 300 μ g. La primera de ellas se colocó en formalina bufferada al 10% (para obtención de cortes histológicos a teñir usando la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) e inmunofluorescencia para Glut-4), la segunda se colocó en un tubo eppendorf (para corte en criotomo y tinción de Rojo oleoso) y la tercera se llevó a inmersión en nitrógeno líquido, para colocarla en tubos eppendorff previamente esterilizados (utilización de muestra para amplificación aislamiento de RNA total). La última muestra se utilizó para realizar de determinación de triglicéridos en tejido, efectuada solamente en el punto de cohorte de 90 días, para los cinco grupos de trabajo. La determinación de triglicéridos en tejido se realizó con 100 mg de tejido adiposo homogenado en 900 μ L de SSI. Posteriormente se realizó una dilucion1:2 para proseguir con el protocolo descrito del fabricante para determinación de triglicéridos.

Histología del tejido adiposo

Después de realizar el protocolo de deshidratación y párafinado los tejidos correspondientes, se realizaron cohortes en el micrótopo correspondientes a 7 micras que fueron colocados en laminillas con aplicación de poli-lisina. Para realizar la tinción de PAS, se siguió una modificación a la técnica de PAS del *manual de las fuerzas armadas norteamericanas*; al igual que la técnica de tinción de rojo oleoso, la cual tuvo como finalidad evidenciar los lípidos contenidos en cada de célula, así como apreciación de morfología y tamaño, la técnica se desarrolló como se describe a fondo en los anexos. Se procedió a tomar foto micrografías de las muestras procesadas mediante tinción de PAS, a 10x (delimitado un área de 1250 x 750 μ) para realizar el conteo de células y a 40x para realizar la medición del perímetro celular. El conteo celular se realizó mediante el programa ImageJ y la medición del perímetro celular con el software Motoc 2.0.

Inmunohistoquímica del tejido adiposo

Después de realizar el protocolo de deshidratación y párafinado los tejidos correspondientes, se realizaron cohortes en el micrótopo correspondientes a 7 micras que fueron colocados en laminillas con aplicación de poli-lisina. Se siguió con el protocolo sugerido y estandarizado para inmunofluorescencia (ver anexo correspondiente) y las microfotografías fueron tomadas con un microscopio LED Leica SFL-7000. Para el análisis densitométrico de las microfotografías en la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo dirigido a GLUT-4, se tomaron imágenes a 40x y el análisis se realizó mediante el programa ImageJ.

Determinación de los cambios de expresión en mRNA

La obtención de tejido adiposo se realizó de inmediato y se procedió a su almacén en nitrógeno líquido y a -70°C hasta el momento de los análisis. Se pesaron 200 mg de tejido adiposo por cada muestra trabajada.

Se realizó el homogenado en frío con reactivo de TRIzol (Life Technologies) y se prosiguió con la técnica descrita por el fabricante.

Se efectuó la medición de concentración total material genético obtenida por su la relación de absorbancia a 260/280 nm. Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.8% durante 60 minutos y 70 volts, para verificar la integridad del RNA. Luego de este paso se procede a realizar la digestión de DNA en la muestra utilizando RNA total, 10x DNasa I Reaction Buffer, DNasa I AmpGrade 1 ^u/μL y Agua libre de nucleasas para cada una de las muestras, según el protocolo establecido por el fabricante (life technologies). Posterior a la digestión, se realiza la RT-PCR y su acoplamiento a PCR con los componentes Random Hexamer Primer 5x, Reaction Buffer, RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20u/μl), 10mM dNTP Mix, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/μl), según el protocolo del kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

Las distintas secuencias de codificantes para los genes a analizar fueron obtenidas del NCBI ([National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Los “primers” se diseñaron con ayuda del programa *PerlPrimer* y fueron solicitados en Invitrogen para su resuspensión y uso posterior, utilizando a la proteína ribosomal 29 (Rsp29) como gen expresión constitutivo. Los protocolos de reacción de PCR (concentración, ciclos y temperatura de alineamiento) dependen de cada uno de los genes para analizar. Los productos de IRS-2, Akt, GLUT-4 y Shc fueron corridos en gel de agarosa al 1.5% durante 80 minutos a 65 volts. El producto de PPARγ y Rps29 se corrió en un gel a 3% durante el mismo tiempo a 70 volts. Posteriormente se tomaron las fotografías y se realizó un análisis densitométrico de las bandas resultantes, con el programa ImageJ y todos los genes se normalizaron con el producto de Rsp29, para su posterior análisis estadístico.

Análisis Estadísticos

Los resultados son expresados como la media poblacional ± el error estándar de la media (EEM) y fueron evaluados e interpretados a través de una prueba estadística t de student a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

MARCO TEORICO

APORTE CALORICO DE LA DIETA

Todos los sistemas biológicos, requieren de la ingesta de diversos nutrientes, para satisfacer los requerimientos energéticos mínimos y mantener la homeostasis, para que de esta forma realicen las funciones básicas para cualquier organismo vivo. El aporte energético está dado por un conjunto de macromoléculas bien definidas y ampliamente estudiadas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (así como vitaminas, minerales y agua indispensables para el catabolismo de las mismas); dichas macromoléculas provienen de los distintos tipos de alimentos que el organismo es capaz de metabolizar y asimilar. Cada macromolécula provee una cantidad específica de energía. Para el hombre, la ingesta de estas macromoléculas es variable, ya que depende de los alimentos que ingiera, por el tipo, origen, procesos de refinamiento, aditivos, entre otros, promoviéndose así, un desbalance en los niveles que se consideran “ideales”, desencadenando alteraciones metabólicas que aparecen cuando van acompañados de distintos factores ambientales y aunado a factores ambientales y genéticos que pueden alterar aun más el balance sistémico (NAM, National Academie Of Science, 2005; Rosenheck, 2008; Bray & Popkin, 1998; Lazar, 2005; Permutt *et al.*, 2005).

Existe una amplia gama de alteraciones con origen en desequilibrios calóricos. Dentro de las cuales podemos identificar a la baja sensibilidad y resistencia a la insulina, síndrome metabólico (SM), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) entre otros; siendo el SM, la antesala de diferentes complicaciones progresivas e irreversibles que condiciona irremediablemente el desarrollo de DM2, es por tal razón que se convierte en un punto de estudio para muchas organizaciones encargadas de tal efecto. El SM, como enfermedad, está definido por diversas organizaciones de salud en todo el mundo, siendo las más importantes la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la Federación Internacional de Diabetes (FID), el Instituto Nacional de Salud (INH) en su guía ATPIII, y por último, la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuyas definiciones coinciden en designarlo como una entidad

multifactorial que se caracteriza por factores como dislipidemia, disglucemias en diferentes grados, caída en la sensibilidad a la insulina, resistencia a la insulina, incremento de la presión arterial, sobrepeso y obesidad entre otros (FID, Federación Internacional de Diabetes, 2006; Barroso, 2003; Chakravarthy & Booth, 2004; Kassi *et al.*, 2011; Booth *et al.*, 2000).

	Circunferencia abdominal (cm)	Triglicéridos (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	Tensión arterial (mmHg)	Glucosa en ayunas (mg/dL)
(1) NCEP:ATPIII	≥102 cm ♂, ≥88cm ♀.	≥150	<40 en ♂ y <50 en ♀.	≥ 130/85	≥ 100
(2) AHA/NHLBI	≥94 cm ♂, ≥80cm ♀.	≥150	<40 en ♂ y <50 en ♀.	≥ 130/85	≥ 100
(3) (IDF)	* >94 ♂ y > 80 ♀ ** > 90 ♂ y > 80 ♀.	≥150	<40 en ♂ y <50 en ♀.	≥ 130/85	≥ 100 L

Tabla 1. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico. El impacto del síndrome metabólico (SM) a nivel mundial está reconocido ampliamente; en últimos años se ha intentado unificar los criterios diagnósticos. Para el diagnóstico del SM se considera tener tres o más de los parámetros descritos. * Europeos y Africanos; ** Asiáticos y Centroamérica. **(1)** National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; **(2)** American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute, **(3)** International Diabetes Federation.

En este contexto, las cantidades de metabolitos y el consumo deficiente o clásicamente excesivo, condicionan el desarrollo de dicha enfermedad, las dietas con alto contenido de lípidos, originan un desequilibrio dado que el gasto

energético del individuo es desigual al integrado al sistema y las consecuencias que trae consigo son variadas, pues las vías metabólicas implicadas sufren cambios, de saturación y desviación del comportamiento normal, debido a la concentración y naturaleza química de las moléculas implicadas, alterando las vías correspondientes, en diversos órganos involucrados. En términos generales, se destacan los incrementos de lípidos y lipoproteínas circulantes, desregulación en tejidos hepático, muscular y adipocitario respecto al manejo de carbohidratos y lípidos, además de alteraciones hormonales siendo una de las de mayor relevancia la del tejido adiposo y pancreático, que además de las consecuencias histológicas presenta alteraciones epigenéticas (McDevitt, *et al.*, 2001; Buettner *et al.*, 2006; Mensink *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

Las consecuencias finales determinan los perfiles fenotípicos y genotípicos clásicos del SM (y progresivamente DM2): el desarrollo de sobrepeso, obesidad, fenómenos tróficos celulares y cambios en la expresión génica en los tejidos hepático, muscular y adiposo, siendo este último el blanco de numerosos estudios, encaminados a elucidar los mecanismos moleculares de su funcionamiento, pues se trata de un tejido con impacto decisivo para la regulación de lípidos y carbohidratos a nivel sistémico (Gallou-Kabani & Junien, 2006; Buettner *et al.*, 2007).

TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo tradicionalmente visto como reservorio energético y responsable de proveer sustratos energéticos al organismo durante los periodos de ayuno, es en realidad un tejido que va modificándose respecto a su distribución/acumulación (recambio) en cada fase del desarrollo, siendo en etapas adultas cuando la acumulación de tejido adiposo se ubica en zonas donde antes no existía, con lo cual se modifica la imagen física y comportamiento bioquímico (Reyes, 2011; Ferris & Crowther, 2011; Halberg et al; 2009). De estos últimos, el comportamiento bioquímico lleva a la acumulación de grasa, situación que se torna grave cuando cobra importancia clínica-patológica impactando negativamente la homeostasis. La relación entre el sobrepeso-obesidad y el desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles ha evidenciado que las células que constituyen este tejido; adipocitos y otras que las acompañan, presentan una gran variedad de funciones que están relacionadas con la regulación de la homeostasis corporal. Físicamente, representa entre el 15 al 25% del peso corporal de una persona adulta (hombres 15%-20%, > 25% se considera obesidad; mujeres 20%-25%, > 33% se considera obesidad) está representado por el tejido adiposo (Cinti *et al.*, 2005, Cinti, 2006).

Respecto a la composición histológica, se observan diferentes tipos celulares mayoritarios: el adipocito, que constituyen entre un 60% - 70% de su estructura y el resto de formas celulares constituido de células endoteliales, macrófagos y precursores adipocitarios en distintos grados de diferenciación ya sean fibroblastos como precursores primarios y/o preadipocitos que son células intersticiales sin depósitos lipídicos y preparadas para transformarse ante señales de maduración (Poissonnet *et al.*, 1984; Hausman & Hausman, 1987).

El tamaño de los adipocitos varía considerablemente desde 20 a 200 micrómetros de diámetro, lo que significa que pueden en ciertas circunstancias aumentar hasta 1000 veces su volumen. Esta característica depende de diversas condiciones, entre las que destacan: diferenciación, ubicación anatómica, etapa de desarrollo, estado energético sistémico, entre otras. Aunque el origen embrionario de las

células grasas no es del todo conocido, las investigaciones realizadas sugieren que la línea adipocitaria deriva de un precursor embrionario multipotencial de estructura fusiforme que posee la capacidad para diferenciarse en distintas células especializadas (adipocitos, condrocitos, osteoblastos) las que finalmente forman parte de la estructura de diferentes tejidos (Geloan *et al.*, 1989; Hausman & Hausman, 1987).

Los procesos celulares que llevan a la conversión de las células multipotentes en adipoblastos y posteriormente en pre-adipocitos y adipocitos, continúan siendo investigados, aunque se reconocen mecanismos que permiten aproximarnos con mayor certeza sobre lo que ocurre en la formación del tejido adiposo. Las principales funciones del tejido adiposo son: reserva energética, amortiguación-protección ósea y aislamiento térmico además de conocerse funciones endócrinas y parácrinas (Gesta *et. al*; 2007; Gregoire, 1998; Vázquez-Vela *et al.*, 2008).

Dentro del estudio del adipocito, está bien descrito el comportamiento de sus dos subtipos: el blanco y el café (también denominado marrón o pardo; además de que estudios recientes hacen mención de un tercer tipo denominado “beige”, aunque no está totalmente aceptado); con una citología fenotípica y genotípica claramente separada. El tejido adiposo está altamente vascularizado, a tal punto que muchos adipocitos se encuentran en contacto directo con uno o más capilares. Estos permiten la entrada - salida de hormonas y metabolitos, fundamentales en la regulación de la diferenciación y el crecimiento celular. Normalmente la expansión del tejido adiposo se debe principalmente a hipertrofia de las células ya presentes (aumento del tamaño celular), sin un aumento en el número de células (hiperplasia). Generalmente el tejido adiposo se deposita en áreas con abundante tejido conectivo laxo, como por ejemplo las capas subcutáneas entre el músculo y la dermis. Sin embargo, también se localiza en forma típica, alrededor de las vísceras, riñones, corazón y otros órganos internos. A diferencia de otros tejidos, que tienen un crecimiento sincrónico, el tejido adiposo no es un órgano homogéneo, sino de crecimiento asincrónico que depende de los estímulos hormonales y necesidades. Más aún, se plantea que la ubicación topográfica del

tejido adiposo hace que tenga perfiles metabólicos distintos dependiendo de la ubicación anatómica, lo cual lo hace susceptible de participar en el desarrollo de ciertas patologías. Por ejemplo, la localización intra-abdominal visceral tiene más efectos patológicos que la localización subcutánea (Garaulet *et al.*, 2006)

TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

La clasificación del tejido adiposo es una de las más antiguas y tiene como fundamento, tinciones histológicas clásicas. Los tipos distintos de tejido adiposo se diferencian por su distribución, color, vascularización y actividad metabólica. El tejido adiposo blanco, está ampliamente distribuido y constituye la mayor parte de la grasa corporal; mientras que el tejido adiposo pardo, es mucho menos abundante que el blanco y limitado a ciertas áreas corporales específicas. (Fawwcett, *Tratado de histología*).

Tejido adiposo blanco

Estructuralmente es unilocular (de estructura intracelular uniforme) y el color aunque no es exactamente de color blanco, sino variantes de color amarillo que dependen principalmente de la dieta del individuo; mientras mayor es el contenido de carotenoides dietarios, más intenso es el color amarillo del tejido. Estructuralmente cada adipocito contiene una gota central grande de triacilgliceroles. El núcleo, de estructura oval, desplazado hacia la zona periférica, contiene cromatina de grano fino y no presenta un nucléolo visible, sin que esto implique que la maquinaria biosintética del tejido adiposo sea condicionante de una baja actividad metabólica. Posee además pocas mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso de baja densidad membranosa y un aparato de Golgi de pequeño tamaño. La gota de lípido está limitada por pequeños filamentos proteicos denominados perilipinas cuya síntesis dependerá de la demanda metabólica de resguardo. Dadas las funciones del tejido, cada célula está en contacto con al menos un capilar. Se encuentra organizado en pequeños lobulillos por tabiques de tejido conectivo no muy definidos. (Fawwcett, *Tratado de histología*; Subramanian *et al.*, 2004).

En periodos de ayuno, las células adiposas blancas liberan gradualmente los lípidos almacenados, catabolizando los triglicéridos almacenados, razón por la que la vacuola central disminuye su tamaño. El tejido adiposo blanco se encuentra distribuido como grasa subcutánea (tejido adiposo subcutáneo) y como panículo adiposo en el mesenterio y en la zona retroperitoneal (tejido adiposo visceral). En los últimos dos casos el tejido adiposo cumple una función básicamente de tipo mecánico como elemento de sostén y amortiguación (Mauriege *et al.*, 1999; Kuk & Ross, 2009).

Tejido adiposo subcutáneo

Representa la fracción mayoritaria, constituyendo alrededor de un 80% del total corporal. El metabolismo bioquímico (lipogénesis y lipólisis) es dependiente de la ubicación anatómica, aunque genéricamente se considera de baja actividad comparado con el tejido adiposo visceral. El tejido adiposo subcutáneo de la región abdominal tiene un comportamiento mixto en términos metabólicos ya que puede ser tan activo como el visceral; Aunque su principal función es la de aislante térmico y de amortiguación mecánica. (Fawwcett, *Tratado de histología*).

Tejido adiposo visceral

De ubicación perimetral a los órganos de la cavidad abdominal, se le subdivide en omental y mesentérico, el cual se ubica en las regiones profundas de la cavidad, también es conocido como tejido adiposo intraperitoneal. Está bien descrito que metabólicamente es más activo que el tejido adiposo subcutáneo en relación a los procesos de lipogénesis y de lipólisis. Resalta la presencia de receptores de distintos tipos, teniendo entre ellos: receptores adrenérgicos lipolíticos y anti-lipolíticos tipo α , β y β_2 , receptores para glucocorticoides, receptores de proliferación y de señalización hormonal diversa (Kuk & Ross, 2009; Freedland, 2004; Ibrahim, 2010).

Debido a su ubicación y distribución, se encuentra en contacto con los tejidos metabólicamente activos más importantes del cuerpo, además, la vascularidad está sujeta a irrigación portal, con lo cual los ácidos grasos liberados llegan

fácilmente al hígado, constituyendo así un aporte directo de energía para el metabolismo general. Diversos estudios indican el papel decisivo que juega la liberación incrementada y desregulada de ácidos grasos desde el tejido adiposo visceral a nivel sistémico, promoviendo el desarrollo de insulinorresistencia hepática, hiperinsulinemia, asociándose a su vez con la mayor prevalencia de patologías cardiovasculares, dislipidemias, disglucemias e hipertensión arterial (Bakker *et al.*, 2004; Ibrahim, 2010).

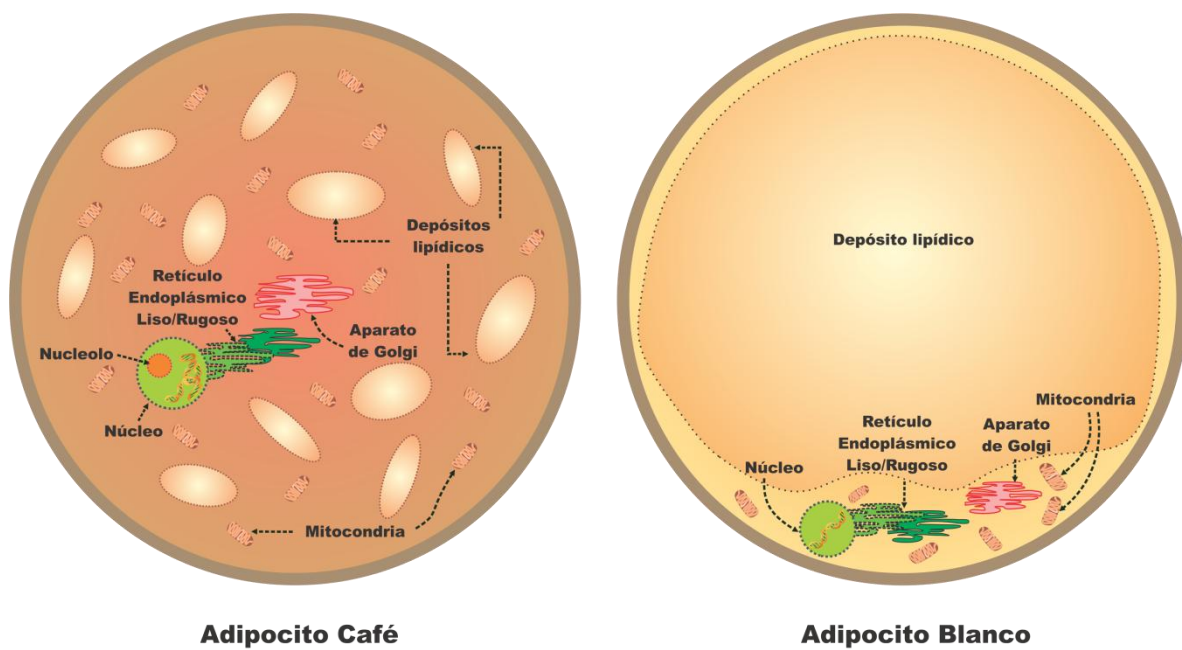


Figura 1. Tipos de adipocito. En la figura se observan los principales elementos citológicos de los dos tipos de tejido, además de una representación morfológica de los mismos. (Adaptado de Fawcett D. W.; Tratado de Histología).

Tejido adiposo pardo

Anatómicamente, el tejido se localiza alrededor del cuello y los vasos sanguíneos del tórax en su mayoría, aunque no solo se limita a estas zonas. De las diversas funciones que posee, se encuentra una de vital importancia: la termogénesis, esto es, la capacidad del organismo a responder al frío. Es de estructura multilocular, y las múltiples acumulaciones de triacilglicéridos en el citoplasma son de distintos

tamaños, pero independiente de esto, las gotas, y la célula en sí misma, son más pequeñas que las del tejido adiposo blanco. Otra de las diferencias primordiales, y que le otorgan tanto su coloración a la tinción (color marrón, café, rojizo) como la actividad metabólica propia, es el considerable número de mitocondrias, cuyos numerosos citocromos otorgan ambas características (Cannon & Nedergaard, 2004).

La forma clásica es poligonal, con un citoplasma abundante y en su mayoría granuloso. El núcleo posee forma redonda, no picnótica, de ubicación ligeramente excéntrica y contiene gránulos de cromatina gruesos y con un nucléolo visible. En el citoplasma se observan mitocondrias grandes y redondas que presentan crestas juntas. La irrigación sanguínea es más abundante que en tejido blanco, además de una cantidad considerable de terminaciones nerviosas entre sus células. Otra característica importante, es que con la edad, el tejido adiposo pardo se va transformando en tejido adiposo blanco (Fawcett, *Tratado de histología*; Cannon & Nedergaard, 2004).

Como ya se había mencionado brevemente, una de las funciones más importantes, es la de termogénesis pues todos los animales superiores deben mantener la temperatura corporal dentro de un margen muy estrecho. El tejido adiposo cumple con la función de regulación, mediante diversos mecanismos, uno de ellos, por la vía de la noradrenalina, neurotransmisor secretado por el sistema nervioso autónomo, que realiza la activación de la lipasa sensible a hormonas (LHS), que a su vez aumenta la hidrólisis de triacilglicéridos de los adipocitos cuyo producto; los ácidos grasos ingresan a la ruta de la beta oxidación mitocondrial. La activación de esta vía tiene como producto, el consumo de oxígeno y la producción de calor durante este proceso. En este sentido, otra vía por la que se llega a la hidrólisis de los triglicéridos, la cual es mayoritaria y bien descrita, es la del conjunto de proteínas conocidas genéricamente como “desacoplantes” e identificadas por las siglas UCP (**Un**Coupling **P**rotein). Esta familia de proteínas se compone de 5 subgrupos, designadas en orden numérico por distribución y acción, teniendo así que la UCP-1 se encuentra solo en el tejido adiposo pardo, la

UCP-2 se distribuye en varios tejidos (músculo, riñón, vísceras), la UCP-3 solo se encuentra en el músculo esquelético, y las UCP-4 y UCP-5 se ubican en el cerebro. Como su nombre lo indica, actúan en forma de factor desacoplante entre la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa, de modo que se forma menos ATP y se disipa mayor cantidad de calor (Bhakoo, 1974; Stephenson, *et. al.*, 2001; Erlanson-Albertsson, 2003; Rousset *et. al.*, 2004; Dulloo & Samec, 2001).

Dentro de su estructura, el tejido adiposo pardo posee además, tres tipos de receptores adrenérgicos 1) tipo beta: Su activación estimula la liberación de ácidos grasos libres 2) tipo alfa 1: de acción es complementaria a la activación de los receptores beta adrenérgicos. Receptores tipo alfa 2: Su activación disminuye las vías de metabolismo de ácidos grasos, teniendo por esta razón, efectos anti-termogénicos. La gran cantidad de mitocondrias con crestas largas y apiladas, otorga a este tejido la posibilidad de realizar una oxidación activa donde la energía liberada no está ligada a la fosforilación oxidativa sino que es empleada en la producción de calor. La evidencia del comportamiento del tejido pardo, indica que una vez efectuado el desarrollo energético, se produce una evolución hacia el resguardo de lípidos en forma de una vacuola, dándole un aspecto unilocular a la célula, característico de las células adiposas blancas, aunque no hay certeza que se trate de una transformación total (Cannon & Nedergaard, 2004; Argyropoulos & Harper, 2002).

ORIGEN Y DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO

El desarrollo, origen, expansión y metabolismo del tejido adiposo se encuentran dirigidos por una serie de acciones coordinadas de factores variados, que integran una red finamente regulada y diseñada primordialmente para el mantenimiento del equilibrio energético en el organismo. Los factores que impactan estos procesos, son de origen genético y epigenético (ambientales y farmacológicos). El uso de tecnologías *in silico*, líneas celulares y modelos animales, es cada vez mayor, para poder conocer más a fondo las vías y señales que involucran la comunicación y regulación entre los órganos en cada uno de los aspectos antes mencionados. Es sabido que la adipogénesis resulta ser un fenómeno vital en la regulación bioquímica y susceptible también de efectos sistémicos. Respecto a estos procesos, se tiene ya un conocimiento definido acerca de los mecanismos que regulan la diferenciación a adipocito; que en general, es una cascada de eventos transcripcionales (Farmer, 2007; Rosen *et al*, 2001; Sarjeant & Stephens, 2012).

Diferenciación del adipocito

El proceso de diferenciación es un proceso que involucra la expresión y represión de varios genes, para adquirir las características propias del adipocito maduro; los mecanismos moleculares implicados, se encuentran ampliamente descritos, aunque no son conocidos en su totalidad. En general, la serie de eventos que conforman el proceso se describen de manera breve a continuación (Cannon & Nedergaard, 2004):

Los pre-adipocitos que se encuentran definidos respecto a otras células que se integran en el tejido adiposo y con características propias de sí. Se inicia la expresión de marcadores tempranos, cesando el crecimiento y de esta forma suceden variantes en el ciclo celular. Los cambios de expresión condicionan un paro de crecimiento, sin que esto repercuta en el comportamiento bioquímico, de hecho la estimulación de varios ciclos de replicación de DNA y la duplicación celular subsecuente obliga a la célula a continuar con el ciclo celular. Es bajo estas circunstancias que se condiciona a la proliferación del tejido. Esta expansión

mitótica es esencial para la transformación final a un adipocito maduro. Una de las señales tempranas aceptadas comúnmente para el cese de crecimiento, es la expresión de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), la cual ocurre de manera espontánea independiente de los inductores de diferenciación, aunque algunas evidencias sugieren a insulina como uno de sus principales reguladores. Una vez que estos fenómenos han ocurrido, el comportamiento activo bien definido produce la activación de 2 familias de factores de transcripción: las C/EBPs (CCAAT/Enhancer Binding Proteins) y el PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma), ambas caracterizadas como reguladores de transcripción de genes de adipogénicos/diferenciación. Se ha descrito que las variantes de transcripción C/EBP δ y C/EBP β podrían inducir al propio PPAR γ (Rosen *et. al.*, 2006; Hausman & Hausman, 2006; Lekstrom-Himes & Xanthopoulos, 1998; Shao & Lazar, 1997).

Los eventos más importantes tienen lugar posterior a los efectos de transcripción de esta familia, que regulan señales concatenadas para la diferenciación terminal. Al final de la diferenciación, el adipocito incrementa la expresión y actividad de las enzimas implicadas en la lipogénesis, destacando la sintasa de ácidos grasos, la enzima málica y la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Esta actividad se encuentra potenciada por otro elemento característico del adipocito maduro: el incremento de sensibilidad a la insulina, pues la síntesis de receptores de insulina (RI) y de sus respectivos transportadores receptores de insulina; el GLUT-4 (Glucose transporter type 4) se presenta exacerbada, hechos de vital importancia, pues el funcionamiento correcto es responsable de la homeostasis de la glucosa y vinculado estrechamente con los lípidos. El incremento de síntesis proteica, también incluye a los receptores adrenérgicos previamente mencionados y aumento de la proteína α P2, que es responsable de fijar ácidos grasos (específica de los adipocitos), y por último, el incremento en la síntesis proteica de perilipina, proteína asociada en forma periférica promotora de la formación y estabilización de la gota lipídica. Toda la maquinaria biosintética madura, produce, además de los elementos ya mencionados, la secreción de moduladores conocidos genéricamente como adipocinas, tales como la leptina, adiponectina, resistina y

angiotensina (Morrison & Farmer, 2000; Tchkonja *et. al.*,2002; Cannon & Nedergaard, 2004):

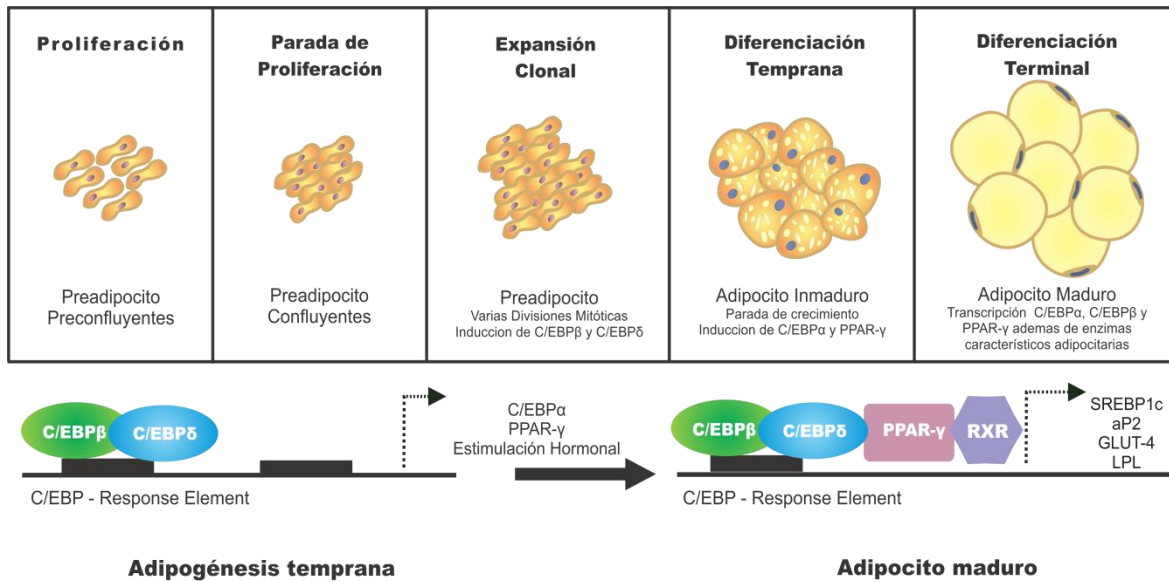


Figura 2. Diferenciación de preadipocitos a adipocitos. Esquema del proceso de transición de preadipocito a adipocito maduro en sus diferentes estadios, junto al control transcripcional promovido durante la adipogénesis. (Adaptado de: Ràfols, 2013; Sethi & Vidal; 2007).

EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO

Resguardo y liberación

El enfoque clásico sobre el estudio del tejido adiposo lo ubica como depósito y dispensador de sustratos energéticos, eventos que ocurren mediante dos procesos bioquímicos definidos: la lipogénesis y lipólisis, respectivamente (Ibrahim, 2010).

Lipogénesis

Dentro del tejido adiposo, el adipocito blanco funge como mayor reservorio, el cual se encuentra distribuido como triacilglicéridos en grandes gotas lipídicas. Estos lípidos provienen de los quilomicrones nacientes y las lipoproteínas de muy baja densidad circulantes (VLDL por sus siglas en inglés Very Low Density Lipoprotein). Los triglicéridos son obtenidos de dichas lipoproteínas, por un mecanismo que involucra la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) ubicada en endotelio y en general en los capilares que irrigan al tejido adiposo, que actúa hidrolizando los triglicéridos hasta ácidos grasos libres y monoacilglicéridos. Estos ácidos grasos son captados mediante transporte activo mediado por proteínas. (Errico *et. al.*, 2010; Schaefer *et. al.*, 1978; Grummer & Carroll, 1988).

Hasta el momento, se han caracterizado al menos tres grupos de receptores proteicos y transportadores de ácidos grasos en membranas: Las proteínas que unen ácidos grasos de membrana plasmática (PM-FABP), las translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP). Una vez que los ácidos grasos han sido internalizados, son re-esterificados como triglicéridos y depositados en las gotas grasas del adipocito. Este proceso es complementado con la formación de ácidos grasos a partir de otros precursores, de los cuales, el mayoritario es la glucosa, de hecho se ha observado que los individuos con deficiencias de lipoprotein lipasa (LPL) son capaces de acumular triglicéridos de forma notoria (Stremmel *et. al.*, 1985; Abumrad *et. al.*, 1981; Schaffer *et. al.*, 1994; Ranganathan *et. al.*, 2006).

Lipólisis

Es el proceso mediante el que los triglicéridos almacenados se hidrolizan hasta glicerol y ácidos grasos, efecto dirigido y limitado por lipasa sensible a hormonas (LHS). Esta enzima se encarga de catalizar la hidrólisis a triacilglicéridos a monoacilglicéridos, para que posteriormente la enzima monoacilglicerol lipasa produzca el último ácido graso libre. La LHS se encuentra regulada por una cinasa dependiente de adenosil-monofosfato cíclico (AMPc), razón por la que, todos los agentes que estimulen a la enzima adenilato-cinasa y aumenten la formación de AMPc, estimulan la lipólisis. Por parte de la inhibición lipolítica, tenemos a la insulina, cuyo mecanismo de acción se describirá más adelante (Hailiwell *et. al.*, 1996; Maurièg *et. al.*; 1999; Errico *et. al.*, 2010).

TEJIDO ADIPOSO: FUNCIÓN ENDÓCRINA

Como ya se documentó, los estudios realizados en los últimos años sobre el tejido adiposo, han permitido identificar y caracterizar la estructura, función y distribución de los agentes producidos por el tejido adiposo. Dentro de los múltiples factores secretados por este tejido, los efectos logrados son de acción parácrinas y autócrina; figurando la regulación del metabolismo lípido-glúcido, control del apetito, fenómenos termo-reguladores, angiogénesis y modulación del sistema inmune. Varios de los efectos del tejido, como órgano endocrino, se refieren tanto al adipocito propiamente, como a las células inmersas en el tejido, pre-adipocitos, linfocitos y macrófagos en general. (Ronti *et. al.*, 2006; Sethi & Vidal-Puig, 2007).

Una de las características más importantes del tejido es la capacidad de respuesta a los aportes energéticos excesivos, mediante la alteración en la producción de los agentes genéricamente llamados adipocinas (se entiende por adipocina a cualquier proteína secretada por el tejido adiposo). Estas alteraciones de la producción se encuentran alteradas en el sobrepeso y obesidad, afectando aún más las complicaciones metabólicas asociadas. El tejido adiposo sintetiza una variada gama de adipocinas, entre las que destacan la leptina, adiponectina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), resistina, proteína 4

transportadora de ácido retinoico (RBP-4), visfatina, omentina, serpina, lipocalina-2, apelina, entre otras. Es todo un conjunto de proteínas el que se encarga de integrar las funciones de ingesta alimentaria, distribución, acumulación y liberación de sustratos energéticos y por lo tanto su capacidad de expansión. (Sethi & Vidal-Puig, 2007; Halberg *et. al.*, 2008).

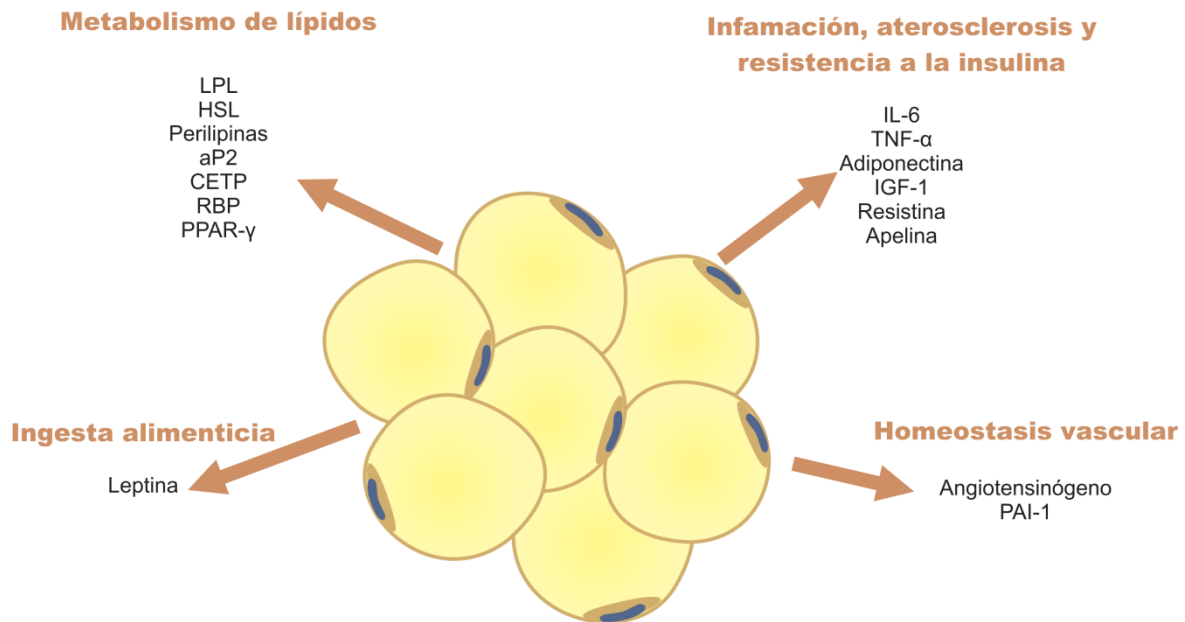


Figura 3. El tejido adiposo como órgano endocrino. Hasta el momento, más de cien elementos de secreción por parte del tejido adiposo han sido evidenciados. Estos elementos (de origen proteico en su mayoría), reciben el nombre de adipocinas. Durante la diferenciación y maduración del tejido adiposo, en sus formas celulares (tanto el tejido café como el blanco) realizan la síntesis según sea los requerimientos del medio celular. A manera de esquema, se muestran algunas de las adipocinas mas conocidas, en referencia a los efectos metabólicos que desarrollan. Se destaca que todos los factores pueden actuar a nivel local de sistémicos o localizados en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, sistema inmune, endocrino y vascular. Abreviaturas: LPL, lipoproteinlipasa; HSL, lipasa sensible a hormona; aP2, proteína transportadora de lípidos adipocitaria; RBP, proteína transportadora de retinol, CETP, proteína transportadora de esterés de colesterol, PPAR- γ , receptor activado por proliferadores de peroxisomas gama; IL-6, interleucina 6; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa, IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina 1; PAI-1, Inhibidor del activador del plasminógeno 1. Adaptado de: *The endocrine function of adipose tissue: an update.* Ronti *et. al.*; (2006).

INSULINA Y REGULACION SOBRE TEJIDO ADIPOSO

En el tejido adiposo además del ingreso mediante transportadores de ácidos grasos, ocurre el almacenamiento de energía mediante la recaptura de glucosa. Este mecanismo depende de las acciones moduladas por una hormona clave: la insulina. La insulina es un péptido de 5.8 KDa secretada por la células β en los islotes pancreáticos de Langerhans. La secreción se presenta en respuesta a niveles elevados de glúcidos en la sangre, en concreto, da respuesta a la concentración de glucosa plasmática. Estos y otros efectos involucran una compleja red de señalización que condiciona efectos de proliferación y diferenciación celular (Pessin & Saltiel, 2000; Lee & Pilch, 1994; Kahn & White, 1989).

La principal función de esta hormona consiste en mantener niveles de glucosa en un rango que va desde los 70 a los 100 mg/dL (rango aceptado comúnmente para definir el comportamiento normal de la glicemia) y hasta 140 mg/dL en el postprandio, mediante la promoción de diversos mecanismos según sea el tejido favoreciendo la entrada de glucosa y almacenamiento en hígado, músculo y tejido adiposo, inhibiendo a su vez rutas gluconeogénicas y glucogenolíticas. Además de estos efectos, regula el metabolismo de lípidos y proteínas, en conjunto a la estimulación de división y crecimiento celular, con efectos mitógenos que se han descrito desde hace tiempo (OMS, 2003; Pessin & Saltiel, 2000; Lee & Pilch, 1994).

Las acciones que esta hormona realiza, son a través de cascadas de señalización, que involucran eventos de fosforilación en diversas proteínas, con lo que se transmite la señal y regulación de sucesos metabólicos (Saini, 2010).

Receptor de insulina.

Para que la insulina realice sus efectos, es necesario que se produzca la unión a los receptores presentes en la membrana celular. El receptor de insulina (RI) pertenece a la familia de los receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas (RTK's), los cuales tienen como característica

que al unirse a su ligando, auto-fosforilandose en residuos de tirosina. El receptor se encuentra conformado como un heterotetramero: los componen dos subunidades α y dos subunidades β que se unen mediante un puente disulfuro. Al igual que muchos receptores de su tipo, las subunidades α se encuentran localizadas al exterior de la célula, exponiendo los tipos de unión a la insulina; mientras que las subunidades β , se distribuyen en la zonas extracelular, transmembranal y el dominio intracelular; es donde se localiza la actividad tirosin-cinasa (Ebina *et. al.*; 1985; Pessin & Saltiel, 2000; Lee & Pilch, 1994; Kahn & White, 1989).

En condiciones basales las subunidades α tiene un papel regulador sobre las subunidades β , inhibiendo la capacidad de receptor para autofosforilarse. Este mecanismo se ve modificado, una vez que la insulina de une al receptor, pues se generan cambios conformacionales en las subunidades α , que permiten que las subunidades β se active y puedan autofosforilarse en los residuos adecuados. Estos residuos, son variados y ubicados en distintas zonas de la porción intracelular del receptor (que a su vez se divide en tres regiones: yuxtamembranal intracelular, intracelular, reguladora y región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal), y se sabe que son necesario al menos 7 sitios de fosforilación y de la actividad enzimática de la cinasa de tirosina para el apropiado funcionamiento del receptor (Avruch, 1998; Ebina *et. al.*; 1985; Pessin & Saltiel, 2000).

Una vez que el receptor se activa durante la propia fosforilación se inicia la cascada de señalización, cuyos efectos serán definidos por distintas condiciones y necesidades celulares. Dos vías de transducción son principalmente estimuladas por la interacción insulina – receptor: la primera asociada a la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI-3-K) y la segunda que evoca la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK's). Aunque las vías activadas por la insulina son varias, éstas últimas son las más relevantes a nivel metabólico. Ambas regulan la mayoría de los efectos de metabolismo energético, expresión genética y efectos mitogénicos receptor (Avruch, 1998; Ebina *et. al.*; 1985; Pessin & Saltiel, 2000).

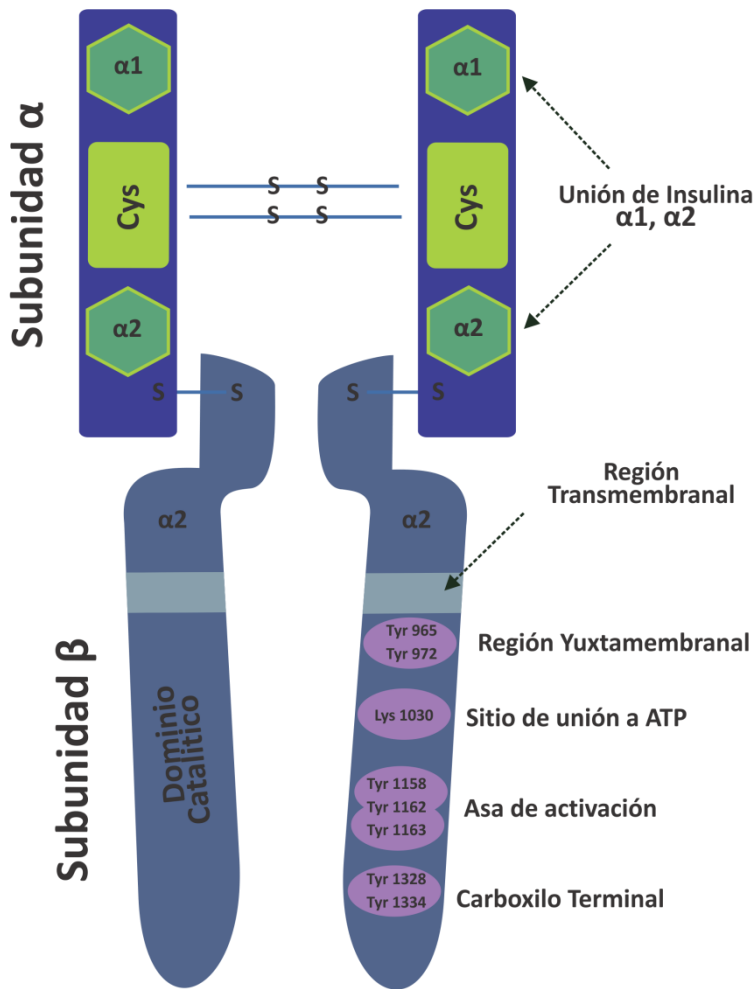


Figura 4. Receptor de Insulina. El heterotetramero consiste de dos subunidades α extracelulares unidas a dos subunidades β por puentes disulfuro. Las subunidades α contienen las regiones de unión a insulina $\alpha 1IR$ y $\alpha 2IR$ en adición a una región rica en cisteínas (Cys). La subunidad β contiene una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular. Se describen además los sitios de unión y efectos (función) más conocidos del receptor. (Adaptado de Cheng et. al., 2002; Saini, 2010).

Vía de señalización de las MAPK's

A nivel de tejido adiposo, la síntesis proteica está regulada por la insulina mediante la activación de la vía de las MAPK's, que involucran una amplia gama de sustratos de expresión genética y estimulación proteica sensible a la insulina, sin embargo, es importante mencionar que no influyen directamente en la regulación de transporte de glucosa. Las MAPK's son proteínas que constituyen una superfamilia de serina/treonina-cinasas implicadas en la regulación de la

proliferación, diferenciación y muerte celular programada. La activación de las MAPK's se pueden producir por numerosos factores de crecimiento, y mitógenos que promueven diversos sucesos de fosforilación catalizados por la activación secuencial de una cascada de proteínas cinasas (MAPKKK → MAPKK → MAPK) que en última instancia, induce la translocación hacia el núcleo donde activan a varios factores de transcripción diana mediante su fosforilación. Dentro de las MAPK's se distinguen tres subfamilias de proteínas: cinasas reguladas extracelularmente (ERK's) cinasas amino terminal c-Jun (JNK's) y proteínas-cinasas p38 (p38-MAPK) (Johnson & Lapadat, 2002; Seger & Krebs, 1995; McCubrey, 2007; Peyssonnaud & Eychène, 2001; Saini, 2010).

La activación de las vías MAPK; como ya se ha mencionado brevemente, parte de la fosforilación en residuos de tirosina del dominio citoplasmático del receptor a insulina. El producto de esta fosforilación es la asociación de una proteína denominada Shc, la cual tiene como función unir al complejo Grb2/SOS. SOS es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina capaz de activar a Ras, paso decisivo en la cascada de señalización debido a que la unión GTP-Ras, promueve la unión y activación de Raf-1, que a su vez tiene como productos finales el reclutamiento y activación de MEK y las ERK1 y ERK2. La estimulación de las ERK 1/2 se relaciona principalmente con los procesos de supervivencia y proliferación celular, la activación de factores de transcripción (AP-1) y de la cinasa S6 ribosomal, que promueve la supervivencia a través de la fosforilación de moléculas como la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc, (CREB) (Johnson & Lapadat, 2002; McCubrey, 2007; Peyssonnaud & Eychène, 2001; Virkamäki, 1999).

Cabe señalar que la insulina, es capaz de activar a las MAPK's por una vía independiente de la activación de la activación de Shc. Pero a diferencia de la activación del RI, la activación obedece a la acción de sustrato del receptor de insulina (Insulin Receptor Substract, IRS, por sus siglas en inglés). Una vez que el sustrato se encuentra activo, recluta al complejo Grb2-SOS, el proceso de activación sigue la misma secuencia que la vía descrita para Shc, lo cual concluye

con la hipertrofia de tejido adiposo y por lo tanto el aumento del resguardo a triglicéridos (Virkamäki, 1999; Gual *et. al.*, 2005).

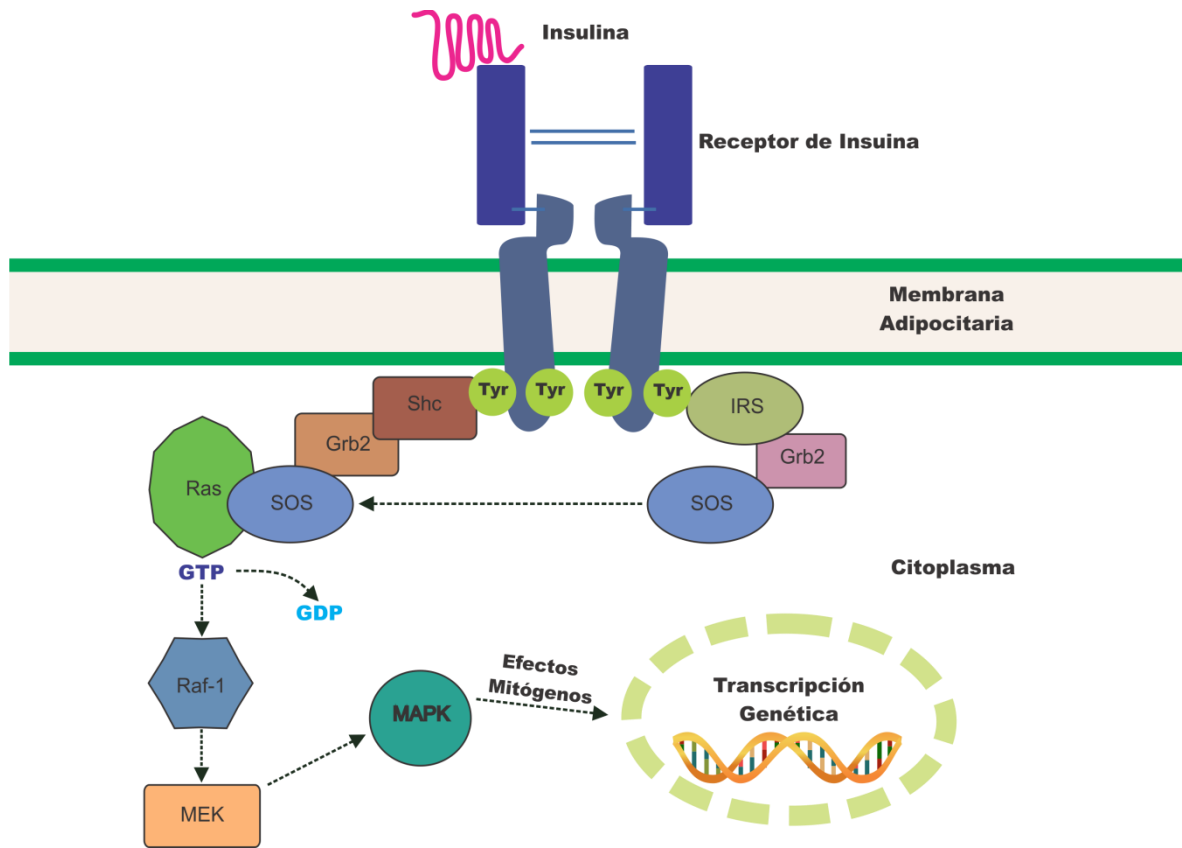


Figura 5. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. Los efectos producidos por esta vía es a través de dos mecanismos. El primero de ellos requiere la activación del IR, que promueve la asociación de la proteína Shc, quien a su vez une al complejo Grb2/SOS; SOS activa a Ras y se da inicio al encendido de la cascada de las MAPK. GTP-Ras une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las ERK1/2 (ilustrada como MAPK). El segundo mecanismo es una independiente de Shc, pero dependiente de la activación del IRS; razón por la que la insulina es capaz de activar a las MAPKs. En esta, una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc. (Adaptado de: Cheng *et. al.*, 2002; Saini, 2010; Zick, 2002).

Vía de señalización de PI3K

Dentro de las vías de señalización concernientes al transporte y metabolismo de glucosa, está la cascada de activación de PI3K que cumple con tales efectos. El mecanismo a través del que se produce la interacción es mediado nuevamente

por el receptor que una vez activo, interactúa y fosforila a las proteínas del complejo IRS. Las proteínas IRS son una familia de proteínas que corresponden y sirven como mediador; como su nombre lo indica, entre el receptor de la insulina y la cascada de activación del PI3K. Se conocen al menos cuatro isoformas del receptor (IRS-1 al IRS-4), y de esto dependen los sitios de fosforilación. La fosforilación del IRS en los dominios de unión a tirosinas (PTB) en conjunto con los dominios amino-terminales de homología de plecstrina (denominados PH) permite el acoplamiento correcto que se produce entre el ISR y el IR (Pessin & Saltiel, 2000; Virkamäki, 1999; Backer, 1992; Saini, 2010).

Una vez que esta fosforilación-acoplamiento se ha efectuado de modo correcto, se convierten en sitios de unión a proteínas que contiene dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), muchas de estas funcionan como proteínas adaptadoras, como es el caso de la propia PI3K, Grb2 (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento), SHP-2 (proteína tirosina fosfatasa con homología a Src), entre muchas otras. Las fosfatidil-inositol-3-cinasas (PI3K's) constituyen una familia conservada de lípido-cinasas que catalizan la fosforilación de los fosfatidil inositoles de membrana en la posición D3 del anillo inositol, siendo el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3) el más común. Estas cinasas con heterodímeros formados por una subunidad catalítica, p110 (p110 α , p110 β o p110 δ) y la subunidad reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , o p55PIK) siendo p85 la más común (Engelman et. al., 2006; Virkamäki, 1999; Saini, 2010; Zick; 2002).

La subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los cuales permiten su unión a las proteínas IRS, las isoformas 1 y 2 están presentes en el caso del tejido adiposo. La interacción de estas proteínas, induce un cambio alostérico en la conformación de la subunidad reguladora (que para el caso de la señalización efectora de recaptura de glucosa es p85) lo que produce una inhibición de su actividad restrictiva sobre la subunidad catalítica (p110) y a consecuencia de esto la activación de la misma promueve su movilización a nivel de membrana plasmática, lugar donde tiene acceso a diversos

sustratos de la familia de los inositolos. Siendo los principales, el PI4-P (fosfidilinositol 4 fosfato) y PI4, 5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando los productos del PIP2 (PI3, 4-bifosfato) y PIP3 (PI3, 4, 5 –trifosfato), respectivamente (Cheng *et. al.*, 2003; Pessin & Saltiel, 2000; Virkamäki, 1999).

Es concretamente la formación del PI3P la que resulta decisiva, pues funge como sitio de unión para las cinasas de serina como PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositodiso-1) y Akt. La serina/treonina cinasa Akt (también denominada PKB), es una de las principales diana de PI3P, y en humanos se han descrito 3 isoformas diferentes (Akt1, Akt2, Akt3). La unión de Akt a PI3P provoca un cambio conformacional en Akt que hace que sea fosforilada y por lo tanto activada por las cinasas dependientes de fosfidilinositol (PDK's) (Bhattacharya *et. al.*, 2007; Virkamäki, 1999; McCarthy & Elmendorf, 2006).

En el caso de la señalización por insulina, la cinasa Akt que ha sido reclutada en la membrana plasmática, es fosforilada en los residuos Ser473 y la Thr308. Estos eventos de fosforilación son eventos importantes que ocurren en primera instancia por la acción del complejo proteico mTor/Rictor (también conocido como PDK2) sobre la fosforilación en el residuo Ser473. Esta primera fosforilación parece promover la interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de Akt y concatenadamente la interacción con la cinasa PDK1 que la fosforila en la Thr308. De esta forma se producen las dos fosforilaciones necesarias para completar la actividad de Akt (Bhattacharya *et. al.*, 2007; McCarthy & Elmendorf, 2006; Saini, 2010).

Akt es la responsable de la mayor parte de los efectos metabólicos de la insulina. Las vías que se promueven posteriores a su activación son diversas e incluyen a la enzima glucógeno sintasa (GS), a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), a la fosfofructocinasa 2 (PFK2), a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (factor de transcripción CREB), a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la

caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl-2 (BAD). (Engelman, 2006; McCarthy & Elmendorf, 2006; Myers & White, 2002)

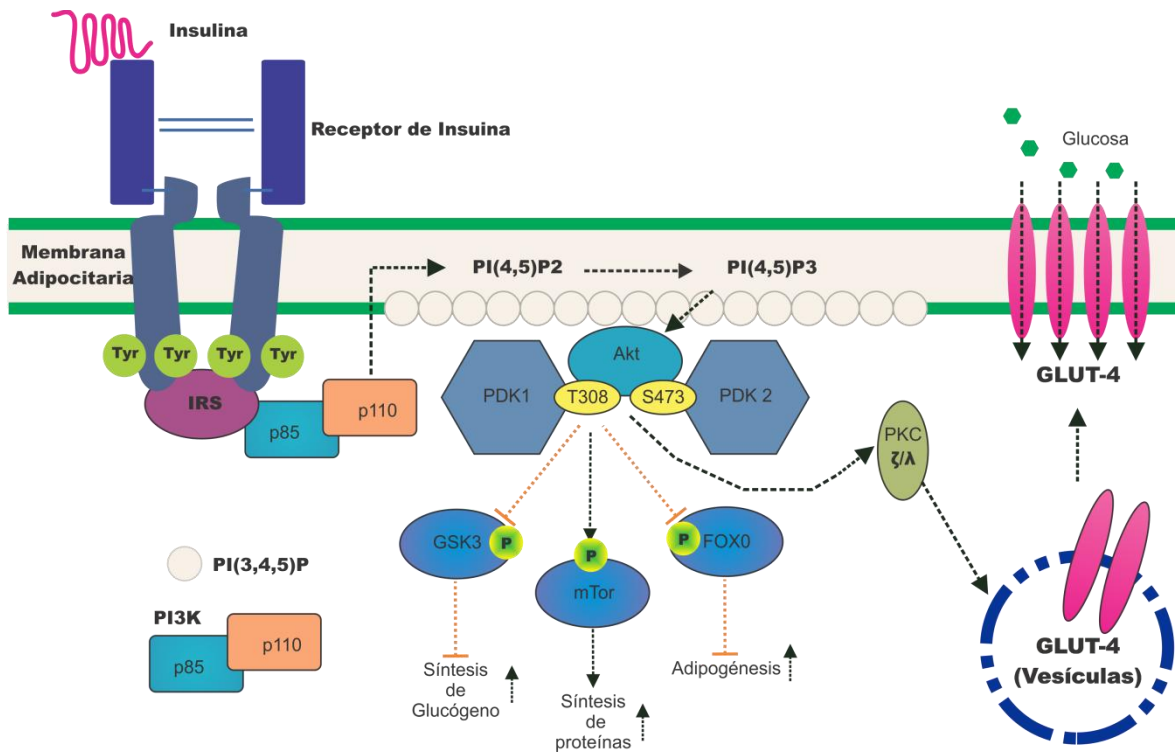


Figura 6. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía es conocida fundamentalmente por representar el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. Cuando el IR se une a la insulina, la activación y autofosforilación posterior activa a IRS, realizando la fosforilación en residuos de Tyr (Y, convirtiéndose de esta forma en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la inhibición de la actividad restrictiva de p85 sobre p110 y a consecuencia de ello, p110 se recluta a membrana intertando con su sustrato PI(4,5)P2, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P3, que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser473 que es seguida por una fosforilación en la Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9. (Adaptado de: Cheng et. al., 2002; Saini, 2010; Zick, 2002).

De estos efectos, la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3, una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucógeno sintasa; y la inhibición de

GSK3 por acción de Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa, generando un aumento en la síntesis de glucógeno. Paralelo a estas acciones, se promueve la movilización de las vesículas internas hacia la periferia mediante la activación de PCK, la subsecuente exposición del transportador de glucosa dependiente de insulina, el GLUT-4, que una vez expuesto, introduce a la glucosa del medio extracelular (siempre que exista la concentración adecuada, ya que su K_m depende de ello), para seguir la vía glucolítica normal, y su posterior almacén como gota lipídica en tejido adiposo (Engelman, 2006).

En el tejido adiposo, se ha identificado el transportador GLUT-4 como el mayor promotor de la vía de resguardo de glucosa. Los transportadores de glucosa son proteínas encargadas del transporte de monosacáridos al interior de las células del organismo. Se han identificado 14 transportadores nombradas sencillamente del 1 al 14. Clasificándose en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, como su especificidad al sustrato (glucosa, fructosa y/o galactosa), sus valores de K_m , o su respuesta a los bloqueadores específicos citocalasinas B y forskolina. A la familia de genes que codifican para estos transportadores se le denomina acarreadores de soluto del grupo 2A (SLC2A, por sus siglas en ingles) (Castrejón et. al., 2007).

De estas vías de actividad metabólica, tanto MAPK's como PI3K, la activación, conservación y correcto funcionamiento, dependen del estímulo al tejido adiposo según las condiciones del sistema. La principal alteración en ambas vías, así como su activación depende del aporte calórico en directo, mediante fenómenos complejos que involucran el sobreestímulo, fallo, activación de daño local y sistémico media por hormonas y metabolitos. Condiciones clásicas de la obesidad, SM y patologías como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

SOBREALIMENTACIÓN Y DESREGULACIÓN METABÓLICA

De la forma clásica, la obesidad se ha explicado como un aumento de la masa adipocitaria, consecuencia lógica de una sobreingesta alimenticia asociada a la baja actividad física. Estas observaciones no son del todo erróneas, pero es importante destacar que aun con cargas nutricionales normales, el tejido adiposo cuenta con una serie de mecanismos de control de suma importancia. Ante un excesivo ingreso energético, el tejido adiposo tiene la capacidad de cambiar su número y tamaño celular (hiperplasia e hipertrofia, procesos que dependen del comportamiento hormonal y energético) provocando sobrepeso, obesidad y complicaciones metabólicas clínicas bien descritas, alteraciones que se desprenden de este fenómeno, corresponden a la caída de sensibilidad a la insulina y la resistencia a la misma, mismas que progresivamente condicionan al desarrollo de patologías cardiovasculares importantes (Trayhurn, 2005).

Resulta importante partir de estos hechos, pues se ha observado que la capacidad de expansión y almacenamiento por parte del adipocito está limitada y del mismo modo el incremento de masa grasa, por lo que no explica del todo los cambios metabólicos sistémicos, ni la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. Algunos modelos experimentales murinos utilizados para conocer estos fenómenos, han demostrado que existe resistencia a la insulina periférica, incluso en ausencia del tejido adiposo, de hecho, la insulinoresistencia asociada a la obesidad es de mayor prevalencia a nivel mundial. Existen, dos importantes hipótesis que explican este fenómeno, una referente a la deficiencia en el almacén de sustratos en tejido adiposos, y una más que complementa, obedeciendo a los cambios de la adiponectinas producidas y los efectos sistémicos de las mismas. Estos son fenómenos tardíos, y que se suceden al mismo tiempo que otros daños sistémicos, producidos generalmente por cambios bioquímicos de lipotoxicidad (FID, 2006; Sethi & Vidal-Puig, 2007; Kim *et al.*, 2000; Tschöp & Heiman, 2001)

Inicialmente dieta alta en carbohidratos implica una mayor absorción intestinal de los mismos, al tiempo en que la eficiencia de la absorción intestinal de glucosa ocurre a través de un coordinado complejo proteico mediado por diferentes transportadores, dentro de los que destacan los co-transportadores glucosa/sodio (SGLT, por sus siglas en inglés) y el transportador GLUT-2. El ingreso elevado de glucosa que entra al flujo sanguíneo esplénico irriga simultáneamente páncreas e hígado, el primero secreta insulina en cantidades correctamente censadas por las células beta pancreáticas, mientras el segundo comienza la reabsorción del carbohidrato que simultáneamente cumple con la función de las rutas glucolíticas - ciclo de Krebs - cadena respiratoria, para incrementar flujos de ATP y la biosíntesis de glucógeno como respaldo energético del carbohidratos. Sin embargo, cuando estas rutas saturan se presentan incrementos importantes de acetil-CoA que disparan señales lipogénicas, se deriva entonces hacia un incremento de la síntesis de triglicéridos empaquetados en VLDL (Very-Low-Density Lipoprotein; VLDL por sus siglas en inglés) y llevados para su quema y resguardo en músculo y tejido adiposo blanco respectivamente. Cuando el consumo supera al gasto energético, la absorción de carbohidratos es tan eficiente que termina por incrementar el flujo de formación de triacilgliceroles y por lo tanto su resguardo, lo que conlleva al incremento de peso y obesidad (Shi & Cheng, 2009; Meegalla, 2002; Parks, 2002).

Además de estos fenómenos desregulatorios de carbohidratos; los cambios a nivel del metabolismo lipídico son de gran impacto. La distribución de los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos y del colesterol de la dieta, sufren una reesterificación a nivel intestinal, principalmente en el retículo endoplásmico del enterocito, produciéndose nuevamente triglicéridos y colesterol esterificado. Dentro de los enterocitos, estos lípidos se ensamblan con las apoproteínas B-48, A-I, A-II, A-IV y A-V. Una vez que estos eventos catabólicos suceden, se forma la lipoproteína denominada quilomicrón naciente (Qm), la cual es secretada a circulación linfática y sigue su curso hasta que mediante circulación portal llega al torrente sanguíneo. Durante este tránsito, se produce un intercambio de apoproteínas por parte de otro grupo de lipoproteínas circulantes: las HDL (por sus

siglas en inglés; High Density Lipoprotein); las cuales ceden C-I, C-II, C-III y E necesarias para que mediante la interacción con sus receptores, se realice el “anclaje” y acción de la Lipoproteinlipasa (LPL) ubicada en el endotelio capilar. De esta forma, el quilomicron (ahora “maduro”) realiza el depósito de lípidos. La acción de la LPL, tiene como consecuencia la remoción de colesterol, fosfolípidos y las apoproteínas A y C, al tiempo en que las HDL realizan la esterificación de colesterol con ácidos grasos de lecitina (Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida; Bioquímica de Harper).

Estos cambios constitutivos, así como la llegada por circulación al tejido hepático, provocan que los quilomicrones sean catabolizados y degradados hasta lípidos una vez más, mediante el reconocimiento de su apolipoproteína B-48, de síntesis intestinal. Es así como el tejido hepático realiza un empaquetamiento, se da origen a las VLDL (por sus siglas en inglés: Very-Low-Density Lipoprotein), que en su constitución, incluyen a la lipoproteína Apo-B100, molécula que será responsable de su catabolismo final. En el plasma, las VLDL realizan un intercambio de apo C-II procedente de las HDL y con esta acción se convierten en sustrato para la acción de la LPL de ubicación adipocitaria y muscular principalmente. El intercambio de lípidos en estas lipoproteínas origina remanentes catabólicos denominados IDL (por sus siglas en inglés: Intermediate-density Lipoprotein). Estas IDL carecen de apo C, pero conservan la apo E y B necesarias para ligarse a los receptores E y B:E e internalizarse para su degradación (a nivel hepático). En los estados metabólicos, donde la ingesta de lípidos es excesiva, se produce un incremento de la salida de VLDL hacia la circulación, además de un almacenaje de lípidos provocando esteatosis, razón porque las lipoproteínas incrementan, de forma constante a nivel sérico. (Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida. Bioquímica (Mathews); Lehninger. Principios de Bioquímica).

El catabolismo de esta lipoproteína puede continuar hasta terminar con la hidrólisis completa de triglicéridos, produciendo finalmente LDL (por sus siglas en inglés: Low-Density Lipoprotein). Las LDL, tienen la función de distribuir el colesterol a los

tejidos, acción que realizan mediante la interacción con su receptor revestido de clatrina de ubicación membranal. Este mecanismo es fundamental, ya que sirve como mediador de síntesis y exposición de mas (o menos, según sea el caso) receptores de LDL. Estos almacenamientos excesivos, generan cambios celulares a nivel del tejido endotelial, promoviendo la migración de macrófagos, quien a su vez, generan un estado inflamatorio a través de diversas citocinas. El catabolismo de las LDL continúa hasta que pierde por completo su apo C-II, fenómeno con el que se pierde el reconocimiento de la LPL. Al mismo tiempo, la Lipasa Hepática (LH) comienza a actuar cuando esas lipoproteínas perdieron toda su apo C. (Bioquímica, Mathews, Van Holde, Apling, Cahill, 2013).

Los excedentes o remantes de colesterol (plasmáticos y de tejidos periféricos) son llevados al hígado para su “redistribución-reciclaje” y “eliminación” mediante la formación de sales biliares. Este proceso se denomina con frecuencia “transporte inverso y/o reverso del colesterol” y esta mediado por las HDL, que son las lipoproteínas encargadas de llevar a cabo esta vía de efectos antiaterogénicos. El “redistribución-reciclaje” se produce mediante la incorporación de ese colesterol a las lipoproteínas de síntesis hepática (VLDL), mientras que su “eliminación” se lleva a cabo mediante la síntesis de ácidos biliares. El transporte “reverso” del colesterol se sucede en diversas etapas concomitantes (Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida; Bioquímica (Mathews)).

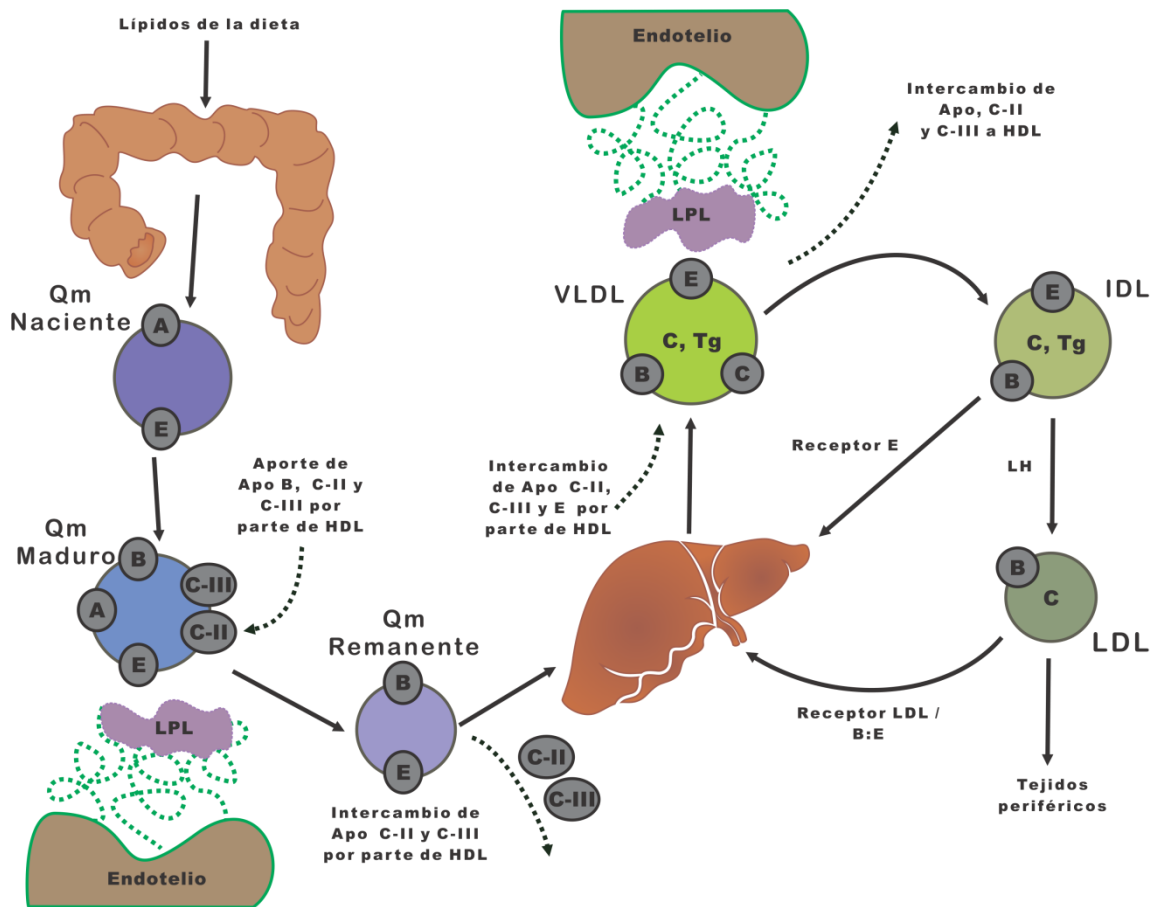


Figura 7. Metabolismo exógeno y endógeno de las lipoproteínas. El transporte de lípidos y colesterol se realiza desde la ingesta y su absorción a través del enterocito así como la formación y recambio del quilomicrón hasta su llegada y catabolismo hepático, fenómeno conocido como metabolismo exógeno de los lípidos. Posterior a esto el empaquetamiento y redistribución a cargo de las VLDL y su respectivo catabolismo (así como la interacción con las HDL, que juegan un papel fundamental en el recambio y devolución al hígado del colesterol) hacia lipoproteínas de mayor densidad, generan deposición lípidica y de colesterol en los distintos tejidos diana. Este proceso se denomina, metabolismo endógeno. Abreviaturas: VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; Apo, apoproteína; LPL, lipoproteína lipasa; LRP, proteína relacionada al receptor de LDL; LH, lipasa hepática.

La primera etapa del transporte consiste en la salida del colesterol libre desde las células periféricas hacia el espacio extracelular, proceso que comienza con la hidrólisis del colesterol esterificado que está almacenado en el citoplasma celular para su posterior translocación hacia la membrana plasmática. El colesterol libre es entonces captado por una fracción naciente de las HDL y considerado el primer

aceptor del colesterol libre. Esta fracción de forma discoidal, denominada pre β 1-HDL, se carga de colesterol libre hasta transformarse en una partícula de mayor tamaño, denominada ahora pre β 2-HDL, que conserva la forma discoidal. (Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida)

Un segundo evento consiste en la esterificación del colesterol libre llevada a cabo por la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT), enzima que a su vez es activada por la apo A-I. La LCAT interactúa inicialmente con la fracción pre β 2-HDL y de esta forma esterifica el colesterol libre presente en su superficie. El colesterol recién esterificado migra hacia el interior de las partículas lipoproteicas debido a su carácter hidrofóbico y así inicia la transformación de la lipoproteína y el complejo resultante se le denomina pre β 3-HDL. Estos cambios continuos provocan que la estructura discoidal se modifique a otra esférica con movilidad α (en la electroforesis), característica de las partículas de HDL maduras. El aumento progresivo del tamaño conduce primero a la formación de la fracción HDL3 y luego a la de HDL2. Además de estos fenómenos, se incorporan colesterol libre, fosfolípidos y apoproteínas que provienen de la lipólisis de los Qm y VLDL ya que durante la acción de la lipoproteína lipasa se van liberando componentes de superficie a la circulación plasmática. (Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida).

Otro evento que repercute en el metabolismo inverso es la transferencia del colesterol esterificado desde las HDL hacia las lipoproteínas con apo B intercambiándolo por triglicéridos. Esta acción es llevada a cabo por la proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP). Como consecuencia de este proceso, se origina una HDL con mayor contenido en triglicéridos, la cual es susceptible a la acción de la lipasa hepática, cuya acción la convierte en partículas más pequeñas y densas, mientras que ciertos componentes de la superficie, como la apo A-I y los fosfolípidos, se liberan al medio, el incremento de VLDL, por los aportes excesivos, y su incremento, condiciona a que el funcionamiento normal de estas HDL se vea modificado, volviéndolas susceptibles al catabolismo (como se explica en seguida) y un ataque mediado por macrófagos nuevamente, que

depositan a la lipoproteína en su medio y posteriormente son llevados al endotelio (Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida).

La última etapa del transporte inverso de colesterol es la fase terminal en la cual el colesterol esterificado es conducido hasta el hígado. E involucra la interacción de las lipoproteínas con apo B, aceptoras del colesterol esterificado proveniente de las HDL, las HDL ricas en colesterol esterificado y que contienen apo E (por los receptores (B:E) hepáticos y la captación selectiva del colesterol esterificado mediado por el receptor SRBI, cuando dicha interacción proteína-receptor se produce a través de la apo A-I.(Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida).

Todos estos eventos y sus desregulaciones conllevan a un daño sistémico progresivo e irreversible, que se ve reflejado en los niveles séricos de lipoproteínas circulantes, ácidos grasos libres, glucosa y mediadores inflamatorios diversos. Las principales vías de actividad metabólica se ven desreguladas y/o saturadas en diversos órganos: la vía glucolítica fomenta la síntesis de glicerolés a nivel hepático, creando mediante el sustrato de esterificación para ácidos grasos libres (provenientes del depósito de VLDL, por acción de LPL) y formación de triglicéridos de resguardo. Cuando el tejido adiposo se satura de lípidos por la vía antes mencionada o por los transportadores de ácidos grasos propiamente, incrementa su actividad lipolítica y redistribuye su AGL a otros tejidos. Los tejidos que sufren este impacto son principalmente el hepático y muscular, aunque también se ha observado este fenómeno en riñón corazón y páncreas; todos ellos comienzan a desarrollar distrofia originada por al aumento de lipogénesis, evento conocido como estatoxis. Los efectos finales de estos cambios, son diversos y adversos, dependiendo la célula en cuestión. Para el adipocito, los efectos concluyen en la caída de transposición vesicular de GLUT-4, liberación continua de ácidos grasos, paro de la regulación/emisión de adipocinas, y a cambios en los residuos de fosforilación de IR, IRS y activación de los proliferadores transcripcionales PPAR-gamma y MAPKK (Poitout & Robertson, 2002).

La falta de translocación de GLUT-4 conduce a la deficiencia para resguardar los sustratos energéticos, provenientes de la dieta. El tejido adiposo blanco, realiza esta función mediante la convergencia del almacén de lípidos por la vía de los transportadores de ácidos grasos y el efecto concomitante con la glucosa, donde la esterificación y acumulación de lípidos tendría un límite, condición asociada a la hipertrofia o atrofia celular característica de este tejido. Estos sucesos condicionarán a una respuesta metabólica anormal, alterando el uso de glucosa para fines energéticos primordialmente y posterior a esto, el de lípidos (Herman & Kahn, 2006).

La hipótesis complementaria para explicar los eventos que ocurren en el desarrollo de la resistencia a la insulina, se representaría mediante la alteración en la producción de adipocinas. Estos cambios serían de naturaleza cuantitativa y cualitativa. Está bien descrito que ciertas adipocinas, regulan la magnitud de efectos insulínicos, por tal razón, se desencadena resistencia a la insulina a nivel local y sistémico (Trayhurn, 2005).

Diversos estudios conforman dichas hipótesis, y de manera global, cuando las rutas metabólicas se saturan en el tejido adiposo, no se distribuyen los metabolitos, de modo efectivo, por lo que se acumulan en los tejidos antes mencionados. Debido a que la función normal de estos tejidos no es la de almacén, y mucho menos de lípidos, se presentan efectos tóxicos por la acumulación (lipotoxicosis). La respuesta de los órganos anexos a la lipotoxicidad, es diversa. El daño lipotóxico depende de varios factores: 1) la magnitud y duración del exceso de nutrientes, 2) capacidad de respuesta por parte de las rutas metabólicas de transporte y almacenamiento de ácidos grasos (además de la diferenciación y maduración de nuevos adipocitos) y 3) disminución de la capacidad oxidativa de cada órgano. La convergencia de estos tres factores determina el daño y progresión que sufrirá cada órgano en el que se presente el fenómeno (Unger, 1995; Unger & Zhou, 2001; Maury & Brichard, 2010; Poitout & Robertson 2002).

Para comprender el mecanismo de toxicidad y daños promovidos por los ácidos grasos, es necesario tener presente que son fenómenos tardíos y posteriores a la alteración de la señalización interna del adipocito. Una vez que la recaptura de glucosa, ya no se presenta de modo eficaz y se promueve a lipólisis de tejido adiposo, se presenta la liberación de ácidos grasos en periodo de postprandio. Este incremento obedece también, a un incremento sérico de lipoproteínas de síntesis endógena. Estos incrementos de ácidos grasos libres, producto de lipólisis, se han descrito, como inductores directo de insulinoresistencia y DM2 de aparición clásica, en pacientes obesos y cursando al mismo tiempo con dislipidemias. Un fenómeno crucial que se presenta al mismo tiempo, es la disminución de la secreción de insulina por parte de las células beta del páncreas a causa del incremento de AGL. (Unguer, 1995; Bergman & Ader, 2000).

Por otra parte, en el tejido muscular (al igual que en el tejido adiposo) el aumento de los ácidos grasos, disminuye la sensibilidad a la insulina y por lo tanto la captación de glucosa por el transporte a través de GLUT-4, la hipótesis comúnmente aceptada establece que esto ocurre por un competencia con los ácidos grasos, evitando de esta forma la unión correcta con el receptor de insulina en los sitios de unión lipídicos, alterando la función normal. Cabe destacar, que actualmente se han propuesto mecanismos que involucran cambios en la composición lipídica de la membrana, con un aumento importante en la concentración intracelular de lípidos como el diacilglicerol (DAG) y las ceramidas. Estos lípidos se presume son los responsables de la activación de sustratos del receptores de insulina (IRS) de la subclase I por PKC principalmente, en residuos de serina, alterando la función normal y promoviendo la vías alternas de efectos mixtos, (fosforilación a niveles de tirosina y treonina), por lo que se ha propuesto a las ceramidas como moléculas clave en la alteración metabólica celular (Aerts *et. al.*, 2007; Strackowski *et. al.*, 2007).

El descubrimiento y comprensión de dichas vías metabólicas, así como sus alteraciones, promueve la aplicación de tratamientos y nueva terapéutica para controlar e intentar revertir los efectos adversos. Los enfoques de tal actividad,

dependerán del estado metabólico del afectado, considerando los perfiles bioquímicos y antropométricos.

ENFOQUES TERAPEUTICOS

El primer paso en el tratamiento de las alteraciones sistémicas, producto de los cambios en las vías mencionadas previamente, es de carácter no farmacológico. Ya que generalmente las causas de las mismas son la sobrealimentación, sedentarismo, y en menor porcentaje, los caracteres genéticos, edad, sexo, etc. En particular, se enfoca a la reducción del peso en sujetos obesos, pero impacta de forma simultánea en la disminución los niveles de glucosa y triglicéridos séricos, resistencia a la insulina y la hipertensión arterial. Dicho tratamiento incluye tres grandes factores: alimentación balanceada, ejercicio físico y hábitos saludables. Estos factores siempre son personalizados acorde al estilo de vida, recordando que estos procesos deben ser constantes y progresivos (American Hearth Association, 2005; Panamerican health organization, 2006; Federacion internacional de diabetes; 2006).

Cuando el sistema posee un grado de daño mayor, debe determinarse si la remisión con tratamiento no farmacológico será más lenta que el avance del daño, de ser así, será necesario recurrir a fármacos con el fin de acelerar el proceso, sin dejar de lado el cambio de alimentación y actividad física. Es en esta instancia, cuando la terapia farmacológica es utilizada y acondicionada a cada paciente. La gama de agentes terapéuticos es variada y para el caso de SM y DM2; que son las alteraciones mayoritarias, la terapia se inicia con antidiabéticos orales. Estos fármacos tienen efectos diversos y podemos identificarlos como antidiabéticos promotores de secreción de insulina (sulfonilureas y meglitinidas), sensibilizantes tisulares a la acción de la misma (biguanidas, tiazolidinedionas e inhibidores de la α -glucosidasa) y análogos proteicos (inhibidores de las dipeptidil-peptidasa IV e incretinas (Asociación latinoamericana de diabetes, 2006; Inzzuchi, 2002; DeFronzo, 1999).

Dependiendo del grado de alteración y cuando se ha evaluado y confirmado la necesidad de terapia farmacológica, los primero fármacos de elección son los sensibilizantes, cuyo uso puede ser individual o en combinación de los mismos, siendo la combinación más recurrente a nivel mundial es entre metformina (que

provoca una disminución de la producción hepática de glucosa, además de aumentar la sensibilidad a la insulina en el músculo) y tiazolidenidonas (que generan un descenso en la resistencia a la insulina en músculo y tejido adiposo, además de la inhibición de la gluconeogénesis hepática, mediante la activación de receptores de la familia de los PPAR); dichos fármacos fueron los primeros sensibilizadores de insulina directos a ser aprobado para su comercialización (DeFronzo, 1999; Afzaal & Wahab, 2002; Asociación latinoamericana de diabetes, 2006)

Este último grupo de fármacos han ganado terreno como tratamiento individual y combinado, pues aporta una reducción de la hiperglucemia además de haber demostrado tener una eficacia comparable o superior a la de metformina, sulfonilureas o inhibidores de la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4) en este sentido; además, a diferencia de las sulfonilureas, estos fármacos no inducen hipoglucemia, permiten un control metabólico sostenible a más largo plazo, y no se asocian con un deterioro precoz de la función beta pancreática, además de mejorar la resistencia a la insulina (Kahn *et. al.*, 2006; Maedler *et. al.*, 2005; Bolen, 2007; Gavin & Bohannon, 2012).

Estos fármacos representan a nuevos antidiabéticos orales que mejoran el control metabólico en pacientes con DM2, teniendo un mecanismo de acción distinto. Este efecto reductor en los niveles de glucosa sérica, es a través de la mejora en la sensibilidad a la insulina. Estos efectos ocurren a nivel de tejido adiposo músculo e hígado (Oakes *et. al.*, 1997; Smith *et. al.*, 2002).

Hasta el momento, se han aprobado tres TZD para el tratamiento de la diabetes: la troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona. Mientras que la rosiglitazona y pioglitazona están ampliamente disponibles, troglitazona ha sido asociada asociado con hepatotoxicidad grave y ahora se ha eliminado de algunos mercados. Estos eventos han sido aislados y de hecho existe evidencia creciente en estudios clínicos que las TZD tienen efectos hipoglucemiantes en pacientes con DM2, en combinación con la reducción en la hiperinsulinemia (Aronoff *et. al.*, 2000; Lebovitz *et. al.*, 2000; Grunberger, 2001).

Además, otros parámetros del síndrome metabólico también han mejorado significativamente, incluyendo alteraciones de lípidos, presión arterial alta, problemas fibrinolíticos así como anomalías del sistema reproductor femenino, como el síndrome de ovario poliquístico (Day, 1998; Gottschling *et al.*, 1997; Ehrmann *et al.*, 1999).

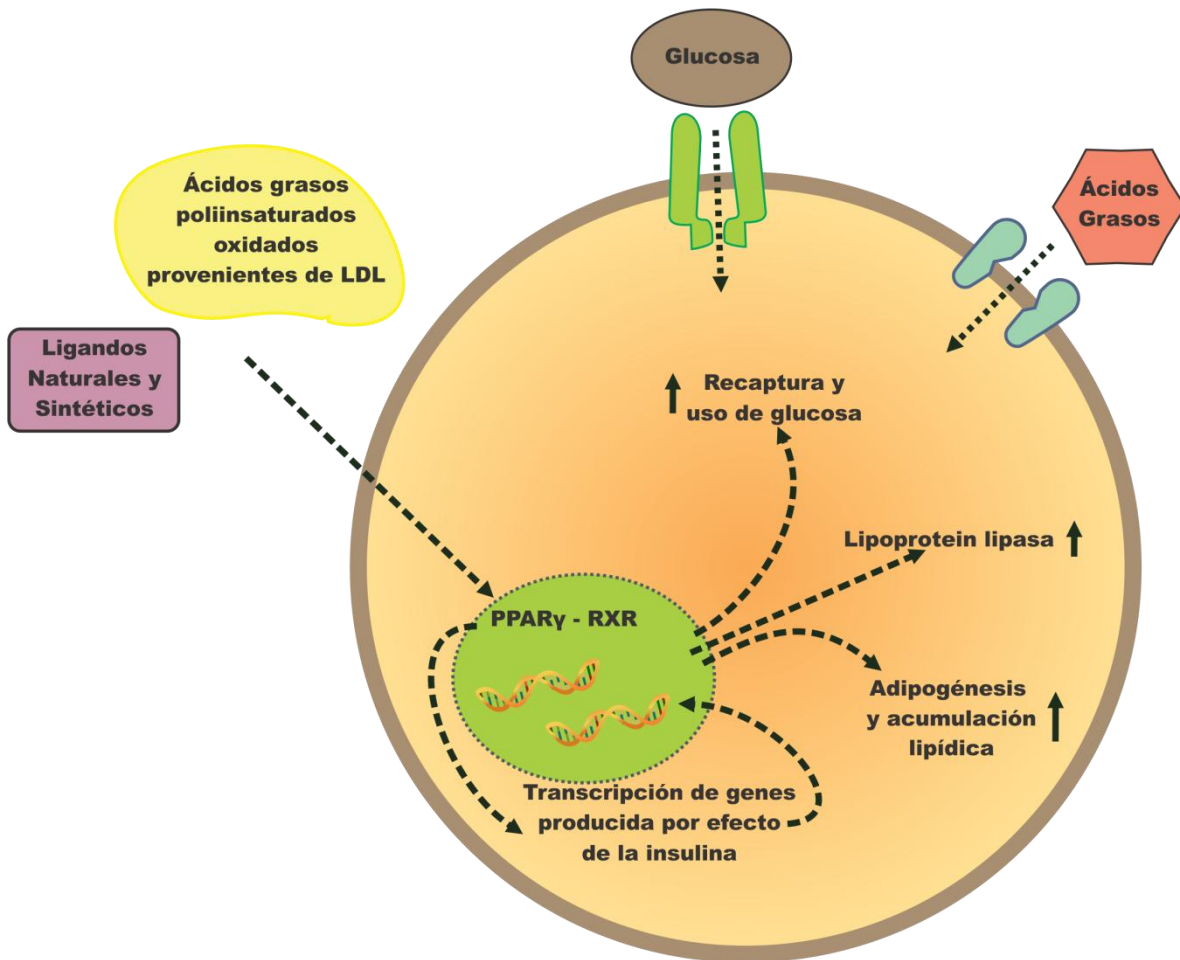


Figura 8. Esquema sencillo de activación de PPAR- γ . La interacción de los depósitos de LDL, ligandos como el ácido retinoico oxidado y algunos fármacos como las tiazolidinedionas, generan la activación de la transcripción de genes mediante PPAR- γ , que en el núcleo celular, induce la acción del promotor de síntesis y la liberación de dos porciones restrictivas, iniciando la transcripción de RNA. Los efectos en la homeostasis de lípidos y glucosa se dan mediante efectos proliferativos. (Adaptado de Hauner, 2002; Morrison & Farmer 2000).

Uno de los primeros resultados para la identificación de la acción molecular de las TZD, fue la presencia de efectos de diferenciación adipocitaria en cultivos de preadipocitos. Posteriormente, se obtuvo evidencia de que las TZD fungían como ligandos directos y de alta afinidad de la isoforma del PPAR- γ , miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción. En las células precursoras de adipocitos humanos, la activación de PPAR- γ es un paso crítico para la inducción del proceso de diferenciación. Los datos experimentales demuestran claramente que las TZD son los desencadenantes más potentes para la diferenciación adiposo conocidos hasta ahora, tanto en roedores y seres humanos (Lehmann, 1995; Adams *et. al.*, 1997; Birgel *et. al.*, 1999).

Estos datos sugerentes, condujeron a tratar de elucidar el posible mecanismo de acción de las TSD, que hasta ahora, se entienden parcialmente. En la célula, PPAR- γ forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR). Cuando se produce la interacción con TZD, ocurre un cambio conformacional en el heterodímero y los complejos de co-represores son desplazados. Esto promueve la unión del complejo PPAR- γ -RXR a los elementos de respuesta de PPAR (PPRE) en los genes diana y la alteración de la transcripción de estos genes. Los PPREs se encuentran en un número de genes implicados en el metabolismo de lípidos y balance de energía, incluyendo los que codifican para la lipoproteína lipasa, proteínas de transporte de ácidos grasos y el transportador de glucosa Glut-4; entre otros (Rosen & Spiegelman, 2000; Forman *et. al.* 1997; Reginato & Lazar, 1999).

La ausencia de estudios de farmacovigilancia, así como el estudio de efectos anexos a las terapias convencionales, a los niveles *in silico*, *in vitro* e *in vivo* hacen necesaria la promoción de nuevos estudios y terapéuticas que conlleven a la búsqueda de nuevos moduladores selectivos de PPAR γ para buscar ventajas sobre las actuales TZD y fármacos en general, con el objetivo de elucidar y conocer las aplicaciones potenciales. Dentro estas diferentes vertientes de estudio encontramos a la etnobiología, que de manera tradicional emplea alternativas terapéuticas naturales, sin embargo no se cuenta con investigación científica que avale su efecto y posible mecanismo de acción para su uso a nivel de prevención, como agentes de enmienda y restablecimiento biológico del sistema. Tal es el caso, de las semillas de cilantro.

SEMILLA DE CILANTRO. USOS Y EFECTOS.

El cilantro, o *Coriandrum sativum* L. (familia *apiaceaea*) es una planta de uso antiguo, nativa de la región mediterránea. El nombre genérico de la planta tiene su origen en el vocablo griego *Koriannon*, que es la combinación de dos vocablos *Koris* (insecto-chinche maloliente) *Annon* (fragante anís), hecho alusivo al olor desagradable que producen sus frutos aun verdes, el cual se vuelve agradable al madurarse, y su nombre específico *sativum* que implica que es una planta cultivada. (Argueta & Cano, 1994).

Dentro de los usos no culinarios que se le da a esta planta, destacan las aplicaciones en la medicina tradicional. El cilantro; tanto la semilla como el tallo y flor, se emplea en el tratamiento de afecciones gastrointestinales y se le indica como antibiótico, antiespasmódico, antipirético, analgésico, eupéptico y carminativo. Además de estos efectos, existen reportes que evidencian la actividad hipotensora, diurética, hipolipidémica, antibacterial, antioxidante y hipoglicémica. Además, trabajos previos en el laboratorio han reportado que el cilantro disminuye los niveles de glucosa séricos en voluntarios hiperglicémios. (Lozoya *et. al.* 1992; Argueta & Cano, 1994; Nadeem *et. al.*, 2013; Kubo *et. al.*, 2004; Chithra & Leelamma, 1997; Naquvi *et. al.*, 2011; Durga *et. al.*, 2013).

De estos efectos las evidencias muestran efectos positivos en la regulación sobre el colesterol generando incremento en la actividad de enzima hepáticas, principalmente la hidroximetilglutaril-CoA-reductasa, hecho que provee la información necesaria para plantear nuevas estrategias y puntos de estudio en los efectos de la administración de cilantro, independientemente de los efectos concernientes a la protección cardiovascular. (Chithra & Leelamma, 1997; Kubo *et. al.*, 2004).

Composición y propiedades de la semilla

La composición de la semilla es mayoritariamente de aceites esenciales y compuestos polifenólicos, y ambos constituyen uno de los grupos de moléculas más numerosos en las plantas. Componen una parte importante de la dieta

humana por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal. Dado que los reportes varían con respecto a cada una de las técnicas utilizadas para determinar dichos elementos. Independientemente de las técnicas, se ha identificada una gama de compuestos predominantes de naturaleza oleosa y polifenólica (Paarakh, 2009; Bhuiyan *et. al.*, 2009; Bakkali *et. al.*, 2007).

El principal componente de la semilla de cilantro en cuanto a sus aceites esenciales es el linalol. Diversos estudios indican que el aceite contiene linalol (entre 60 y 70%) y en promedio 18% de ácidos grasos (entre los que se incluyen oleicos, petroselinico y linolénico). Además de estos componentes, los polifenoles, apigenina, sitosteroles y quercetina han sido identificados como los compuestos aromáticos mayoritarios (Nadeem *et. al.*, 2013; Paarakh, 2009; Bhuiyan *et. al.*, 2009; Bakkali *et. al.*, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, se han descrito diversos efectos de los compuestos en modelos animales y humanos, ha sido poco estudiado y por lo tanto se desconoce en gran parte, respecto al componente linalol, los efectos estudiados solo comprenden efectos sobre actividad antimicrobiana y antimutagénica. Por otra parte, la mayoría de los estudios actuales sobre los efectos biológicos de los compuestos fenólicos se orientan en los mecanismos de absorción, metabolismo y biodisponibilidad pero no en la función fisiológica de los mismos. Este hecho promueve la realización de estudios moleculares para comprenderlos y conocer sus potenciales aplicaciones, permitiendo que los resultados provean información sobre la eficacia de los tratamientos y prevención de ciertas enfermedades, junto con eventual los riesgos derivados de su utilización (Bakkali *et. al.*, 2007; Tarko *et. al.*, 2013).

Dentro de las propiedades más importantes de los compuestos fenólicos, figuran los efectos antioxidantes y quelantes, pues inactivan especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta forma disminuyen la oxidación de LDL circulantes y ayudan a disminuir la inflamación endotelial de los vasos sanguíneos principalmente. Además de estos efectos los flavonoides disminuyen la actividad de enzimas como xantina oxidasa, NADPH oxidasa y lipoxigenasa es decir,

enzimas que incrementan la producción de ROS. Los fenómenos inflamatorios también disminuyen por efectos de dichos compuestos, pues inhiben a enzimas como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), que participa en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico. Esta inhibición de la actividad enzimática tiene como resultado la disminución del leucotrieno B4 y el tromboxano A2, lo que a su vez conduce a la disminución de la inflamación y la agregación plaquetaria (Gross *et. al.*, 2004).

Estudios *in vitro* han demostrado el potencial anti-obesidad mediante el uso de cultivos de la línea celular adipocitaria, indicando una reducción del contenido de triglicéridos, inhibiendo algunos genes de las vías metabólicas claves tales como las Proteínas de Unión a los reguladores del colesterol tipo 1 (SREBP)-1 y Ácido graso sintasa (FAS), y por el aumento de fosforilación de acetil - CoA carboxilasa (ACC), además de la generación de apoptosis y la inhibición de adipogénesis, causadas por disminución en los niveles de expresión de la proteína potenciadora de unión/CAATT (C/EBP α) (Anh *et. al.*, 2008).

Además de estos avances, se sabe que algunos compuestos derivados de la quercetina y que pueden ser encontrados en diversos frutos, han sido probados en cultivos celulares como mioblastos esqueléticos murinos C2C12 y la línea celular de hepatocitos H4IIE. Ellos encontraron que la quercetin-3-O-glucósido y la quercetina aglicona eran los dos más compuestos activos en la captación de glucosa. Este efecto fue la insulina independiente y parece estar mediada por la MAPK, que facilita la translocación de los transportadores GLUT-4. Además se sabe que la quercetina genera un aumento en la expresión de adiponectina en el tejido adiposo blanco y a nivel sérico, hecho independiente de la expresión PPAR γ , hecho que los autores señalan como una mejora de la sensibilidad a la insulina inducida por la quercetina (Wein *et. al.*, 2010; Eid *et. al.*, 2010).

Es el conjunto de estos hechos que le otorgan a la semilla del cilantro un potencial al uso de nuevas alternativas terapéuticas, y a su vez la promoción y estudio de los efectos a fondo para comprender los mecanismos y puntos de inflexión de los

mismos, obteniendo de esta forma, información veraz y segura para adaptar las formas terapéuticas a las distintas patologías conocidas.

RESULTADOS

Obtención del modelo metabólico hiperglicémico

Tabla 2. Proceso de inducción del modelo animal

	15 días post-destete	1 MES		2 MESES	
	Inicial	2018	5008	2018	5008
Glucosa	146.00 ± 4.1	154.9 ± 4.5	174.3 ± 3.6*	144.1 ± 6.8	206.3 ± 4.5*
Triglicéridos	58.4 ± 3.37	135.0 ± 6.5	144.7 ± 6.7	70.0 ± 8.2	91.6 ± 5.5*
Colesterol Total	86.8 ± 1.9	75.2 ± 1.9	72.5 ± 1.4	78.0 ± 2.3	70.0 ± 2.5*
c-HDL	45.7 ± 1.2	49.1 ± 1.7	41.3 ± 1.0*	45.1 ± 2.0	38.5 ± 1.0*

Tabla 2. Los resultados mostrados son el promedio de 10 y 30 experimentos independientes ± EEM para la dietas 2018 y 5008, respectivamente. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica (en adelante designado C) 2018 a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. La dieta 5008 corresponde a una dieta hipercalórica – hiperlipídica, con la cual se indujo alteración en el metabolismo de carbohidratos hasta obtener un valor de glicemia basal ≥ 200 mg/dL; dicha concentración fue obtenido tras los 60 días de exposición.

Se obtuvieron ratas macho de la cepa Long-Evans provenientes del bioterio Claude Bernard de la BUAP de 15 días post-destete, las cuales fueron monitoreadas de sus niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y la fracción lipoproteica de alta densidad de colesterol (**Tabla 2**), con la finalidad de conocer el estado metabólico de los animales. Los sujetos de estudio fueron acondicionados por 15 días con alimento normocalórico 2018. Posteriormente, se conformaron aleatoriamente los grupos de trabajo, conformándose los grupos control y experimental; El grupo control fue alimentado con la dieta 2018 y el grupo experimenta con la dieta 5008 “*ad libitum*”. Se realizó el seguimiento sérico de las condiciones metabólicas a uno y dos meses, hasta observar la desregulación de la glucosa por valores ≤ 200 mg/dL, condición considerada la ideal para el protocolo 2 en donde se trató a los grupos con la semilla de cilantro.

Los resultados mostraron que para el tiempo corte del primer mes, tanto con la dieta 2018 como con la 5008, los animales presentan cambios bioquímicos

interesantes de abordar. Como primer punto existe una tendencia a elevar los niveles de glucosa plasmática en ambas condiciones dietéticas, hecho característico de esta cepa ya que genéticamente presenta una disposición al desarrollo de obesidad y diabetes por lo que se le puede considerar *ob(+)/db(+)*; el análisis estadístico muestra que de manera significativa una dieta hipercalórica – hiperlipídica impactó sobre el valor de glucosa sérica en ayuno incrementando en 12.5% a los 30 días, y lográndose el objetivo de rebasar los 200 mg/dL a los 60 días, al presentar un incremento del 43.2% respecto al control normocalórico 2018. Así mismo, existió un incremento de triglicéridos circulantes desde el destete hasta los tiempos cohorte, en los cuales el primer mes no presentó diferencias significativas entre dietas, sin embargo, el segundo mes existió un incremento del 31% entre el control normocalórico y el grupo expuesto a la dieta 5008. Otro parámetro importante para el diagnóstico de problemas metabólicos es la concentración de colesterol total, en la que el tiempo de destete presenta un descenso importante respecto a la alimentación por alimento 2018 y 5008, en el punto de análisis de un mes no se presentaron diferencias significativas entre los animales expuestos a las dietas, sin embargo a los 60 días existió una diferencia significativa con $p \leq 0.05$ entre grupos de trabajo, en los que la dieta 5008 indujo un descenso del 10.3% del metabolito, hecho asociado primordialmente a un descenso de la fracción HDL, ya que a los 30 días se presentó un decremento significativo del 15.9% y a los 60 días se mantuvo dicha condición en un 14.6%. Por lo que con estos datos el modelo inducido por la dieta 5008, se caracterizó por hiperglicemias de tipo diabético, con dislipidemias asociadas a hipertrigliceridemia con descenso marcado de la fracción de colesterol HDL.

Una vez obtenido el modelo experimental con características de hiperglucemia basal, se continuó con el segundo esquema de trabajo propuesto. Los animales fueron subdivididos en 5 grupos, de 9 individuos cada uno: el primero de ellos fue el grupo control (designado, C), de dieta normocalórica (2018). El segundo grupo de trabajo (designado, L), que continuó expuesto a la dieta hipercalórica hiperlipídica (5008). En tercer grupo (designado, L+S) se basó su alimentación en la ingesta del alimento 5008 mezclado con semilla de cilantro en polvo y

reconstituido. El cuarto grupo (designado, L+G), ingirió alimento 5008 LabDiet y como bebida, agua glucosada al 25% *ad libitum*. Por último, el quinto grupo (designado, L+G+S) cuya alimentación se basó en la ingesta de alimento 5008 mezclado con la semilla de cilantro en polvo y reconstituido más agua glucosada al 25% *ad libitum*. De esta forma, el experimento contempla la dieta normocalórica (grupo C) como control negativo, y a los grupos (L) y (L+G) como controles positivos sin tratamiento, para los grupo (L+S) y (L+G+S) respectivamente, con tratamiento basado en el consumo de semilla de cilantro.

Efecto de las dietas sobre el perfil bioquímico y zoométrico al tiempo de cohorte de 30 días.

En el primer punto de cohorte en la exposición a los diferentes retos dietéticos, se obtuvieron cambios importantes en los parámetros zoométricos y séricos (Tabla 3). En los pesos de los animales no existieron diferencias significativas en comparados con el grupo control; pero si se presentó una disminución del 7.46% en los grupos L+G y L+G+S. La medición de la talla en los distintos grupos se mantuvo sin cambios; sin embargo, la medición del perímetro abdominal exhibió un incremento respecto al grupo (C) del 5.7% por parte de los grupos L y L+G, sin que los grupos L+S y L+G+S presentaran este cambio, además se apreció una disminución del 7.27% del grupo L+S respecto al L. Estos cambios indican que el depósito de los sustratos energético se realizaría de forma prioritaria en el tejido graso abdominal, cuya naturaleza obedece en su mayoría a adipocitos de tipo blanco (principalmente en forma de triglicéridos). Bajo estas condiciones de respuesta celular, los resultados evocan una regulación en el depósito de triglicéridos por parte de la semilla, cuando el aporte calórico está dado por lípidos. Para tener un mejor acercamiento al panorama de la distribución de los metabolitos se determinó el índice de Lee; que corresponde al porcentaje de grasa corporal, el cual indicó que solo el grupo L+G presento un incremento de 3.1% respecto grupo (C). A su vez, el grupo L+S+G exhibió una disminución del 2% con respecto a este mismo grupo L+G. Esta información sugiere que el aporte de glucosa al sistema, estimula mecanismos distintos y/o complementarios para distribución y resguardo energético. Observando que la ingesta de semilla, ejerce un efecto regulador sistémico en condiciones de aporte mixto. La medición del Índice de masa corporal no registro cambios estadísticamente significativos respecto al control normocalórico, ni entre los grupos L y L+S o L+G y L+G+S.

Tabla 3. Resultados bioquímicos a 30 días de exposición con diferentes condiciones dietéticas con y sin consumo de *Coriandrum sativum*.

Determinación	(C) n=9	(L) n=9	(L+S) n=9	(L+G) n=9	(L+G+S) n=9
Peso	377.3 ± 9.6	383.2 ± 13.8	363.3 ± 6.4	398.0 ± 7.7	368.3 ± 3.5 ‡
Talla	24.6 ± 0.2	24.12 ± 0.12	24.16 ± 0.16	24.25 ± 0.14	24.16 ± 0.16
Perímetro Abdominal	15.6 ± 0.2	16.5 ± 0.20 *	15.3 ± 0.16 ‡	16.6 ± 0.14 *	16.3 ± 0.44
Índice de Lee	28.8 ± 0.2	29.50 ± 0.3	28.9 ± 0.1	29.7 ± 0.1 *	29.1 ± 0.0 ‡
IMC	0.62 ± 0.01	0.66 ± 0.02	0.61 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.63 ± 0.01
Glucosa	104.7 ± 1.0	117.0 ± 3.4 *	127 ± 3.4 *	154 ± 5.5 *	131.7 ± 4.8 * ‡
Triglicéridos	59.3 ± 2.9	64.8 ± 6.2	62.4 ± 1.2	128 ± 4.2 *	135.7 ± 7.8 *
Colesterol Total	65.75 ± 2.2	59 ± 2.2	60.6 ± 2.0	59 ± 2.6	58.7 ± 2.0 *
c-HDL	32.8 ± 0.3	31.2 ± 0.8	30.1 ± 0.8 *	28.5 ± 0.9 *	27.4 ± 1.2*

Tabla 3. Los resultados mostrados son el promedio de 9 experimentos independientes ± EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Respecto de los niveles de glucosa sérica basal, los grupos L y L+S presentaron incrementos significativos de 11.7 % y 21.3% respecto al grupo (C); sin embargo, no se presentaron cambios entre ellos. Para los grupos L+G y L+G+S la tendencia fue a la alza con un 47.1% y 25.8 % respectivamente, existiendo a su vez una diferencia significativa entre ambos grupos correspondiente a un 14.8 % menor por parte del grupo L+G+S respecto a su control sin semilla, por lo que el consumo de semilla no logra mantener la glicemia. Por su parte, los valores de triglicéridos

registraron diferencias respecto al grupo (C) con incrementos de 115.8 % para el grupo L+G y de 128.8 % para el grupo L+G+S; sin diferencias entre sí.

Los grupos L y L+S no mostraron diferencias entre sí, ni respecto al grupo (C). Estos cambios muestran que la semilla no ejerce efectos regulatorios en el comportamiento de triglicéridos, independiente de si el estímulo calórico es de origen lipídico, o lipídico-glúcido. En la medición de la fracción HDL-c; comparando con el grupo (C), los grupos L+S, L+G y L+G+S evidenciaron caídas del 8.2%, 13.1% y 16.5% respectivamente, destacando que entre L y L+S así como L+G y L+G+S no se presentaron diferencias. Sugiriendo que es la misma dieta que condiciona al resguardo lipídico, probablemente sobre tejido adiposo, por lo que fue necesario abordar dicho aspecto mediante histología.

Figura 9. Histología de tejido adiposo retroventral (TARV) al tiempo de cohorte de 30 días.

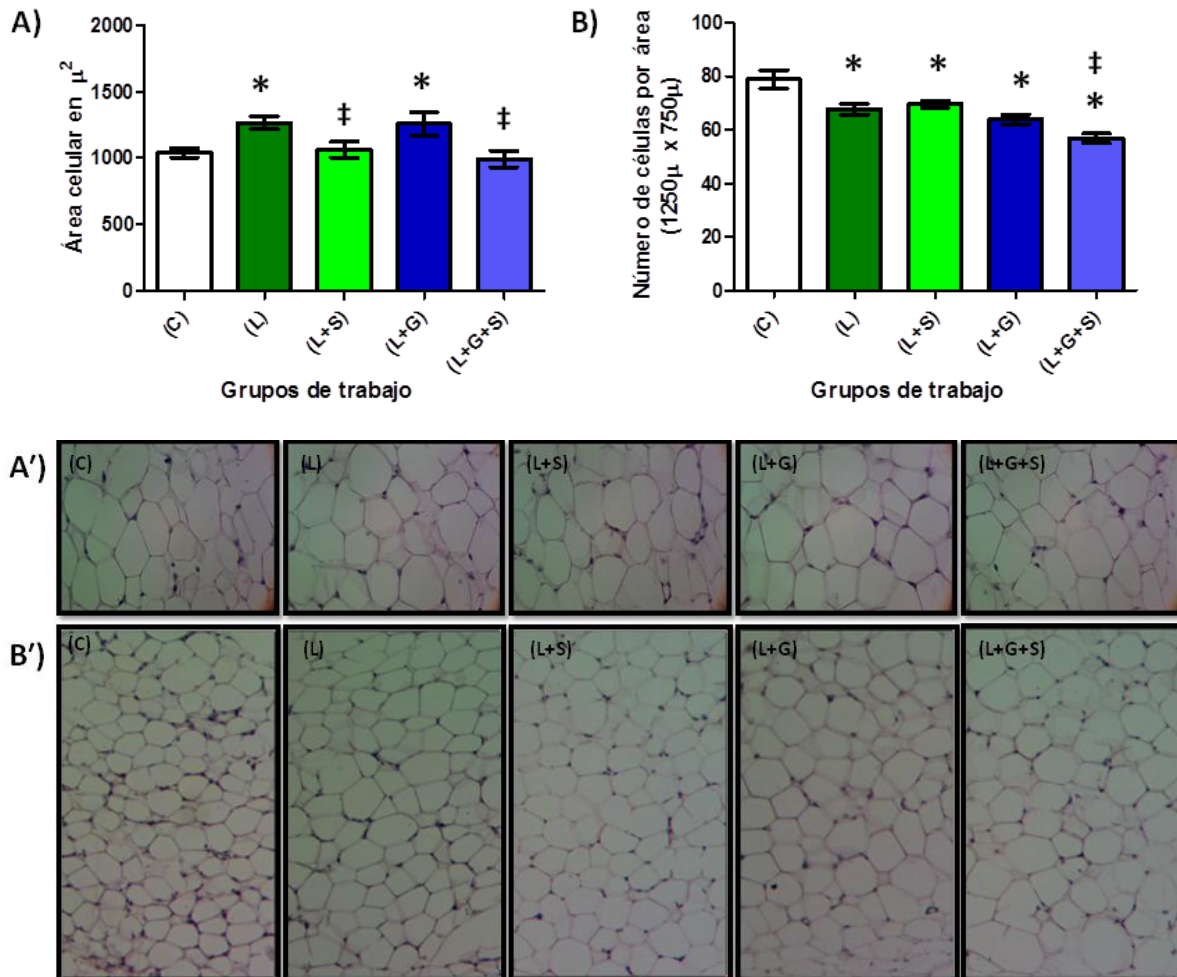


Figura 9. A) Indica la media del área celular determinada a 500 células, a su vez A') presenta las correspondientes imágenes de la tinción de PAS. **B)** Muestra los resultados del promedio de 70 microfotografías contabilizadas (en un área correspondiente a $1250 \mu \times 750 \mu$) y **B')** muestra las imágenes que pertenecen a este análisis. Se muestra \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico *t* de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico *t* de Student.

Efecto de las dietas sobre la histología adipocitaria al tiempo de cohorte de 30 días.

Los cambios histológicos evidenciados mediante los cortes y tinción de PAS, se presentan con los gráficos de números de células por área y el área promedio de cada célula. En el gráfico 9A) solo los grupos L y L+G presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, en un incremento del 22% y 21% respectivamente. A su vez, el grupo L+S registro un descenso del 16% comparado con el grupo L, mientras que el grupo L+G+S presento una media celular promedio inferior del 20.9% comparado con el grupo L+G. Es notorio que los sujetos que no complementaron su alimentación con semilla de cilantro, registraron un incremento de tamaño, hecho conocido como hipertrofia celular. Sin embargo, cabe de resaltar que los grupos complementados con la semilla no muestran diferencias significativas en relación al control normocalórico. Así mismo, el efecto inhibitor del desarrollo hipertrófico se presenta aún en condiciones de ingesta hipercalórica lipídica y lipídica-glúcida.

En relación a los cambios tróficos, el gráfico 9B), muestra los descensos en el número de células respecto al grupo (C) por parte de todos los grupos de trabajo, que obedecen a 14% para el grupo L, 11.8 % del grupo L+S (sin presentarse diferencia entre ellos), 18.9% para el grupo L+G y por ultimo un descenso de 27.9% por parte del grupo L+G+S; existiendo una diferencia estadística significativa entre estos dos últimos grupos correspondiente a 11.1%. Este hecho corrobora el efecto hipertrófico generado por las dietas estimulantes; no obstante, el estudio permite conocer además; de manera indirecta, si existe una correlación con un posible desarrollo hiperplásico del tejido. Los cambios observados sugieren, que la ingesta de semilla no genera cambios en el número celular cuando el aporte calórico es solo lipídico, sin embargo el inductor glucídico sugiere un estímulo hipertrófico e hiperplásico. Los fenómenos observados por la dinámica morfométrica, podrían causar cambios en la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4). Por lo que se realizó una inmunofluorescencia para la proteína y poner de manifiesto su comportamiento en los diferentes grupos de trabajo.

Figura 10. Inmunoreactividad para GLUT-4 en TARV al tiempo de cohorte de 30 días.

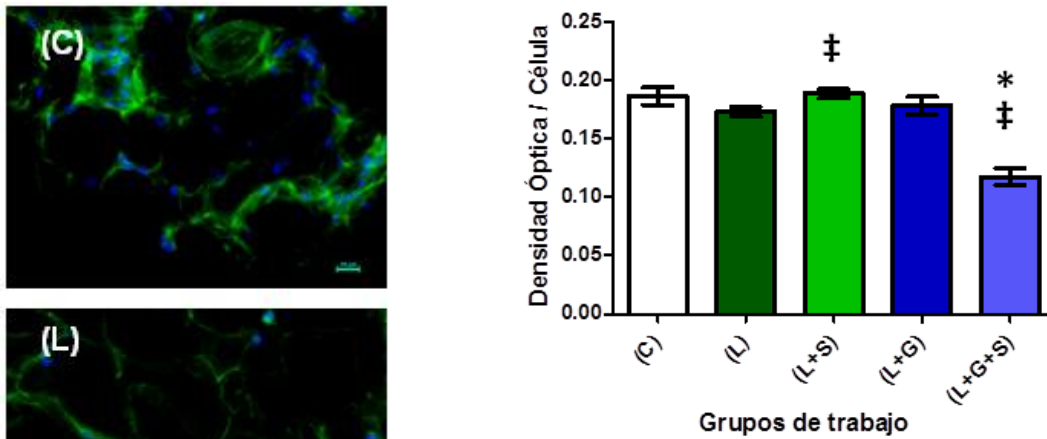


Figura 10. Inmunoreactividad para GLUT-4. La expresión de la proteína se determina mediante la intensidad de marca fluorescente de color verde, como se muestra en las microfotografías correspondientes a cada grupo de trabajo. Los resultados mostrados son el promedio de 3 pruebas independientes expresando \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Los resultados obtenidos del inmunomarcaje de la proteína GLUT-4 indicaron que el grupo L, L+S así como el grupo L+G no presentaron cambios significativos respecto al grupo C. Sin embargo, el grupo L+G+S presentó un descenso del 37% respecto al transportador, considerando que este evento podría condicionar al sistema a mantener niveles séricos de glucosa (y subsecuentemente de triglicéridos) por más tiempo en circulación, lo que incide sobre rutas de biotransformación a triglicéridos, y conduciendo al tejido adiposo a un

sobre resguardo.

Mientras que el grupo L+S mostro diferencia significativa respecto al grupo L elevando la expresion un 9%, en contraste, el grupo L+G+S exhibio una disminuci3n del 34% con respecto a su control positivo L+G, lo que pone en evidencia que ante un sobre est3mulo dado por los carbohidratos la ingesta de semilla est3 asociada a una depleci3n en la captura de glucosa, probablemente asociada a condiciones celulares hiperpl3sicos.

En este sentido, fueron cuantificados los triglic3ridos directamente del TARV, el gr3fico 11A evidencia la cantidad de triglic3ridos por cada 100 miligramos de tejido. As3 mismo, se presenta los cortes histol3gicos teñidos con la t3cnica de rojo oleoso, evidenciando que el contenido celular se encuentra en forma de triglic3ridos.

Figura 11. Triglicéridos en TARV al tiempo de cohorte de 30 días.

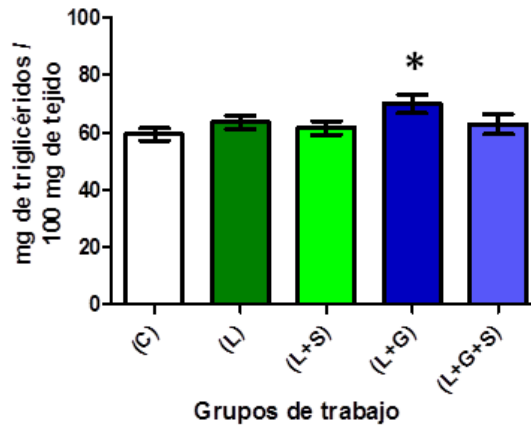
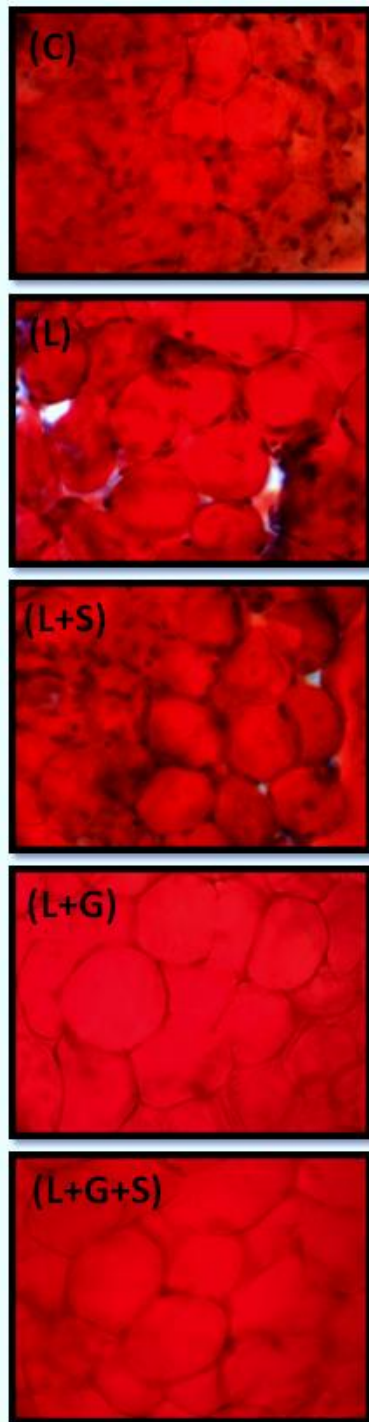


Figura 11. Los resultados del grafico muestran el contenido de triglicéridos por cada 100 mg de tejido. A su vez, se muestran los cortes de tejido realizados a -40°C (permitiendo conservar su contenido en integridad celular) y teñidos con rojo O, tinción destinada a evidenciar el enlace estérico de los triglicéridos. Los resultados son el promedio de 3 pruebas independientes expresando \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

La cuantificación de triglicéridos en TARV se muestra en la Figura 11, en donde se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa solo en el grupo L+G, correspondiente al 18.63%, con respecto al grupo (C). Mientras el resto de los grupos permanecen sin cambio. Este efecto confirma la presencia de un resguardo lipídico mayor en condiciones de aporte calorico por lípidos y carbohidratos. Así mismo el consumo de semilla de cilantro confirmó que a pesar del aporte lipídico y

adicionalmente de glúcidos a este tiempo de cohorte, en los grupos de trabajo (L+S y L+G+S) no se observaron diferencias respecto al control, por lo que se realizó el analisis de los genes que regulan las vías metabólicas asociadas

Figura 12. Panel de Resultados de RT-PCR a 30 días de exposición.

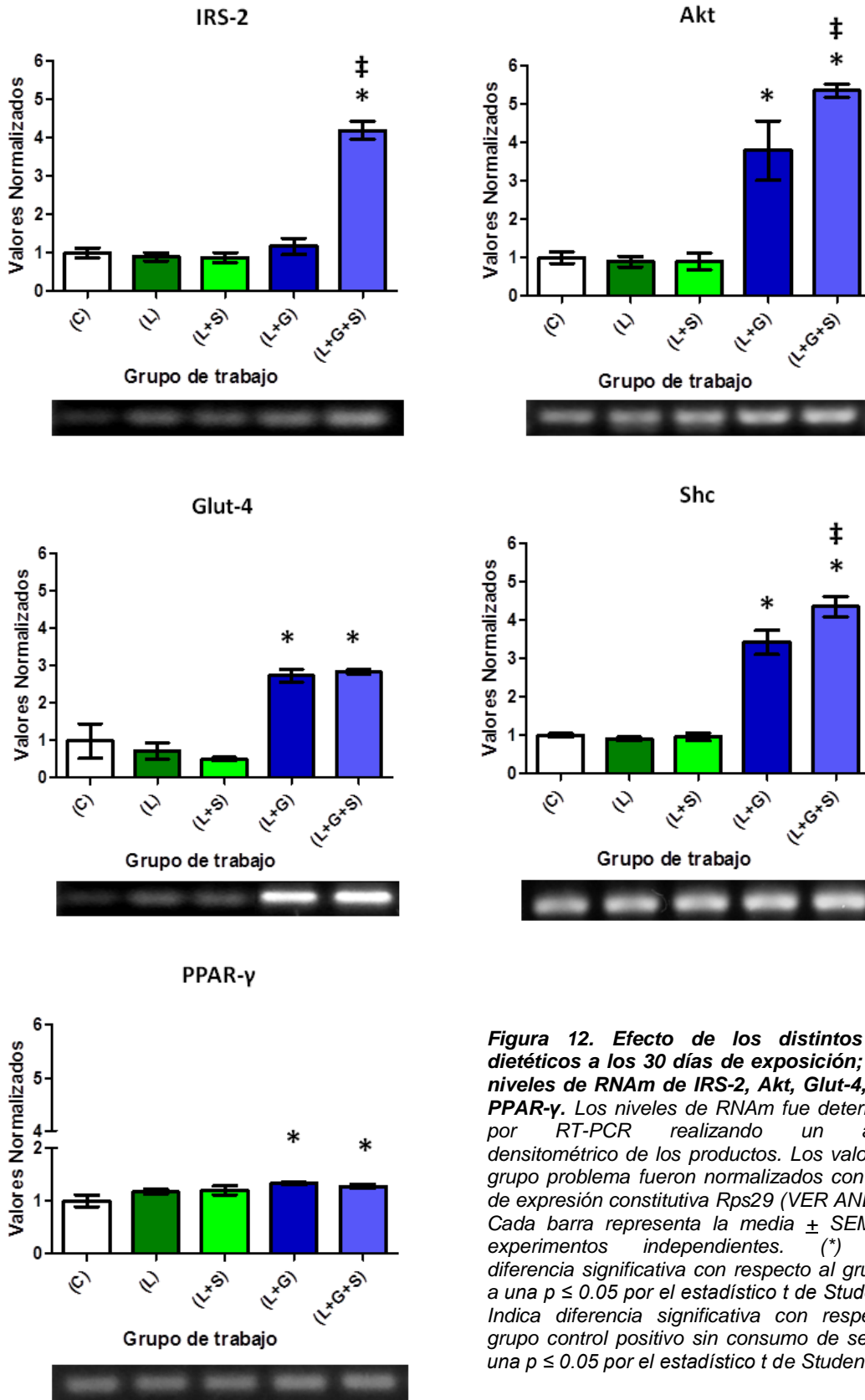


Figura 12. Efecto de los distintos retos dietéticos a los 30 días de exposición; en los niveles de RNAm de IRS-2, Akt, Glut-4, Shc y PPAR-γ. Los niveles de RNAm fue determinado por RT-PCR realizando un análisis densitométrico de los productos. Los valores del grupo problema fueron normalizados con el gen de expresión constitutiva Rps29 (VER ANEXOS). Cada barra representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

A los 30 días de haber iniciado el tratamiento los cambios en las dietas son los siguientes. Los grupos L y L+S no registraron cambios en la expresión de los RNAm de los codificantes analizados (IRS-2, Akt, GLUT-4, Shc y PPAR- γ) respecto al grupo (C); así mismo, entre ellos no se observaron diferencias significativas. Esta evidencia refiere a que el estímulo lipídico no impacta de forma importante en la respuesta genética celular (cuya regulación es más precisa) y los mecanismos celulares de funcionamiento normal son suficientes para compensar las exigencias metabólicas de este reto dietético, independiente a la ingesta de semilla.

En contraste, los grupos L+G y L+G+S presentaron cambios importantes respecto al grupo (C). El grupo L+G mostró una tendencia no significativa a incrementarse en cuanto a la expresión de IRS-2, la regulación positiva “río abajo” correspondiente a un incremento del 370% para Akt y 179% para GLUT-4 sobre la vía de señalización normal. Sobre la activación de la vía proliferativa, se presentó un incremento de 245% para el codificante de Shc y 34% para el RNAm de PPAR- γ .

La respuesta del grupo L+G+S presentó una regulación positiva en todos los RNAm estudiados. El primer incremento corresponde al 323% en IRS-2, aumento del 530% en el consecutivo Akt y por último un aumento de 190% para GLUT-4. El complemento de los genes analizados muestra una elevación del 336% para Shc y 28% para el PPAR- γ . De esta forma se observa que el consumo exógeno de glucosa es un fuerte estimulante a nivel génico de vías compensatorias en el tejido adiposo. Concerniente al efecto producido por la semilla con respecto a la dieta L+G; el grupo L+G+S demuestra que la respuesta celular se amplifica a nivel de RNAm, iniciando con el aumento del IRS-2 correspondiente a 261%. Los codificantes sucesivos muestran una condición de sobre-expresión correspondiente a 45% en Akt (sin impactar posteriormente en el mensajero de GLUT-4 que corresponde al codificante final de esta vía de señalización) y un aumento de 27% para Shc, cuyo incremento tampoco impacta sobre el RNAm del

efector final PPAR- γ . Estos cambios muestran un efecto de regulación positiva sobre los mensajeros de las vías de respuesta por parte de la semilla de cilantro (únicamente estímulos de glucosa exógena), y se observa que a pesar del incremento en el mensajero de GLUT-4, la hiperplasia asociada impide la expresión de la proteína manteniendo una tendencia negativa con respecto al grupo L+G. Por otro lado, el incremento en el mensajero de Shc confirma cambios en los requerimientos celulares ante la hipertrofia celular causado por la ingesta de la semilla de cilantro.

Efecto de las dietas sobre el perfil bioquímico, histológico y de expresión de RNAm a tiempo de cohorte de 60 días.

Tabla 4. Resultados bioquímicos a 60 días de exposición con diferentes condiciones dietéticas con y sin consumo de *Coriandrum sativum*.

Determinación	(C) n=6	(L) n=6	(L+S) n=6	(L+G) n=6	(L+G+S) n=6
Peso	399.5 ± 7.2	419.0 ± 3.2 *	396.0 ± 2.3	486.0 ± 19 *	380 ± 11.0 ‡
Talla	25.1 ± 0.1	25.2 ± 0.2	25.0 ± 0.2	25.2 ± 0.2	24.5 ± 0.2
Perímetro Abdominal	15.7 ± 0.2	17.0 ± 0.3 *	16.2 ± 0.3	18.5 ± 0.3 *	16.5 ± 0.2 ‡
Índice de Lee	28.7 ± 0.09	29.1 ± 0.16	28.8 ± 0.29	30.6 ± 0.45 *	29.0 ± 0.1 * ‡
IMC	0.63 ± 0.01	0.66 ± 0.01*	0.63 ± 0.01 ‡	0.73 ± 0.02*	0.64 ± 0.0 ‡
Glucosa	112.5 ± 3.5	142.3 ± 6.9*	121.0 ± 5.3	162.7 ± 7.3*	146.0 ± 6.2*
Triglicéridos	68.8 ± 4.4	104.3 ± 7.5*	58.7 ± 3.0 ‡	58.0 ± 4.2	81.0 ± 7.8‡
Colesterol Total	68.0 ± 1.5	60.7 ± 4.1	64.7 ± 3.7	60.0 ± 3.6	62.3 ± 3.2
c-HDL	32.6 ± 0.2	27.0 ± 0.8*	28.0 ± 1.0 *	23.6 ± 0.8*	24.2 ± 1.0 *

Tabla 4. Los resultados mostrados son el promedio de 6 experimentos independientes ± EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico *t* de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico *t* de Student.

Tras 60 días de exposición a las dietas, los resultados de las determinaciones fueron los siguientes. El peso medio de los animales incrementó en 5% y 21.6% en los grupos L y L+G respectivamente comparados con el grupo (C). Mientras que entre los grupos L y L+S no se presentaron cambios, el grupo L+G+S registro un descenso en comparación al grupo L+G proporcional al 21.8%. A este punto de cohorte, la talla promedio de los animales permaneció sin cambios respecto el

grupo (C). Entre los grupos L y L+S así como L+G y L+G+S, no se presentaron diferencias.

En relación al perímetro abdominal, los cambios significativos respecto al grupo (C) fueron evidentes en el grupo L mostrando un incremento del 8.2%, así como el grupo L+G del 17.8%. A su vez, el grupo L+G+S indicó un nivel del 10.8% menos respecto al grupo L+G; entre los grupo L y L+S no se presentaron cambios significativos. La modificación del perímetro abdominal muestra que el aporte lipídico genera un resguardo y desarrollo del tejido adiposo blanco principalmente, sin embargo, esta acumulación es mayor si el estímulo proviene de lípidos y glucosa. De igual manera, se observa que a pesar del estímulo crónico, el complemento de la dieta con semilla de cilantro permite mantener sin cambios esta determinación en comparación con el grupo (C).

Posteriormente se realizó la determinación del índice de Lee, en la que solo se observó un incremento del 6.62% en el grupo L+G, al igual que un incremento del 1% en el grupo L+G+S comparados con el grupo (C) al tiempo en que entre el grupo L y L+S no se presentaron cambios; sin embargo, entre L+G y L+G+S se presentó un descenso de 5.26%. Las mediciones correspondientes al IMC reportaron incremento significativo respecto al grupo (C), en los grupos L y L+G con 4.7% y 15.7% respectivamente. Respecto al grupo L, el grupo L+S registro una baja del 4.5%, así mismo entre el grupo L+G y L+G+S, se presentó un 13.5% menos del parámetro. De esta forma, los resultados apoyan la hipótesis del resguardo energético a nivel localizado y sistémico en forma de lípidos por parte del tejido adiposo. Y a su vez, que la semilla de cilantro promueve un estado de mayor dinamismo en el intercambio lipídico y glúcido.

Los valores de glucosa séricos expuestos respecto al grupo (C) muestran un incremento significativo del 26.4% en el grupo L, mientras el grupo L+S no presento cambios significativos. El grupo L+G indica una elevación del 44.6% al tiempo que el grupo L+G+S mostró incremento significativo del 29.8%. Estos incrementos indican directamente que el estado desregulatorio permanece en presencia de estímulo lipídico y lipídico-glúcido. Por otra parte, los grupos L y L+S,

al igual que los grupos L+G y L+G+S no reportaron diferencias significativas entre sí, aunque se aprecia una tendencia a disminuir el nivel de glucosa por parte de los grupos que complementan la dieta con semilla de cilantro.

En cuanto a la determinación de triglicéridos séricos, solo el grupo L arrojó un incremento significativo del 51.6% respecto al grupo (C), el resto de los grupos se mantuvo sin diferencias significativas. Entre los grupos L y L+S se presentó una diferencia de 43.7% menor por parte del grupo L. No obstante los grupos L+G y L+G+S presentaron un incremento por parte de este último correspondiente al 39%. El comportamiento de los triglicéridos circulantes sólo se modifica de forma importante en el grupo de ingesta lipídica, lo que evidencia un mecanismo celular que compensa con resguardo y que presenta una amplitud en su dinamismo ya que no actúa de la misma manera con la adición de glucosa, independiente a la ingesta de semilla.

Otro parámetro determinado fue el colesterol total cuyos resultados no tuvieron diferencias significativas. Sin embargo, en la evaluación de los niveles de c-HDL mostró un descenso en la concentración sérica de la lipoproteína. El grupo L reportó una caída del 17.2%, al igual que el grupo L+S que refirió un decremento significativo del 14.1%. Entre estos dos últimos grupos no se encontraron diferencias. El grupo L+G reportó una caída significativa del 27.6% y el último grupo L+G+S indicó una baja de 25.8%; aunque ambos grupos permanecieron sin diferencias entre ellos. Este comportamiento indica el cambio que se produce por la exposición calórica excesiva, modificando el metabolismo, síntesis y transporte del colesterol, sin que exista una mejora significativa en la regulación metabólica por parte de la semilla de cilantro.

Figura 13. Histología de TARV en los distintos grupos al tiempo de cohorte de 60 días

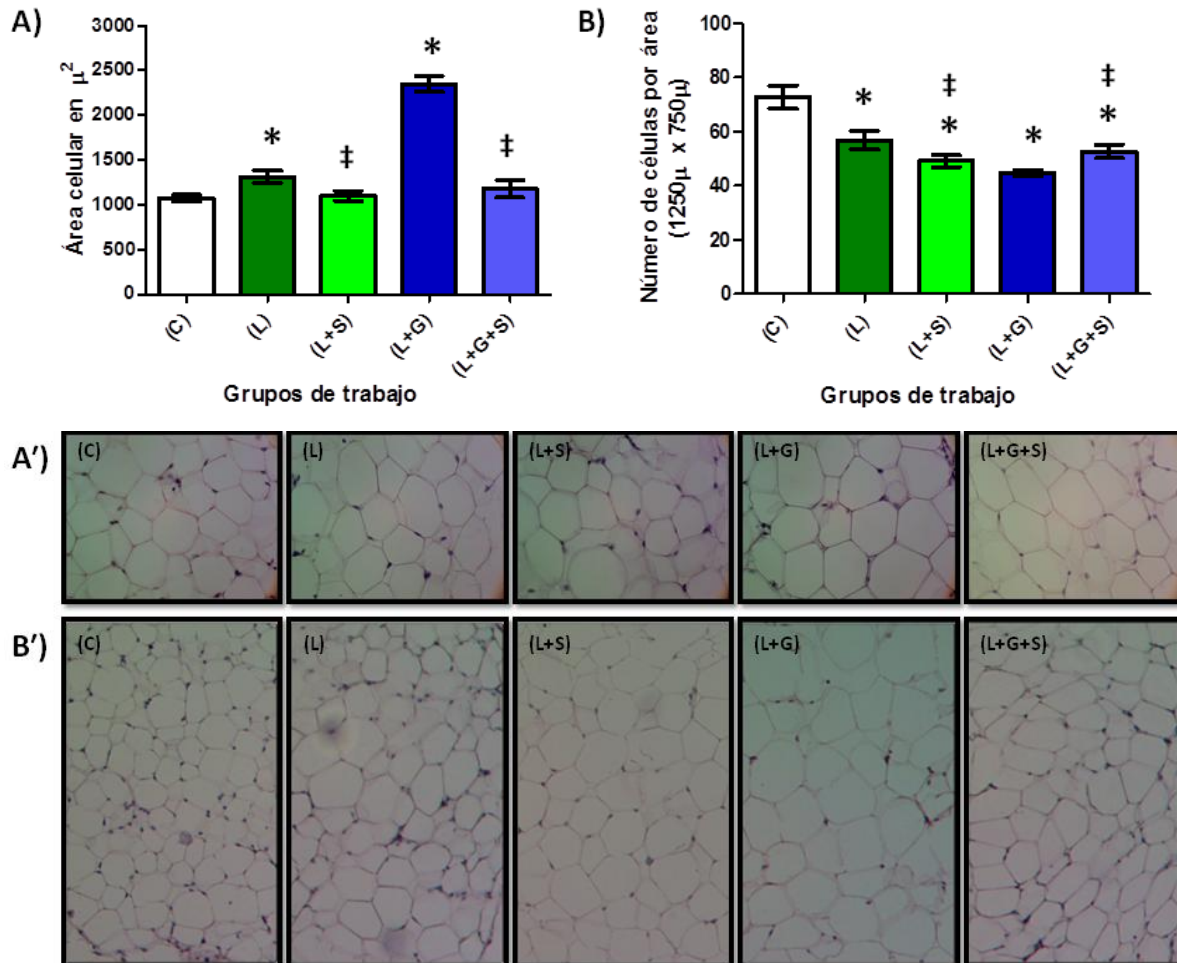


Figura 13. A) Indica la media del área celular determinada a 500 células, a su vez **A')** presenta las correspondientes imágenes de la tinción de PAS. **B)** Muestra los resultados del promedio de 70 microfotografías contabilizadas (en un área correspondiente a $1250 \mu \times 750 \mu$) y **B')** muestra las imágenes que pertenecen a este análisis. Se muestra \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico *t* de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico *t* de Student.

El impacto metabólico reflejado en la histología después de 60 días de exposición a las dietas experimentales, se muestra en el gráfico 14B) el cual se observa la tendencia a la baja en los niveles del número de células con respecto al grupo (C), que corresponden a 21.8%, 32.4%, 38.6% y 27.6%; para los grupo L, L+S, L+G y L+G+S respectivamente. Entre los grupos L y L+S, éste último presentó un descenso del 13.5%; al tiempo en que el grupo L+G+S indicó un nivel mayor del 17.8% respecto a su grupo control L+G. El comportamiento tisular presente en este análisis, indica un crecimiento celular provocado por las dietas estimulantes, que es independiente del origen de la misma y del consumo de la semilla de cilantro.

Dicho crecimiento es uniforme y significativo respecto al grupo (C). Sin embargo, es interesante que para el grupo L+S el número de células resulte ser inferior respecto al grupo L, pues la sugerencia de un estímulo hipertrófico debido a la ingesta de semilla no se observó con anterioridad. Si bien este efecto es importante; el mayor impacto de la dietas se refleja entre los grupos L+G y L+G+S, donde éste último demostró mantener un conteo celular elevado; un cambio que no se había registrado anteriormente. Este cambio evoca la aparición de dos posibles situaciones adaptativas y/o compensadoras: desarrollo de hiperplasia.

En el gráfico 14A) se aprecia que solo los grupos L y L+G tuvieron incrementos significativos respecto al grupo (C) correspondientes al 21.7 y 118.4% respectivamente. A su vez, el área celular promedio del grupo L+S presenta un tamaño 16% inferior respecto al grupo L; mientras el grupo L+G+S muestra una media celular inferior en un 50.1%, respecto a su grupo control positivo. La hipertrofia presentada en este punto de los tratamientos evidencia el resguardo lipídico (que se demuestra posteriormente con la tinción de rojo oleoso y la cuantificación de lípidos) generado por la ingesta lipídica y potenciada aún más cuando se acompaña de la carga glúcida. No obstante este comportamiento se ve modificado y se evita el desarrollo de hipertrofia en los grupos que ingieren la semilla de cilantro, siendo el efecto más evidente el producido en la dieta L+G+S, disminuyendo el impacto hasta condiciones similares a las normales.

Figura 14. Inmunoreactividad de GLUT-4 en TARV al tiempo de cohorte de 60 días.

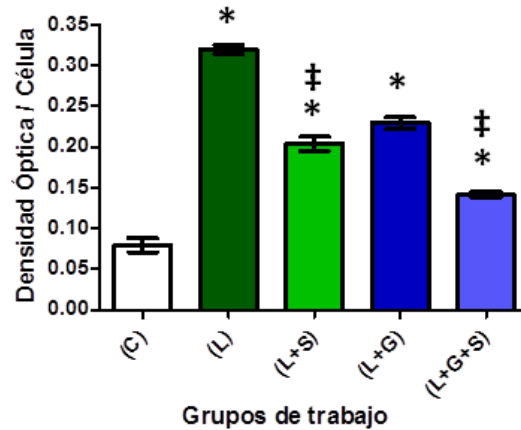
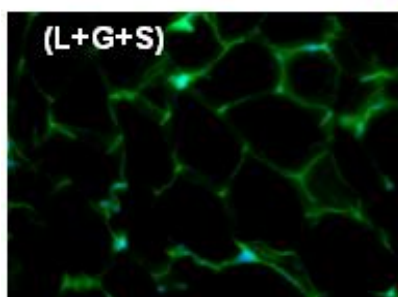
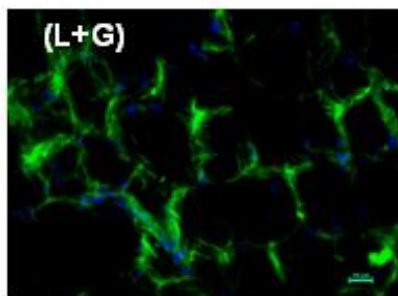
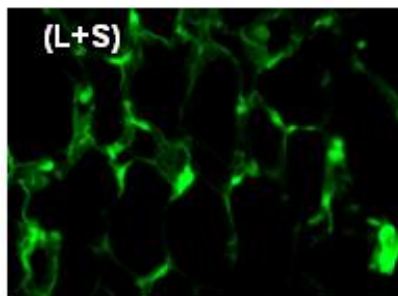
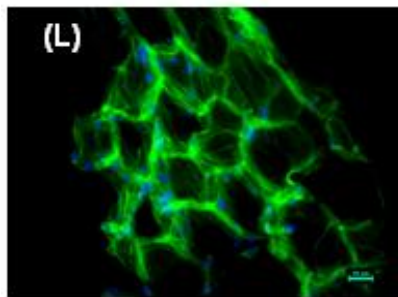
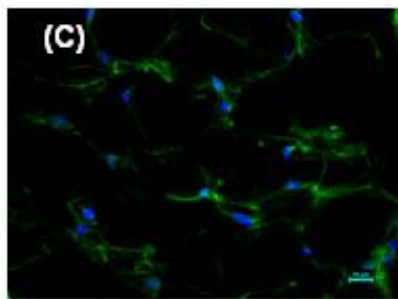


Figura 14. Inmunoreactividad para GLUT-4. La expresión de la proteína se determina mediante la intensidad de marca fluorescente de color verde, como se muestra en las microfotografías correspondientes a cada grupo de trabajo. Los resultados mostrados son el promedio de 3 pruebas independientes expresando \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (†) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

El análisis de los resultados obtenidos en el inmunomarcaje de la proteína GLUT-4 indicaron una elevación en los niveles de expresión proteica para todos los grupos de trabajo; de la siguiente manera: 300% del grupo L, 156% para el grupo L+S, 188% en el grupo L+G y por último 77% para el grupo L+G+S. Este comportamiento, aunado a los cambios tróficos sugiere mecanismos compensadores por parte de la célula, que pueden ser originados ante la identificación del incremento sérico de glucosa. En contraste, El grupo L+S muestra una expresión inferior en 36% respecto al grupo L; mientras el grupo L+G+S indicó un declive del 38% respecto al grupo

L+G, situación que invita a considerar efectos parcialmente reguladores por el consumo de la semilla de cilantro.

Figura 15. Triglicéridos en TARV al tiempo de cohorte de 60 días.

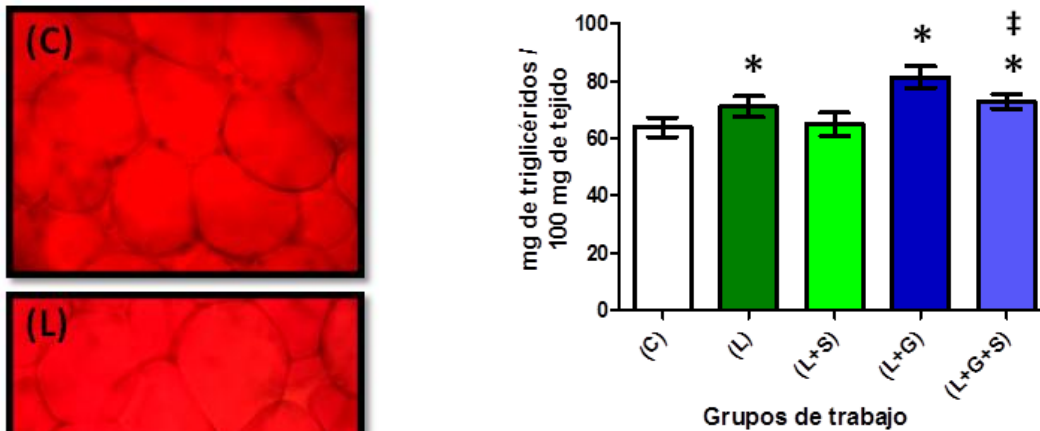


Figura 15. Los resultados del gráfico muestran el contenido de triglicéridos por cada 100 mg de tejido. A su vez, en la columna de la izquierda se presentan los cortes de tejido realizados a -40°C (permitiendo conservar su contenido en integridad celular) y teñidos con rojo O, tinción destinada a evidenciar el enlace estérico de los triglicéridos. Los resultados mostrados son el promedio de 3 pruebas independientes expresando \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de triglicéridos (gráfico 15), expresan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo (C), por parte de los grupos L, L+G y L+S+G, que correspondieron al 13.5%, 30.6% y 13.2% respectivamente. Situación que apoya la teoría de resguardo lipídico y glúcido, esto último evidenciada por el comportamiento de GLUT-4. Sin embargo, es de resaltar que los grupos de consumo de semilla de cilantro presentan mejoras respecto de sus controles positivos, siendo el grupo L+G+S el de mejor comportamiento.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de triglicéridos (gráfico 15), expresan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo (C), por parte de los grupos L, L+G y L+S+G, que correspondieron al 13.5%, 30.6% y 13.2% respectivamente. Situación que apoya la teoría de resguardo lipídico y glúcido, esto último evidenciada por el comportamiento de GLUT-4. Sin embargo, es de resaltar que los grupos de consumo de semilla de cilantro presentan mejoras respecto de sus controles positivos, siendo el grupo L+G+S el de mejor comportamiento.

Figura 16. Panel de Resultados de RT-PCR a 60 días de exposición.

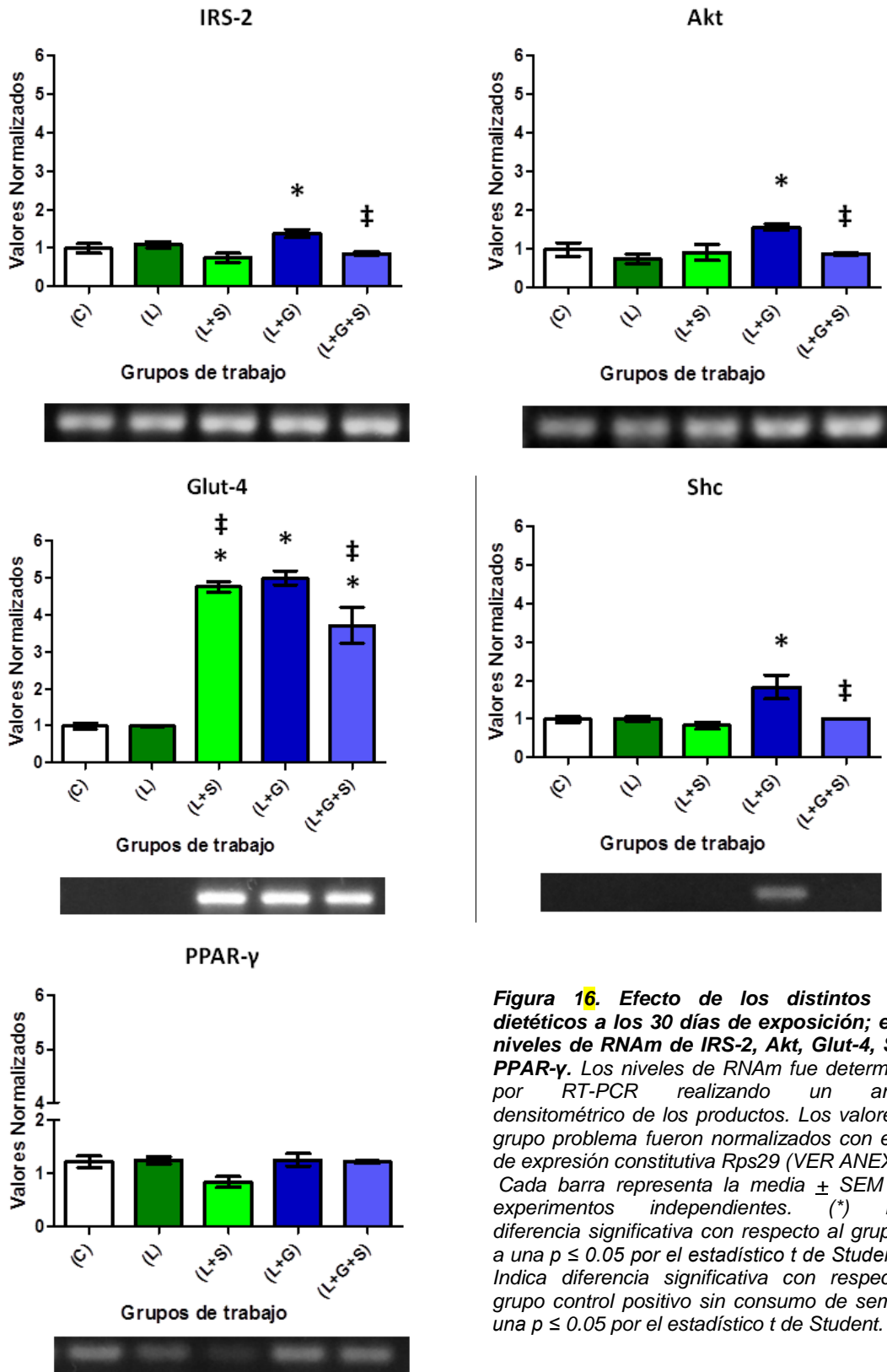


Figura 16. Efecto de los distintos retos dietéticos a los 30 días de exposición; en los niveles de RNAm de IRS-2, Akt, Glut-4, Shc y PPAR- γ . Los niveles de RNAm fueron determinados por RT-PCR realizando un análisis densitométrico de los productos. Los valores del grupo problema fueron normalizados con el gen de expresión constitutiva Rps29 (VER ANEXOS). Cada barra representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo (C) a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Por su parte, a los 60 días de tratamiento los cambios en las dietas fueron los siguientes. Con respecto al grupo (C), el grupo L no registro cambios significativos en los genes analizados, mismo comportamiento observado en el primer cohorte del estudio. De manera similar, el grupo L+S permanece estable en los niveles de RNAm; siendo el gen de GLUT-4 el único mensajero que se modifica, presentando regulación positiva correspondiente al 380%, concordante con el análisis de la proteína por inmunofluorescencia. Este cambio celular podría ser el primero de los eventos de respuesta al exceso calórico, que tengan como efecto ulterior el incremento en GLUT-4 respecto al grupo control. Así mismo, la evidencia muestra que la capacidad de respuesta de L + S se incrementa en 382% respecto al grupo L, sugiriendo que el incremento en el gen es por el tipo de dieta y el consumo de la semilla de cilantro.

En contraste, los grupos L+G y L+G+S mantienen cambios importantes respecto al grupo (C). Para el grupo L+G se presenta una regulación positiva en el codificante de IRS-2 que corresponde al 39%, con un incremento consecutivo en los RNAm que codifican para las proteínas de la esta vía obteniendo un 59% para Akt y la mayor elevación observada entre los grupos: un 404% para el mensajero de GLUT-4. Es destacable que en la vía de transducción proteica responsable de proliferación, el mensajero de Shc permanece elevado en un 85%, siendo el único de los grupos que presenta este comportamiento, al tiempo que estos cambios no se presentan para la expresión de PPAR- γ , cuyo nivel de expresión se mantuvo sin cambios significativos.

Por otra parte, el grupo L+G+S no muestra cambios en el gen de IRS-2, ni en Akt. En cambio el codificante de la proteína GLUT-4 presenta una regulación positiva que corresponde a 274%, respecto al grupo C. En complemento a estos genes analizados, Shc y PPAR- γ no muestran cambios significativos en estas condiciones alimenticias. No obstante, cuando la dieta se acompaña con semilla de cilantro se aprecia la disminución en los niveles de expresión de IRS-2, Akt, Glut-4, Shc, pero no en PPAR- γ .

Efecto de las dietas sobre el perfil bioquímico y zoométrico al tiempo de cohorte de 90 días.

Tabla 5. Resultados bioquímicos a 90 días de exposición con diferentes condiciones dietéticas con y sin consumo de *Coriandrum sativum*

Determinación	(C) n=3	(L) n=3	(L+S) n=3	(L+G) n=3	(L+G+S) n=3
Peso	422.3 ± 10.3	446.0 ± 8.5	425.3 ± 10.2	527.3 ± 17.0 *	429.0 ± 11.5 ‡
Talla	25.5 ± 0.2	25.3 ± 0.2	25.2 ± 0.2	25.3 ± 0.2	25.1 ± 0.1
Perímetro Abdominal	15.87 ± 0.36	17.33 ± 0.16 *	16.5 ± 0.28	19.16 ± 0.16 *	16.75 ± 0.3 ‡
Índice de Lee	28.83 ± 0.07	29.54 ± 0.06 *	29.27 ± 0.09 *	31.22 ± 0.40 *	29.4 ± 0.2 * ‡
IMC	0.65 ± 0.0	0.68 ± 0.01 *	0.66 ± 0.01	0.79 ± 0.02*	0.68 ± 0.02 ‡
Glucosa	134.5 ± 3.0	133.3 ± 4.3	125.5 ± 5.1	170.3 ± 4.1*	139.3 ± 2.6 ‡
Triglicéridos	76.0 ± 3.4	84.0 ± 4.1	65.0 ± 2.7 ‡	121.7 ± 4.4 *	84.7 ± 4.1 * ‡
Colesterol Total	69.5 ± 1.5	65.7 ± 1.4	65.7 ± 2.3	62.3 ± 2.0 *	66.0 ± 1.5
c-HDL	31.0 ± 0.4	26.5 ± 0.7 *	28.6 ± 1.0	21.2 ± 0.8 *	23.9 ± 0.4 * ‡

Tabla 5. Los resultados mostrados son el promedio de 3 experimentos independientes ± EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica 2018 a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Tras de la exposición a las dietas con la cronicidad de 90 días, se presentaron los siguientes cambios. El incremento del peso con respecto al grupo (C) fue significativo para el grupo L+G con un 24.86%, los grupos restantes no tuvieron cambios. Los grupos L y L+S no registraron cambios entre sí a diferencia de los

grupos L+G y L+G+S, cuyos resultados indican un descenso en este último del 18.6%. La talla de los animales no mostró diferencias entre los diferentes grupos.

En la determinación del perímetro abdominal, las diferencias respecto al grupo (C) fueron de un 9.2% por parte del grupo L y de 20.7% para el grupo L+G. Concerniente a las diferencias entre grupos de tratamiento; los grupos L y L+S no mostraron diferencias entre ellos; sin embargo, entre los grupos L+G y L+G+S existe un 12.6% menos atribuible al consumo de la semilla de cilantro.

Al punto final del experimento, los cambios observados demostraron que el aporte lipídico promueve un resguardo de forma prioritaria en la zona abdominal-retroventral, cuya estructura celular corresponde mayormente a tejido adiposo blanco. Así mismo, estos datos confirman que para esta zona anatómica, la acumulación es aún mayor si el estímulo se le adiciona el factor glucosa. Entre las dietas L y L+S, no se presentaron diferencias significativas, a diferencias de los grupos L+G y L+G+S, donde éste último grupo presenta una disminución del perímetro abdominal. De esta manera observamos que bajo estas condiciones experimentales, la semilla de cilantro regula los índices zoométricos relacionados con el resguardo energético cuando existe un sobre estímulo por lípidos y lípidos-glucosa. El porcentaje de grasa determinado, indicó que los grupos L, L+S, L+G y L+G+S sufrieron incrementos significativos del 2.4%, 1.5%, 8.2% Y 2.0% respectivamente, comparados con el grupo (C). Dichos cambios manifiestan que ante la cronicidad de un estímulo hipercalórico, el sistema promueve la acumulación de los excedentes energéticos en tejidos periféricos y esta distribución correlaciona con el exceso calórico otorgado por una dieta lipídica-glúcida. Además, entre los grupo L y L+S no existió diferencia significativa; en cambio, entre los grupos L+G y L+G+S, si se observó una menor cantidad de grasa total 5.79% por parte del grupo L+G+S. Con estos datos se confirma que la ingesta de la semilla genera cambios importantes en este proceso, sugiriendo una distribución diferente en el resguardo.

Los resultados del IMC muestran que solo los grupos L y L+G sufrieron incrementos significativos, que correlacionan en 4.6 % y 21.5 % respectivamente

comparados con el grupo (C). El resto de los grupos permaneció sin cambio. Los grupos L y L+S no registraron cambios entre sí, en cambio el grupo L+G+S presentó un nivel inferior, de 13.9% comparado con L+G. Estos efectos correlacionan con los efectos observados previamente. La glucemia basal muestran que solo el grupo L+G tuvo un incremento significativo del 26.6% cotejado contra el grupo (C), el resto de los grupo no mostraron diferencias. Los grupos L y L+S no presentaron diferencias significativas entre sí; en cambio, el grupo L+G+S mostró diferencia significativa a la baja de un 18.2%, respecto de su control positivo (L+G). Los cambios que se producen en esta determinación, evidencian que se presenta una alteración metabólica mayoritaria, cuando el estímulo hipercalórico se encuentra potenciado por la ingesta de glucosa; sin embargo, se demuestra que la semilla de cilantro ejerce un efecto hipoglucemiante en los grupos de consumo.

Así mismo, la determinación sérica de triglicéridos muestra que, con respecto al grupo (C), la dieta compuesta por L+G y L+G+S presentaron aumentos significativos correspondientes a 60% y 11%, respectivamente. Relativo a los grupos L y L+S, se registró una caída significativa en los niveles de triglicéridos de 22.6% por parte del grupo L+S y de manera similar se presentó una caída significativa del 30.4% por parte del grupo L+G+S en relación al grupo L+G. De esta forma, se observa que la composición hiperlipídica de la dieta no es suficiente para generar una alteración a nivel de triglicéridos circulantes, sin embargo combinado con la ingesta de glucosa, el comportamiento es distinto. Además de estas diferencias, es notorio que la semilla de cilantro genera; para ambos casos, una disminución del nivel sérico de este metabolito.

En la última medición de colesterol total, se registró solo un cambio estadísticamente significativo respecto al grupo (C): una baja en la concentración del 10.63% por parte del grupo L+G. Entre los grupos L y L+S; al igual que entre los grupos L+G y L+G+S, no existieron diferencias estadísticamente significativas. Este comportamiento, podrían estar relacionadas, con la caída del colesterol circulante, en su fracción HDL-c, como se muestra en la tabla (5). El análisis de las

mediciones realizadas para c-HDL indicó una reducción con respecto al grupo (C) del 14.5%, 31.6% y 22.9% por parte de los grupos L, L+G y L+G+S.

Entre el grupo L+G y el grupo L+G+S se registró nuevamente evidencia de un efecto protector que correspondió a un nivel superior significativo de 12.7%. Los grupos L y L+S no presentaron cambios entre sí. De esta forma, se evidencia que la cronicidad del estímulo calórico genera cambios en el entorno lipídico y lipoproteico que desembocan en daño al sistema señalado por niveles de HDL en descenso, principalmente en los grupos que ingieren glucosa, no obstante, la semilla de cilantro ejerce un importante efecto protector.

Figura 17. Histología de TARV en los distintos grupos al tiempo de cohorte de 90 días.

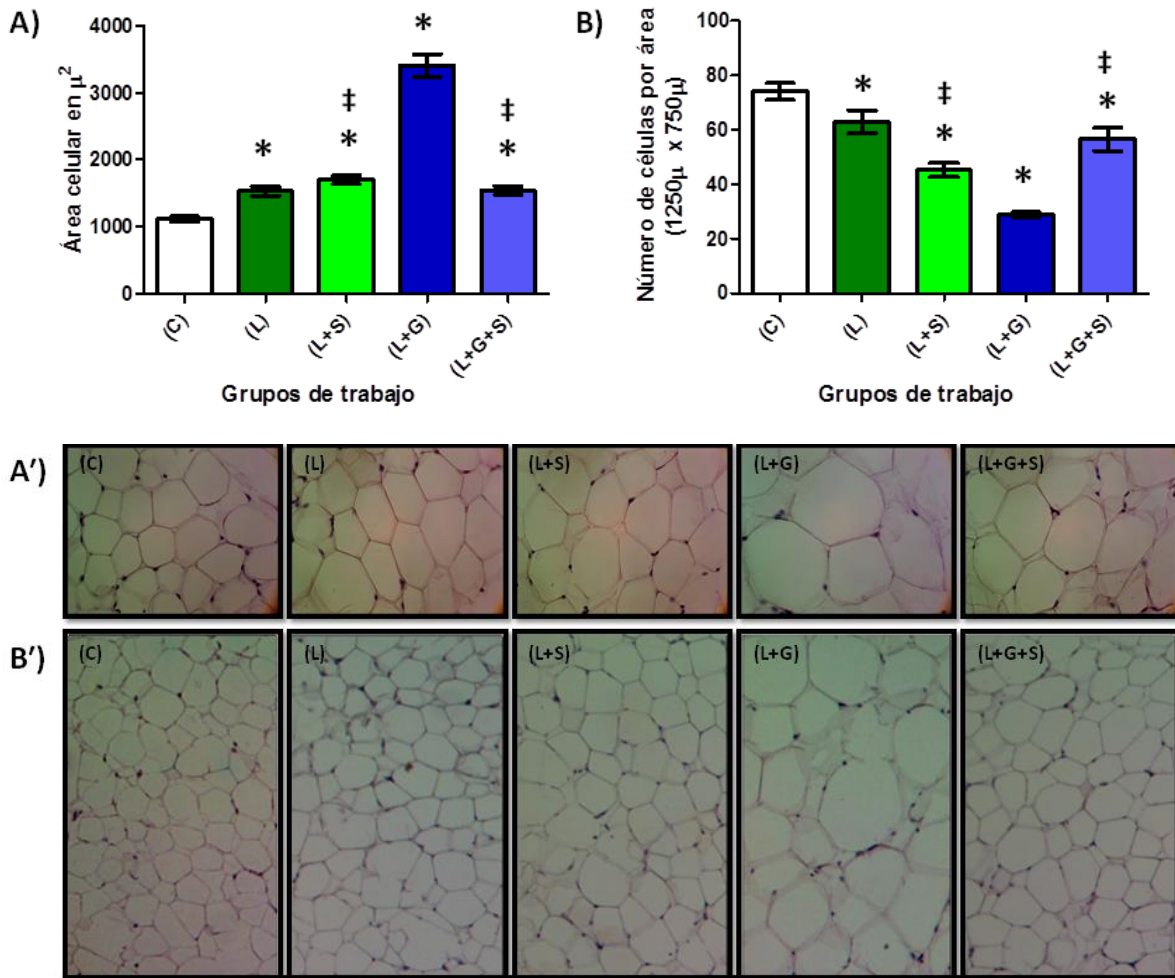


Figura 17. A) Indica la media del área celular determinada a 400 células, a su vez **A')** presenta las correspondientes imágenes de la tinción de PAS. **B)** Muestra los resultados del promedio de 70 microfotografías contabilizadas (en un área correspondiente a $1250 \mu \times 750 \mu$) y **B')** muestra las imágenes que pertenecen a este análisis. Se muestra \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica 2018 a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Efecto de las dietas sobre la histología adipocitaria al tiempo de cohorte de 90 días.

Al término de los 90 días de ser sometidos al proceso experimental, los datos obtenidos muestran cambios significativos, tanto en el número de células por área, como en el área celular promedio, respecto al grupo control normocalórico (C).

En el grafico 17B se exhibieron decrementos de todos los grupos de trabajo. El grupo L indico un descenso de 15.1% y el grupo L+S del 39%. En los grupos restantes, el grupo L+G indicó una baja de 61%, mientras que su grupo pareado con consumo de semilla de cilantro registró sólo un decremento del 23.7%. Al término del experimento, esta prueba indica el crecimiento celular significativo por parte de todos los grupos de trabajo con respecto al grupo (C), el cual fue sometido a condiciones normocalóricas. Entre el grupo L y L+S, se observó un nivel inferior, de 28% por parte del grupo L+S. A su vez, entre los grupo L+G y L+G+S, se denotó un número de células mayor, correspondiente a 95% por parte del grupo que consumió la semilla.

En el grafico 17A observamos el área celular respecto al grupo (C). En el caso del grupo L el incremento correspondió al 36.8% y para el grupo L+S se atribuyó un nivel 52.4% mayor; siendo así que éste último registro una elevación del 11.4% respecto a su grupo control positivo L. El mayor incremento pertenece al grupo L+G con un 204% y tan sólo una elevación de 38% para el grupo L+G+S. De esta forma, el grupo L+G+S expresó un tamaño celular inferior a su grupo control competente de 54.6%.

Figura 18. Inmunoreactividad para GLUT-4 en TARV al tiempo de cohorte de 90 días

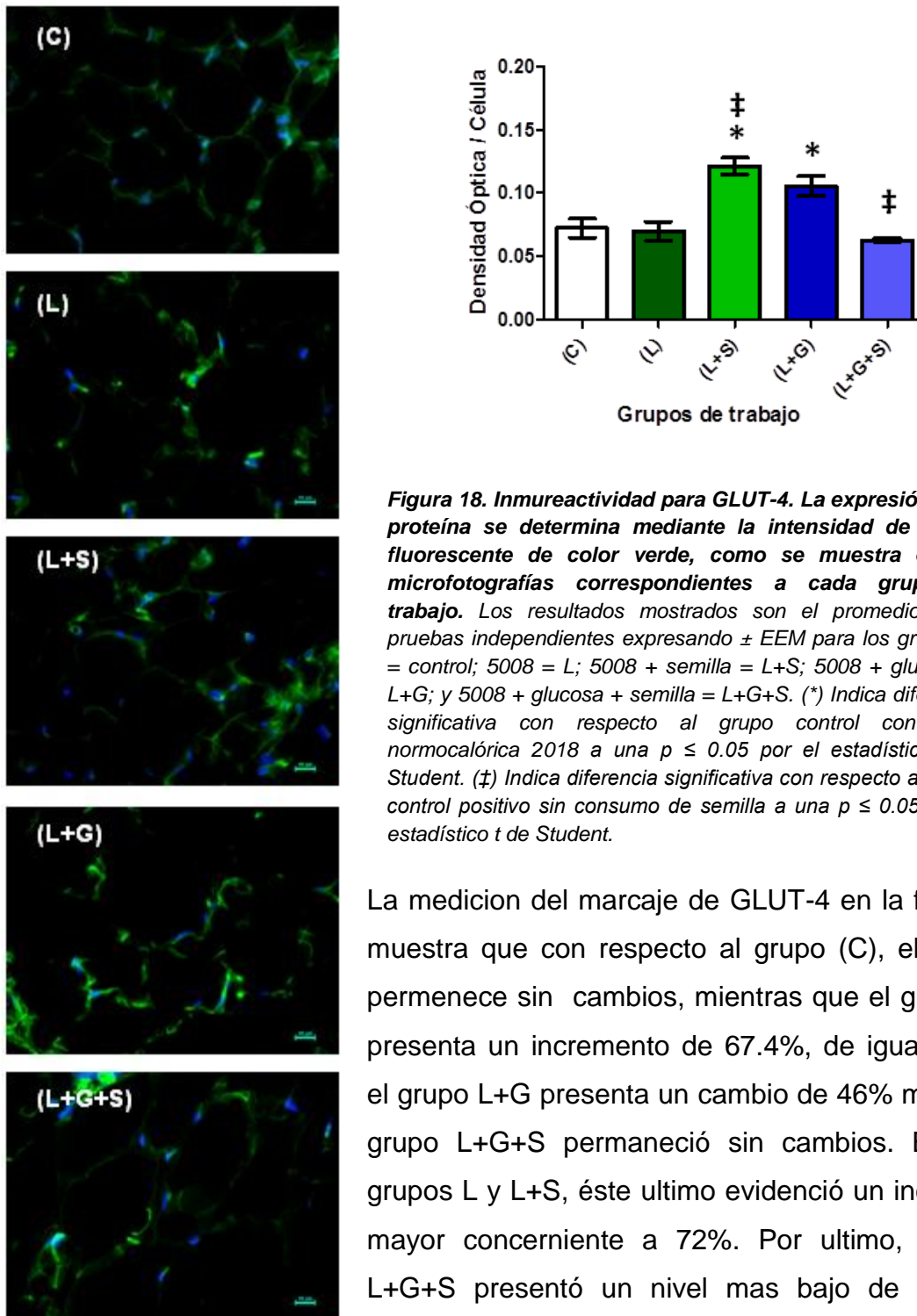


Figura 18. Inmureactividad para GLUT-4. La expresión de la proteína se determina mediante la intensidad de marca fluorescente de color verde, como se muestra en las microfotografías correspondientes a cada grupo de trabajo. Los resultados mostrados son el promedio de 3 pruebas independientes expresando \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica 2018 a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

La medición del marcaje de GLUT-4 en la figura 18, muestra que con respecto al grupo (C), el grupo L permanece sin cambios, mientras que el grupo L+S presenta un incremento de 67.4%, de igual manera el grupo L+G presenta un cambio de 46% mayor y el grupo L+G+S permaneció sin cambios. Entre los grupos L y L+S, éste último evidenció un incremento mayor concerniente a 72%. Por último, el grupo L+G+S presentó un nivel más bajo de expresión comparado con L+G. Los cambios generados al punto

final del experimento se observan con un incremento en la respuesta proteica en

presencia de lipidos, cuyo comportamiento no se observa si se complementa con la presencia de glucosa.

Figura 19. Triglicéridos en TARV al tiempo de cohorte de 90 días.

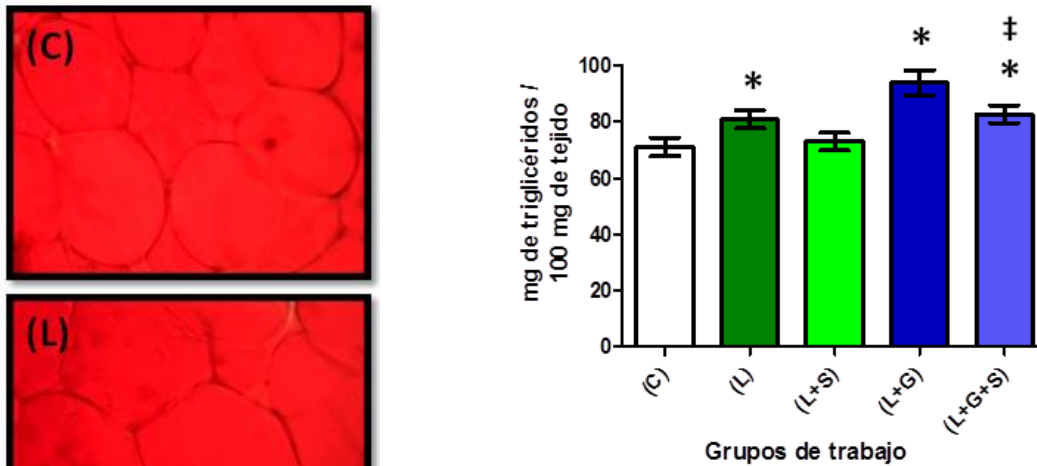


Figura 19. Los resultados del gráfico muestran el contenido de triglicéridos por cada 100 mg de tejido. A su vez, se muestran los cortes de tejido realizados a -40°C (permitiendo conservar su contenido en integridad celular) y teñidos con rojo O, tinción destinada a evidenciar el enlace estérico de los triglicéridos. Los resultados mostrados son el promedio de 3 pruebas independientes expresando \pm EEM para los grupos C = control; 5008 = L; 5008 + semilla = L+S; 5008 + glucosa = L+G; y 5008 + glucosa + semilla = L+G+S. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica 2018 a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Los cambios en el tejido correlacionan con la ganancia del contenido lipídico, cuyos incrementos se reportan con incrementos estadísticamente significativos del 15.4% para el grupo L, 47.2% para L+G y un 20.0% correspondiente al grupo L+G+S. Se aprecia que entre los grupos L y L+S no se registraron cambios significativos. En cambio el grupo L+G+S registró un nivel inferior competente a 18.25% en comparación al grupo L+G. Estos cambios reflejan que el aporte calórico excesivo sigue la tendencia de resguardo, donde la proporción de dicho almacén depende nuevamente de la elevación en los niveles calóricos y para estas condiciones experimentales el

incremento de glucosa evidencia un resguardo mayoritario. Sin embargo es claro que el consumo de la semilla de cilantro induce un menor resguardo a nivel de TARV.

Figura 20. Panel de Resultados de RT-PCR a 90 días de exposición

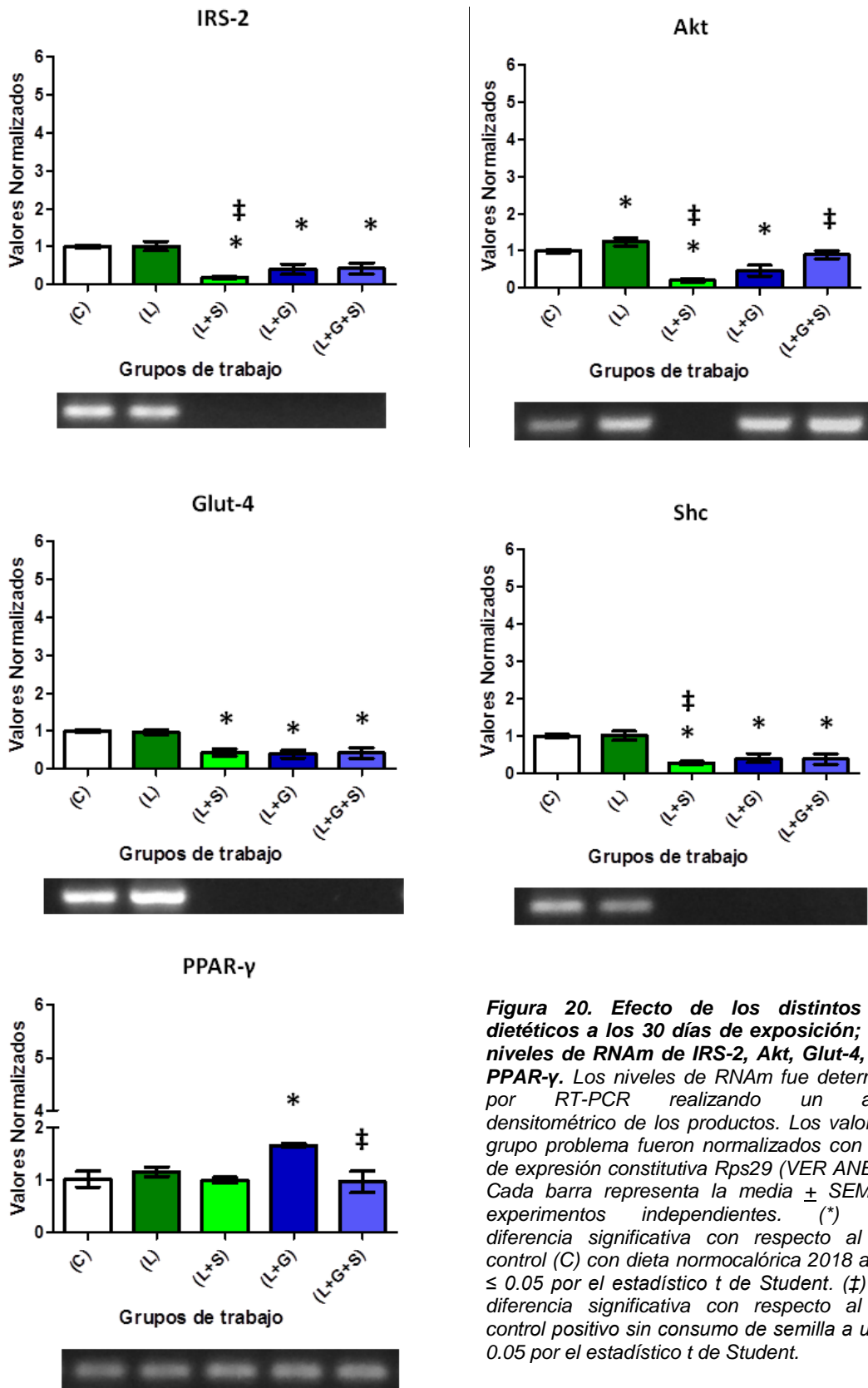


Figura 20. Efecto de los distintos retos dietéticos a los 30 días de exposición; en los niveles de RNAm de IRS-2, Akt, Glut-4, Shc y PPAR- γ . Los niveles de RNAm fue determinado por RT-PCR realizando un análisis densitométrico de los productos. Los valores del grupo problema fueron normalizados con el gen de expresión constitutiva Rps29 (VER ANEXOS). Cada barra representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control (C) con dieta normocalórica 2018 a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student. (‡) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control positivo sin consumo de semilla a una $p \leq 0.05$ por el estadístico t de Student.

Al final de la exposición a las dietas, a 90 días de trabajo los cambios observados fueron los siguientes.

En el grupo L, no se presentaron cambios en el gen para la expresión de IRS-2, seguido de una regulación positiva para el codificante de Akt que corresponde al 24%. No obstante, el incremento no impacta positivamente sobre el RNAm del gen GLUT-4 cuyos niveles de expresión permanecen similares al grupo normocalórica. Por otra parte, los codificantes analizados que corresponden a la vía proliferativa; Shc y PPAR- γ , permanecen sin cambios significativos.

Para el caso del grupo L+S, la adición de semilla de cilantro genera una regulación negativa proporcional al 82% en la expresión de IRS-2, evento que correlaciona con una caída en los niveles de expresión subsecuentes, correspondientes a 79% para Akt y 56% para GLUT-4. De esta forma se aprecia que el consumo de semilla promueve una caída en los niveles de RNAm analizados e implicados en vía de respuesta a insulina. Complementario a estos análisis, se aprecia la disminución en la expresión de Shc en un 72%, al tiempo que no se modifica el codificante de PPAR- γ , pues los niveles de expresión permanecen sin cambios respecto al grupo normocalórico.

Entre los Grupos L y L+S, se aprecia un claro cambio de expresión genética. El primer cambio observado en la dieta adicionada con semilla de cilantro, es la caída significativa de 81% para el RNAm de IRS-2. El mismo efecto se aprecia en el codificante de Akt cuyo nivel de expresión es 84% menor, sin embargo el nivel de RNAm de GLUT-4 permanece sin cambios. Concerniente a la vía proliferativa, el análisis sobre la expresión de Shc indica una regulación negativa por parte de la semilla de cilantro, mientras que la expresión de PPAR- γ permaneció sin cambios.

Para el grupo L+G la expresión del RNAm de IRS-2 sufre un descenso correspondiente a 60%, a este cambio le prosigue “río abajo” una regulación negativa para el codificante de Akt en un 79% y de 61% para el gen de la proteína GLUT-4. Un comportamiento similar se presentó en el análisis del mensajero de Shc, cuyo nivel de expresión descendió un 59%. Resulta interesante quea diferencia de este cambio, la expresión del PPAR- γ registró un aumento del 69%.

Concerniente al grupo L+G+S, la ingesta de semilla de cilantro promueve una regulación negativa del gen IRS-2 correspondiente al 58%, a la cual prosigue un comportamiento similar en los RNAm de Akt y GLUT-4, cuyos nivel de expresión descendieron hasta 53% y 58% respectivamente. El codificante de Shc presentó el mismo efecto, y su regulación negativa indicó un descenso del 62%, mientras que el mensajero de PPAR- γ , se mantuvo sin cambios significativos.

Entre los grupos L+G y L+G+S, no se presentaron diferencias en el mensajero de IRS-2, recordando que los niveles de ambos grupos se encontraron disminuidos. No obstante, la ingesta de semilla de cilantro promueve un nivel de expresión 102% mayor para el gen Akt, sin embargo, los niveles de RNAm de GLUT-4 permanecen sin cambios. De la misma manera, la semilla de cilantro no promueve cambios en el codificante de Shc y los valores de ambos grupos se mantienen disminuidos y sin diferencias significativas entre si. No obstante, una diferencia importante surge entre PPAR- γ , pues la ingesta de semilla de cilantro produce una disminución en el nivel de expresión que correspondió al 42%.

DISCUSION DE RESULTADOS

La heterogeneidad de origen en fenómenos como la obesidad, SM y DM2 también se manifiesta en los animales de experimentación, donde dichos modelos animales se desarrollan con la finalidad de imitar las características típicas en cada proceso. La cepa Long-Evans, presenta características muy similares en origen y progreso a la DM2, haciendo posible el análisis de las alteraciones complejas de esta enfermedad (Kawano et. al.; 1992).

Esta cepa se caracteriza por una condición al desarrollo de hiperglucemia persistente, poliuria, polidipsia y ligera obesidad, cuya evolución es crónica, independiente a la condición normocalórica de la dieta. La condición genética está caracterizada por el genotipo ob(+) y db(+). Dentro de los cambios que se presentan en la progresión de las alteraciones en SM y DM2, se encuentra la modificación de las condiciones zoométricas (IMC como indicador de estatus de sobrepeso u obesidad, la acumulación de grasa nivel abdominal como indicador de obesidad central y porcentaje de grasa corporal para la distribución de la misma a nivel sistémico), y los cambios en el perfil bioquímico de parámetros clásicos asociados a cambios en las respuestas biológicas normales (glucosa, colesterol total y fracción HDL así como triglicéridos circulantes); donde los cambios dinámicos en las respuestas caracterizan y proveen información de las vías metabólicas de mayor impacto para la regulación y compensación de daños (Kawano et. al., 1992; Charles River Laboratories International, 2015).

Además de la caracterización zoométrica y bioquímica sérica, a nivel adipocitario, estudios han demostrado una tendencia a la disminución de la capacidad de translocación de GLUT-4, sin impacto directo sobre la concentración de proteína en etapas tempranas. Además, cultivos de adipocitos aislados confirmaron la posibilidad de defectos tempranos en la resistencia a la insulina con la disminución de la translocación, y posteriormente con elevadas cargas de glucosa en presencia de insulina, la disminución de GLUT-4 que parece ser una consecuencia, más que una causa de la desregulación glúcida en estas ratas (Thoide et. al., 1997; Flores-Riveros et. al., 1993).

Por otra parte, se encuentra bien descrito una tendencia hiperfágica y la consecuencia de obesidad en la cepa. Esta tendencia puede tener origen en mutaciones como la del gen de colecistocinina A (CCK-A) además de presentar deficiencias en la señalización del neuropéptido Y (NPY) en el hipotálamo dorsomedial, cuyos efectos no permiten emitir la señal de saciedad tras la ingesta. Así pues, la obesidad en la rata puede ser debida al mal funcionamiento de la vía de regulación periférica respecto a la saciedad y a su vez relacionarse con mecanismos centrales críticos para el mantenimiento del balance energético global. Estos cambios sugieren la presencia de respuestas adaptativas a un estímulo hipercalórico, que compensen con efectividad mediante eventos celulares primarios y de forma tardía mediante la promoción de vías metabólicas ectópicas (Schwartz et. al., 1999; Bi & Moran, 2002).

Grupo (Lípidos) Vs Grupo (Lípidos + Semilla)

Bajo condiciones de aporte calórico excesivo, las características feno-genotípicas de la cepa propician un desarrollo progresivo de alteraciones que tienen como consecuencia disglucemia y dislipidemia sostenida, además de la ganancia de adiposidad abdominal en forma de grasa magra, aumento de la infiltración de lípidos en el músculo esquelético, incremento de glucosa sérica basal y resistencia a la insulina, esteatosis hepática entre otras eventos metabólicos (Poudyal, et. al. 2012).

El conjunto de alteraciones que coexisten involucra la deficiencia en la comunicación endocrina de diversos órganos que participan en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como la regulación del balance energético mediante el control del ingreso calórico, metabolismo y distribución. Los órganos que participan activamente en estos eventos son el cerebro, hígado, músculo, páncreas y tejido adiposo; formando un ciclo de estímulos que permiten mantener el correcto balance energético (Friedman & Halaas, 1998).

Aunado a la función de almacenamiento energético, el tejido adiposo provee del primer sistema regulador de la ingesta calórica, que se encuentra mediado por la secreción de leptina, hormona responsable de producir saciedad. La cantidad secretada de esta hormona se encuentra ligada al crecimiento del tejido adiposo, por lo tanto mayor resguardo energético que conlleve a la ganancia de masa adipocitaria promueve mayor liberación de leptina, conduciendo a una resistencia en la acción de la misma que deriva en desarrollo de hiperfagia. (Friedman & Halaas, 1998; Wynne et al., 2005; Guilherme, et. al., 2008; Schellong, et. al, 2013).

Esta señal desregulada conlleva a la pérdida de la restricción del ingreso calórico, y se produce un exceso en la ingesta. Además de este cambio, durante el posprandio la liberación de leptina se acompaña del incremento en los niveles circulantes de insulina, la cual regula y estimula la lipogénesis en hígado, el resguardo muscular de glucógeno y la lipogénesis en tejido adiposo. La liberación excesiva continua por un alto aporte calórico condiciona al desarrollo de baja en la sensibilidad a su acción así como resistencia por parte de los tejidos insulino dependientes (hepático, muscular y adipocitario), generando desregulaciones como el SM y DM2, entidades multifactoriales que se caracterizan por la disfunción del manejo de lípidos y carbohidratos, apareciendo incremento lipoproteínas circulantes y niveles de glucosa basal como factores de diagnóstico (FID, 2006; Barroso, 2003; Chakravarthy & Booth, 2004; Kassi *et al.*, 2011; Buettner *et al.*, 2006; Mensink *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

Los resultados séricos a 30 días mostraron que la administración de la dieta de origen lipídico genera hiperglucemia basal en los animales de experimentación, mientras que no se presentan cambios en los niveles de triglicéridos ni colesterol HDL. Este comportamiento se ha estudiado ampliamente, sugiriendo que la perturbación de la homeostasis de glucosa y la elevación de la misma en condiciones de ayuno es causada por alteraciones tempranas a nivel hepático. Los aportes calóricos excesivos, promueven una función hepática sobre estimulada de vías glucolítica y hipogénicas que derivan en disfunción y resistencia a la acción de esta hormona.

El desarrollo de hiperglucemia obedece a disfunción hepática por el ingesta excesiva de lípidos dietarios, que ocasiona un mayor flujo de AGL hacia el hígado, estimulando la gluconeogénesis (Chen, 1999).

Además, en condiciones normales, durante el ayuno la insulina regula la función hepática gluconeogenica manteniendo los niveles de glucosa basal inferiores a los 100 mg/dL. Un cambio en la función hepática incrementa la tasa basal de la producción hepática de glucosa (PHG) y en consecuencia se produce un estatus hiperglicémico. Bioquímicamente, la hiperglucemia es un fenómeno que se ha descrito en tres eventos fundamentales: 1) el incremento plasmático de los AGL, promueve una mayor captura por parte de los hepatocitos, originando la oxidación lipídica y una acumulación acelerada de acetil CoA. Estos cambios estimulan a la piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que son las enzimas limitantes de la velocidad en la gluconeogénesis (Bahal, 1997), así como la glucosa-6-fosfatasa, enzima que controla la velocidad de liberación de glucosa desde el hepatocito (Massillon, 1997), 2) El aumento de la oxidación de AGL genera un incremento de ATP paralelo a un incremento de NADH que conllevan a la gluconeogénesis y 3) la inducción de resistencia hepática a la insulina mediante la inhibición del sistema de transducción de señales de insulina (Ravichandran et. al., 2001; Kruszynska et. al. ,2002; Dresner, et. al., 1999; Lam, et. al., 2003; Exton, et. al. 1969; Williamson et. al., 1966; Massillon et. al. 1997). De esta forma se confirma el desarrollo de un estatus desregulatorio debido a la ingesta lipídica elevada. Este comportamiento evidencia una alteración temprana en el metabolismo de la glucosa, cuyo impacto se presenta primordialmente a nivel hepático. Se observo que a este tiempo de corte, la ingesta de semilla de cilantro no promueve cambios en el perfil sérico, situación que invita a pensar en efectos más importantes en otros tejidos.

Después de 60 días de tratamiento, la dieta lipídica ocasiono un incremento de triglicéridos séricos circulantes y descenso en los niveles de HDL, además de mantener el estado hiperglicémico previo. Se sabe que durante la progresión de daño por exceso calórico lipídico, el mantenimiento del estatus hiperglicémico se compensa con una mayor concentración de insulina en ayunas, que promueve el estatus insulino-resistente del hígado, aumentando la gluconeogénesis y disminuyendo la glucogénesis, de tal forma que se mantiene el incremento de glucosa basal (DeFronzo, 1988; DeFronzo, 1997; Tripathy, et. al., 2000; Reaven, et. al., 1989). También se ha descrito que bajo estas condiciones, la respuesta hepática bioquímica fomenta la mayor actividad de las rutas glucolítica - ciclo de Krebs - cadena respiratoria, incrementando los flujos de ATP y la biosíntesis de glucógeno como respaldo energético de carbohidratos. En conjunción, la saturación de estas rutas conlleva al incremento en la concentración de acetil-CoA, que a su vez promueve la síntesis de malonil-CoA, sustrato que dispara la biosíntesis de ácidos grasos. Además, a nivel mitocondrial la formación de acetil-CoA se encuentra potenciada por la participación de la enzima ATP-citrato-liasa, que promueve el acople de la vía glucolítica y la biosíntesis de ácidos grasos, destacando que las enzimas formadoras de estos metabolitos son activadas por insulina. LA formación de acidos grasos es el primer paso lipogenico, pues promueve la formación de los triglicéridos mediante acilación secuencial sobre un glicerol-3-fosfato que es previamente desfosforilado en la membrana del retículo endoplásmico y que proviene de la ruta glucolítica producto del exceso en el consumo de carbohidratos (kim, 1997; Nagle et al., 2009; Kahan et. al., 2001)

El incremento de lipogénesis hepática, obliga al sistema a una mayor liberación de VLDL a circulación, lo cual promueve por interacción de sus fracciones apoproteicas, un intercambios activo mediado por CETP y LCAT, afectando la composición de HDL y subsecuentemente se observan la disminución de esta lipoproteína por su catabolismo excesivo. La alteración de este metabolismo ha sido ampliamente descrita. En general, la liberación al torrente sanguíneo de los triglicéridos se realiza en forma de lipoproteínas, que son partículas de origen proteico-lipídico organizadas de forma esférica, compuestas por lípidos

hidrofóbicos, triglicéridos, colesterol esterificado, lípidos hidrofílicos y se estabilizan por péptidos denominados apolipoproteínas, de composición diversa y que además fungen como moléculas de reconocimiento para su catabolismo (Shi & Cheng, 2009; Meegalla, 2002; Parks, 2002).

La liberación se realiza en forma de VLDL, que requiere el empaquetamiento de triglicéridos y la apoproteína apo-B100 mayoritariamente, aunque también incluyen apo-A, apo-C, y apo-E, en distintas isoformas. La presencia de la apoC-III promueve un mayor empaquetamiento de triglicéridos durante el ensamble de las VLDL y estimula la secreción hepática de las VLDL ricas en triglicéridos (Sundaram et al., 2010). El incremento de VLDL en circulación altera el catabolismo de las lipoproteínas restantes, pues la elevación de la concentración plasmática promueve una mayor permanencia y deriva a su vez en incrementos de catabolismo.

La lipoproteína HDL es quien se encarga de regular la homeostasis de este sistema, mediante el transporte del exceso de colesterol hacia el hígado. En su composición, las principales apoproteínas que la conforman son A-I y A-II, apoC-I, C-II, C-III, de las cuales apoA-I actúa como cofactor para la activación de la lecitin-colesterol-acil transferasa (LCAT) que cataliza transferencia de ácidos grasos provenientes de una lecitina y esterificación a colesterol libre. Este cambio modifica las partículas nacientes en partículas esféricas HDL3 hacia HDL2. Además de estos cambios se produce la transferencia del colesterol esterificado desde las HDL hacia las lipoproteínas con apoB como las VLDL y LDL intercambiándolo por triglicéridos. Esta acción es llevada a cabo por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). Como consecuencia de este proceso, se originan cambios en las HDL que las tornan más pequeña y ricas en triglicéridos. Dicho cambio promueve la afinidad a la lipasa lipoproteica hepática, que ocasiona un elevado (Shimano, 2009; Puppione et al. 2010; Yokoyama, 2006).

De esta forma la convergencia desregulatoria de los lípidos y la glucosa hepática promueven un nuevo estado desregulatorio que se caracteriza por hiperglicemia, hipertrigliceridemia y la caída de HDL; donde esta última es consecuencia de la excesiva síntesis de VLDL sobrecargadas de triglicéridos, el intercambio de colesterol y triglicéridos que modifican la estructura de HDL, condicionando así la disminución por su catabolismo acelerado. Este perfil bioquímico es el clásicamente observado en RI, SM y DM2. (Barter et al., 2003).

No obstante, y a pesar de los cambios marcados producidos por la dieta, la adición de semilla de cilantro a la dieta lipídica, promueve una disminución de la concentración de triglicéridos circulantes, destacando que dicho efecto que también se presenta a los 90 días de exposición. Esta situación sugiere, que el efecto de producción hepática de VLDL, así como su transporte y catabolismo pueden estar disminuidos. SE ha demostrado que la ingesta de semilla de cilantro genera una disminución de los niveles de colesterol total y triglicéridos, observando a su vez un incremento significativo en la actividad de LCAT plasmática. Estos efectos generaron un descenso en los niveles de VLDL y LDL. El aumento de la actividad de LCAT en plasma parece ser el responsable de un mejor intercambio de triglicéridos entre VLDL- HDL sugiriendo de esta forma la mejora en los índices de triglicéridos, que no repercute en la recuperación importante a nivel de HDL (Chithra & Leelamma, 1997).

Los datos obtenidos indican que dieta lipídica impacta el metabolismo del tejido hepático, además de estimular una respuesta insulínica moderada que no modifica sustancialmente la capacidad de respuesta a la insulina del tejido muscular (esquelético) y adipocitario a los 30 y 60 días de trabajo. Sin embargo, la desregulación hepática sostenida, responsable de la hiperglicemia promueve el incremento en los niveles de insulina, que despiertan mecanismos compensadores que regulen este cambio en el manejo de carbohidratos.

Estos cambios se observaron al final del experimento, pues tras 90 días de tratamiento con la dieta lipídica, los niveles de glucosa y triglicéridos regresaron a niveles del grupo control, mientras que la concentración de HDL permaneció disminuida. Dichos cambios reflejan la aparición de un sistema compensador. En este sentido, el músculo esquelético es el sitio principal de captación de glucosa en los seres humanos. En condiciones de hiperinsulinemia y euglicemia, aproximadamente el 80% de de la captación de glucosa se produce en el músculo esquelético. Por lo tanto, en la alteración hepática, la producción de glucosa es el principal determinante de la concentración de glucosa en plasma en ayunas. Sin embargo, debido al cambio sérico de la glucosa, la respuesta muscular en dichas condiciones es responsable de una mayor recaptura que conduce a niveles inferiores de glucosa séricas, la cual se encuentra fomentada, por el incremento en la liberación de insulina por las células β pancreáticas (Chen et. al., 1999; Adeli et. al., 2001; Agius & Peak, 1997, Chin et. al., 1993; Clarke, 2000).

En condiciones de resistencia hepática inicial, el metabolismo de glucosa en el músculo funciona como tejido compensador, mediante la activación del sistema de transporte de glucosa dependiente de insulina. El ingreso se encuentra estimulado por la acción de la insulina y guarda similitud proteica con la vía fomentada en tejido adiposo, el cual es dependiente de un receptor a la insulina y un complejo proteico intracelular. En general, la interacción con el receptor promueve la activación del IRS -1, cuya forma fosforilada en sitios de tirosina resulta en la activación subsecuente de la PI3K, cuyo producto deriva en la activación río abajo de Akt. La fosforilación de Akt conlleva a la activación del sustrato 160 (AS160), que facilita la translocación de GLUT4 al sarcolema, para generar la posterior entrada de glucosa en la célula. Mantener la integridad de la IRS-1, PI3K y Akt es esencial para la captación de glucosa mediada por insulina en tejido muscular esquelético de forma normal. De esta forma, la respuesta insulínica potenciada desemboca en una mayor recaptura de glucosa, fomentando un retorno a los niveles normales de glucosa transitoriamente (Combs et. al. 2001).

Además de los efectos musculares, el incremento de insulina activa la respuesta adipocitaria. El tejido adiposo posee receptores de la superficie celular que median la captación de lipoproteínas y realizan su degradación. Se ha mencionado que las VLDL proveen de ácidos grasos las necesidades de energía y de almacenamiento de los adipocitos y dicha respuesta es dependiente de la actividad hidrolítica de la lipoproteína lipasa (LPL), que se estimula y potencia por insulina. (Large, et. al., 2004; Martins, et. al., 2004; Merkel, et. al., 2002; Olivecrona, et. al., 1997; Choi et. al., 2002; Wong & Schotz, 2002; Merkel, 2002; Goldberg et. al., 2009).

En resumen, este comportamiento evidencia la progresión del daño hepático, además del fomento de la respuesta muscular y adipocitaria que tienden a normalizar los valores séricos de triglicéridos y glucosa. En cambio, el incremento en el intercambio de triglicéridos conduce a la disminución de HDL por la actividad catabólica. Resulta importante recordar que el efecto regulador observado previamente sobre la disminución de triglicéridos circulantes mediado por la ingesta de semilla de cilantro se mantiene, siendo este el único cambio observado por la semilla de cilantro.

De esta forma, se puede correlacionar los cambios séricos con la respuesta tisular, mediada por musculo y tejido adiposos en última instancia y en respuesta a la desregulación hepática, como se ha mencionado previamente. Por todos los mecanismos bioquímicos descritos, la distribución de los sustratos a nivel sistémico, es un evento de compensación que no revierte los efectos previos de la dieta, y que modifica otros parámetros importantes, principalmente la ganancia de tejido adiposo. Por tal razón, se analizaron los principales indicadores zoométricos y su correlación con el tejido adiposo a nivel histológico, buscando cambios que confirmen la respuesta tisular que fomente el tejido adiposo.

La masa de tejido adiposo se mantiene por un equilibrio bien controlado de la proliferación celular (hiperplasia) y aumento en el tamaño celular (hipertrofia). La hipertrofia celular resulta de la absorción y asimilación de ácidos grasos extracelulares, que conllevan al crecimiento de gotas lipídicas ricas en triglicéridos (Gonzales & Orlando, 2007).

Los resultados obtenidos muestran que desde el inicio del proceso experimental, a los 30 días de exposición a la dieta lipídica se registró la ganancia de perímetro abdominal, mismo que correlaciono con desarrollo hipertrófico celular de TARV. Así mismo se aprecia que aun cuando la ganancia de triglicéridos por parte del tejido no fue significativa, se presenta una tendencia al incremento. Estos cambios también fueron exhibidos a los 60 y 90 días, evidenciando que el resguardo lipídico se fomenta desde el momento de la ingesta en esta zona anatómica. No obstante, la ganancia de triglicéridos en tejido, presenta cambios significativos a los 60 y 90 días de trabajo. Confirmando el comportamiento de resguardo responsable, del aclaramiento plasmático de lipídicas a los 60 días, y glúcido-lipídico tras 90 días de tratamiento.

No obstante, estos no son los únicos cambios que confirman la progresión del daño hepático y la posterior respuesta compensatoria de los tejidos periféricos, pues a los 60 y 90 días del experimento, se revelaron incrementos significativos en el IMC y % de grasa corporal, situación que apunta al desarrollo del ambiente compensatorio por parte de tejidos ectópicos, concerniente al incremento de resguardo lipídico.

Respecto al desarrollo hipertrófico, resulta interesante que la ingesta de semilla provee de un entorno que permite controlar el tamaño celular ante la ingesta lipídica durante la exposición a 30 y 60 días de tratamiento, observándose que dicho efecto no se presenta al final del experimento, presentando una respuesta hipertrófica contundente. Esta situación indica que la capacidad de respuesta del tejido adiposo se encuentra fuertemente estimulada y condiciona al resguardo lipídico, situación en la que la semilla de cilantro no puede continuar con el efecto protector ante el desarrollo hipertrófico.

Los resultados mostrados muestran que independiente de existir un estímulo calórico que provoca la desregulación metabólica, la comunicación entre los tejidos se encuentra regulada a modo que permite una respuesta organizada que controla los niveles séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos, fomentado la activación de vías metabólicas compensen la distribución y disminuyan el daño

que pudiera producirse en un solo tejido, con la participación de órganos anexos. Ante el incremento de glucosa sérica por el daño hepático, se desarrolla la respuesta pancreática mediante la secreción potenciada de insulina, que activa las respuestas compensadoras en musculo y tejido adiposo. Como se ha mencionado, el desarrollo de hipertrofia adipocitaria depende primordialmente de la absorción de ácidos grasos, sin embargo no se limita a la recaptura de los mismos, sino que participa activamente en el resguardo de glucosa, mediando por insulina. Donde dicha hormona promueve la fosforilación consecutiva de diversas proteínas cuyo efecto ulterior resulta en la translocación membranal de transportador de glucosa adipocitario; el GLUT-4 .

Por esta razón, se realizo la medición de expresión proteica del GLUT-4 con inmunomarcaje de fluorescencia, como una medida indirecta de la capacidad de respuesta a la insulina por parte del tejido adiposo ante el medio desregulado que fomenta la dieta hipercalórica de origen lipídico.

La determinación de los niveles del transportador no presento cambios tras 30 días de exposición a la dieta, lo que sugiere que el impacto metabólico no produce un efecto directo sobre el tejido adiposo. Este comportamiento resulta interesante, pues se considera que la hipertrofia es un condicionante para la deficiencia de respuesta, indicando de esta manera, que el crecimiento celular podría jugar un papel desregulador en la respuesta del transportador, que sin embargo debe ser de una mayor magnitud. Los resultados muestran que la respuesta celular en el segundo corte experimental, se presento un incremento importante en la expresión proteica del transportador, sugiriendo un mayor estimulo mediado por insulina fomentando la recaptura de glucosa en respuesta al incremento plasmático de la misma. Sin embargo, tras el estimulo crónico de 90 días, la respuesta proteica del tejido se ve disminuida, sin mostrar cambios significativos respecto al grupo control, quizás en respuesta a la normalización de los niveles de glucosa sérica, normalizados por la respuesta combinada del tejido adiposo y muscular, así como un resguardo mayoritario de ácidos grasos.

Aunado a este comportamiento, la semilla de cilantro, ejerce un efecto de ligera estimulación tras 30 días de exposición al reto lipídico. No obstante, los efectos de sobreexpresión observada a los 60 días se ven disminuido en el grupo de consumo de semilla, según el entorno celular descrito, este cambio apunta a que uno de los efectos de la ingesta de semilla de cilantro pudiera presentarse con la modulación del efecto producido por insulina. Se ha descrito que la semilla de cilantro contiene una cantidad de compuestos fenólicos variables, cuyos efectos por separado han sido analizados recientemente para conocer los potenciales efectos benéficos. La caracterización química ha desvelado la presencia mayoritaria de flavonoles como la quercetina y luteolina, (ver anexos acá va el barrido de HPLC). Concerniente a la acción en los adipocitos, se ha demostrado que los flavonoides inhiben la recaptura de glucosa estimulada por insulina en adipocitos y que a su vez los dos flavonoles mencionados promueven intolerancia a la glucosa mediante la caída en la sensibilidad a la insulina, además de evidencia que señala la intervención a este nivel en presencia de insulina (Shao et. al., 2013; Nomura et. al., 2008).

También se ha observado que la genisteina inhibe la recaptura de glucosa mediada por insulina sin afectar las presencia de los receptores proteicos, sugiriendo que la actividad es a nivel de directamente GLUT-4, además se ha corroborado la disminución del transportador tanto en modelos animales como en cultivo celular en presencia de insulina (Bazuine, 2005; Strobel et. al. 2005). Así mismo se ha descrito que diversos fenoles como el kaempferol inhiben la captura de glucosa, mediante la inhibición de la translocación de GLUT4 en cultivos celulares de adipocito 3t3-L1 en presencia de insulina (Prasad et. Al., 2009)

Esta evidencia sugiere la presencia de un estado hiperinsulinemico, como se ha descrito previamente, que promueve la aparición de los efectos reguladores aportados por la semilla de cilantro, en la disminución de la translocación del GLUT-4.

Por otro lado, a los 90 días se presenta una respuesta proteica incrementada, que se acompaña con el desarrollo hipertrófico no observado previamente. Este aumento de la expresión es más notorio que el observado a los 30 días de exposición, sin embargo es muy interesante que dicho incremento no promueva cambios significativos en los niveles de glucosa sérica. Este cambio puede deberse al desarrollo de una respuesta potenciada en el tejido, que conjuntamente promuevan una respuesta normal del transportador ante la concentración inferior de insulina, situación que no ha sido estudiada en este contexto previamente. Sin embargo, el incremento del nivel del transportador no conlleva obligatoriamente a efectos de disminución de glucosa, pues se ha visto que otros polifenoles, como el kameperfol, no promueve cambios ante el incremento de insulina, sino que estudios de acoplamiento por homología mostraron que se une directamente al canal de transporte de glucosa, sugiriendo la captación disminuida de glucosa mediante la inhibición de la vía de insulina así como la competencia de glucosa durante el transporte (Prasad et. al., 2009).

La adaptación sistémica genera cambios tróficos y de respuesta proteica en el tejido adiposo, que implican mecanismos celulares diversos. La funcionalidad de la célula adipocitaria, se encuentra en estrecha relación con la insulina y las reacciones metabólicas que desempeña. La resistencia insulínica conlleva a la disfunción bioquímica progresiva donde el tejido adiposo desregulado se convierte en promotor de daños localizados y sistémicos irreversibles de suma importancia. Es por este conjunto de cambios que conocer la base de la respuesta genética que concierne a los principales mediadores proteicos de respuesta a la insulina en dicho tejido resulta elemental para poder adaptar terapias que desembocen en un efecto benéfico global.

En reseña, es destacable que la ingesta de la dieta lipídica generó una desregulación hepática y una subsecuente respuesta sistémica. Sin embargo, la evidencia sugiere la compensación de tejidos como el músculo y propiamente el tejido adiposo como regulador, donde ha sido claramente evidenciada la respuesta celular.

Sin embargo, es notable que los resultados no muestren cambios significativos a nivel de expresión genética de los codificantes analizados, en ninguno de los tiempos planteados como cohorte. Esta situación invita a pensar que pese a los cambios generados por la exposición a la dieta a nivel sérico y la promoción de resguardo calórico para el tejido mediante el desarrollo hipertrófico, el medio no genera un impacto suficiente para que el tejido demande una respuesta celular que modifique los patrones de expresión de los codificantes de las proteínas que participan activamente en la señalización de insulina para translocación de GLUT-4 así como la respectiva vía proliferativa caracterizada por la activación del codificante PPAR- γ . Dicho comportamiento se observó desde la primera cohorte de trabajo, a los 30 días, hasta el final del proceso experimental, 90 días.

Previamente se ha descrito, que la cepa utilizada en el desarrollo experimental, long-evans, posee un fenotipo ob/db, condicionando a la desregulación por estímulos calóricos. Esta característica puede ser la responsable del desarrollo de características facultativas que permiten la adaptabilidad sin que se presente un reto importante que conduzca a la sobre-activación genética de los principales mediadores de respuesta, de tal forma que la expresión de genes se mantuvo sin cambio respecto al control normocalórico, durante los primeros 30 y 60 días de la exposición, independiente de la dieta lipídica. Posteriormente se presentó un incremento individual sobre la expresión de Akt los 90 días. Aunque el cambio es contundente, resulta prematuro generar asociaciones de eventos metabólicos. Sin embargo, un cambio asociado al entorno metabólico producido por la dieta lipídica, se ha evidenciado que la presencia de hiperinsulinemia promueve una mayor fosforilación de PI3K, a la que subsecuentemente produce el incremento en la fosforilación de Akt destinada a estimular la activación de vías lipolíticas que involucran a las perilipinas. (Choi et. al., 2010; Liu, et.al., 2000)

Resulta interesante que tras la exposición durante 30 días, la ingesta de semilla de cilantro no modifica los patrones de expresión genética. Sin embargo tras 60 días de exposición, a diferencia de la dieta lipídica la ingesta de semilla de cilantro, produjo una regulación positiva importante para el RNAm de GLUT-4. Se ha

descrito que la exposición a niveles elevados de insulina en cultivos de células 3T3-L1 la expresión de RNAm decae a causa de la hiperinsulinemia (Flores et. al., 1992). Este fenómeno no ha sido estudiado bajo nuestras condiciones de trabajo, no obstante, la evidencia proporcionada acerca de la disminución de la activación de señales intracelulares mediadas por insulina, así como la actividad reguladora directa sobre GLUT-4, dan cabida a la hipótesis de que el la semilla de cilantro disminuye el daño hiperinsulinemico y promueve la síntesis efectiva de RNAm, potenciando de este modo su respuesta y el producto del codificante que sufre regulación positiva.

Es al final de la exposición a la semilla de cilantro cuando los efectos se ven potenciados, pues la expresión de los RNAm tras 90 días de exposición sufre una regulación negativa de los mensajeros de IRS-2, Akt, GLUT-4 y Shc, mientras que la expresión de PPAR- γ se mantiene sin cambio. Se ha observado que en la una carga de glucosa, tanto luteolina promueven la inhibición en sitios de tirosina del IRS-1, al tiempo que se presenta una disminución de la fosforilación de Akt que conlleva a la disminución en la recaptura de glucosa. La respuesta adipocitaria de síntesis proteica que responde a la insulina depende de la activación de genes, tales como aP2, LPL, GLUT-4, se adquiere durante su diferenciación en adipocitos maduros. Se ha reconocido que el PPAR- γ 2, C/EBP β así como C/EBP δ desempeñan papeles críticos en la diferenciación de adipocitos. La estimulación de PPAR- γ en ratones knock-out para los genes C/EBP β así como C/EBP δ tiene como consecuencia la disminución en los niveles de GLUT-4 e IRS-2. Sin embargo la cantidad de RNAm codificante para LPL no se modifica, sugiriendo que la activación de la diferenciación no es el único evento que conlleva al desarrollo de la potencia de reguardo y funcionamiento adipocitario (Shao et. al., 2013; Yamamoto et. al., 2002).

Esta evidencia sugiere la participación activa de la semilla de cilantro disminuyendo la expresión de genes que correlaciona con una disminución de la actividad promovida por insulina, se ha evidenciado que los efectos se producen tanto en el receptor como los sustratos, situación que evoca los fenómenos

previamente descritos, que inducirían una menor actividad por parte del tejido a nivel genético. El mantenimiento de PPAR- γ 2 sin embargo, no se realiza mayoritariamente por este medio. Se ha demostrado que en cepas de ratón ob/ob, así como en cultivos celulares de líneas 3T3-L1, que la expresión de PPAR- γ 2, condiciona a un mayor resguardo lipídico. También se ha observado que el incremento de RNAm, correlaciona con el incremento de las fracciones proteicas del PPAR (Vidal-Puig et. al., 1996; Choi et. al., 2010; Liu, et.al., 2000)

El conjunto de cambios observados en el transcurso de los tiempos corte, evidencio la desregulación que induce la administración de una dieta lipídica. Los cambios séricos se presentan a temprana exposición, sin embargo se produce una disminución de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, que correlaciona con los primeros cambios a nivel histológico en tejido adiposo. Se ha descrito ampliamente que la interacción desregulada entre la sobre estimulación hepática, la falta de respuesta muscular y la distrofia pancreática son eventos clásicos en el desarrollo de enfermedades como el SM y la DM2. Paralelo a estos cambios se presenta la progresiva ganancia lipídica de triglicéridos en el tejido adiposo desarrollando hipertrofia, que sin embargo, no representa un reto importante que estimule cambios a nivel de expresión genética que codifican para las principales proteínas de respuesta involucradas en el correcto funcionamiento y respuesta a la insulina, parte que conforma la regulación más fina para recaptura de glucosa y en general la respuesta metabólica generalizada. De este modo observamos que el tejido respondió a la agresión del entorno mediante el desarrollo trófico, que sin embargo no indujo respuestas a nivel genético.

No obstante, la semilla de cilantro promueve efectos de regulación negativa a nivel proteico y genético en las células adipocitarias, que permitirían disminuir notablemente el daño producido por la dieta previniendo la pérdida de la funcionalidad celular, situación que conllevaría a evitar la retroalimentación del daño sistémico mediado por el tejido adiposo: se evitaría la lipólisis sostenida, una mejor función ante el resguardo calórico, mayor síntesis de adiponectina, disminución en la liberación de resistina, así como evitar el desarrollo de

fenómenos inflamatorios. Además, estos eventos apoyan la hipótesis de que la ingesta de semilla promueve la activación de vías metabólicas ectópicas que alivian el exceso calórico del entorno.

Grupo (Lipidos+Glucosa) Vs Grupo (Lipidos+Glucosa+Semilla)

Además de conocer este panorama, resulto interesante emular una mayor desregulación que estimule la respuesta máxima de la triada hepática-muscular y pancreática. La adición de glucosa a la dieta permitió conocer el estado máximo de compensación y mecanismos complementarios, ante la presencia del potenciador natural para liberación de insulina, lo que condujo al tejido adiposo a la máxima desregulación y subsecuentemente nuevos cambios en la respuesta, situación ideal para conocer más a fondo los efectos de la semilla de cilantro. La dieta hipercalórica de composición glúcida y lipídica presento una desregulación contundente en los parámetros séricos determinados, observando el claro desarrollo de hiperglicemia, hipertrigliceridemia así como la caída en los niveles de c-HDL, efecto que se presento desde los 30 días de exposición y continuo a los 60 y 90 días.

Es interesante, que a diferencia de la dieta lipídica, la adición de glucosa potencia el daño sistémico temprano así como el incremento de la respuesta, evidenciado por los cambios desde los 30 días de tratamiento. Estos cambios se evidencian directamente en los perfiles séricos con el perfil descrito clásicamente para la resistencia a insulina en tejido hepático, muscular y subsecuentemente el daño adipocitario. Sin embargo, la ingesta de glucosa vía oral, así como la liberación de glucosa causada por la desregulación hepática, condiciona a una respuesta pancreática elevada. Esta respuesta se encuentra determinada por la mayor liberación de insulina, que a su vez promueve la respuesta muscular y adipocitario de resguardo. Dicha respuesta debería ser suficiente para promover el resguardo lipídico y glúcido, sin embargo se observa que el ingreso calórico es mayor al que el sistema permite compensar eficazmente apareciendo los niveles de glucosa y triglicéridos elevados, así como la caída de los niveles circulante de HDL, como producto de su catabolismo incrementado. Los resultados muestran

que dicho comportamiento se presenta a lo largo del experimento, pero resulta interesante que los niveles presentan una elevación progresiva.

Estas condiciones desregulatorias han sido observadas y demostradas en diversos estudios. El desarrollo de hiperglicemia, hipertrigliceridemia así como la caída de HDL, es el perfil clásico de la enfermedad metabólica desarrollada por excesos calóricos y se acompaña de resistencia a la insulina. La fisiopatología de la resistencia insulínica conforma por una “tirada” clásica: 1) alteración de la secreción de insulina por las células β -pancreáticas, 2) resistencia a la insulina muscular y 3) resistencia a la insulina hepática; donde todos juegan un papel central en el desarrollo y progresión de la intolerancia a la glucosa. Esto deriva a una desregulación muscular, y en última instancia daño adipocitario. Dado que las concentraciones elevadas de glucosa en plasma, AGL y citoquinas pueden inducir resistencia a la insulina, es complicado dar el origen de la desregulación con certeza, pues es la coexistencia de todos estos eventos lo que permite la progresión e irreversibilidad del daño homeostático, en diferentes tejidos por medio de diferentes mecanismos (DeFronzo, 1988; DeFronzo, 1997; Tripathy, et. al., 2000; Reaven, et. al., 1989; Weyer et. al., 1999).

En adición a las consecuencias metabólicas producidas por la ingesta de lípidos, la ingesta de glucosa por vía oral, en conjunción con la sobreproducción de glucosa y lípidos hepática, estimula aun más la liberación de insulina, modificando la respuesta normal del tejido muscular y el adipocitario. Se ha descrito ampliamente que los estados hiperinsulinémicos se traducen en la atrofia de las vías de señalización estimuladas, generando baja en la sensibilidad a la insulina y resistencia en casos más graves, además se sabe que la recaptura de glucosa mediada por insulina, en individuos con DM2 disminuye hasta en 50%. Por tal razón se considera que la hiperglicemia se debe al incremento de la PHG, la ingesta de carbohidratos a la falta de respuesta muscular como determinantes de la concentración de glucosa en plasma en ayunas (Thiebaud et. al. 1982; DeFronzo et. al. 1989).

Sin embargo, el desarrollo de la desregulación lipídica tiene como punto clave el aumento de la oxidación de AGL. La oxidación de AGL excesiva conduce al incremento intracelular de acetil-CoA, que fomenta una ralentización del ciclo de Krebs. Estos eventos conducen a la acumulación de citrato, inhibidor de la fosfofructocinasa que provoca por efectos de formación la acumulación de glucosa-6-fosfato en la vía glucolítica. Este cambio induce la inhibición de hexoquinasa II. Disminuyendo la ruta glucolítica y generando la acumulación de glucosa libre intracelular que restringe el transporte de dicho carbohidrato en la célula a través del transportador GLUT4. Esta secuencia de acontecimientos, que fomenta la oxidación del plasma de los AGL, inhibe el transporte de glucosa en el músculo, la oxidación de la glucosa y la síntesis de glucógeno, que se conoce como el ciclo de Randle (Randle et. al., 1963; Chen et. al., 1999; DeFronzo 1997, Groop et. al. 1989; Reaven, 1995; Golay et. al. 1987).

Resulta interesante, que ante este perfil bioquímico sistémico de daño potenciado, la ingesta de semilla de cilantro promueve una regulación importante. En primera instancia promueve una disminución de los niveles de glucosa, que sin embargo no modifica los niveles de triglicéridos ni HDL. Esta evidencia sugiere una mejora en la respuesta tisular, probablemente mediado por insulina y la consecuente respuesta muscular, que promueve la internalización de glucosa. No obstante, el metabolismo de lípidos no sufre cambios por este efecto compensador. Sin embargo, el efecto se pierde notablemente a los 60 días observando que no modifica los niveles de glucosa ni HDL, además de que se presenta un incremento de triglicéridos circulantes. Esta situación no se había observado previamente, indicando que el efecto de la ingesta de semilla de cilantro es un factor limitante respecto al resguardo lipídico. En un ambiente fisiológico como el generado por la dieta, dicho resguardo se debe efectuar en tejido adiposo, pues posee la maquinaria biosintética necesaria para cubrir tal demanda. Por lo que conocer los cambios tróficos es de vital importancia, dichos eventos se discutirán posteriormente.

Antes de abordar estos cambios, es destacable que en el siguiente tiempo corte, y final del proceso experimental, la ingesta de semilla de cilantro, promueve una regulación de los niveles séricos de glucosa y triglicéridos, al tiempo que se aprecia, mantiene los niveles de HDL significativamente elevados, indicando una mejora de vital importancia a este nivel de estudio. Este entorno bioquímico apoya la hipótesis de que los principales efectos mediados por la ingesta de semilla de cilantro, son producidos por cambios en tejidos periféricos. Mientras que se destaca, dichos cambios no se presentarían primordialmente a nivel hepático.

De esta forma, evidenciamos que acorde a la bibliografía la dieta hipercalórica lipídica-glúcida, genera el daño y cambios clásicos a los tejidos de respuesta en distribución y resguardo: hígado, páncreas y musculo, cuya consecuencia metabólica es la sobre estimulación del tejido adiposo. A nivel histológico, los resultados evidenciaron un desarrollo hipertrófico importante y progresivo, llegando a ser de más del 300% respecto al grupo C. Este cambio correlaciono directamente a nivel zoométrico con la ganancia de perímetro abdominal y el incremento del porcentaje de grasa a los 30 días de trabajo, dichos cambios que evidencian el resguardo mayoritario a cargo del tejido adiposo blanco e indirectamente el depósito ectópico de lípidos. En complemento, la ganancia de triglicéridos en el tejido es fundamental para el análisis, pues observamos que desde el inicio del tratamiento se presento un incremento de triglicéridos en el tejido, el cual fue persistente y progresivo a los 60 y 90 días. Asimismo, se aprecio el incremento de IMC y pesos sustancial en los tiempos de 60 y 90 días. Aunque los resultados son contundentes y de distinta magnitud en comparación a los obtenidos con la dieta lipídica-glúcida, el contexto del daño en el triunvirato hígado, músculo y páncreas, promueve la desregulación adipocitaria, que a su vez terminara por impactar al sistema de forma importante, funcionando como un retroalimentador del daño previo. El desarrollo del tejido adiposo se asocia directamente a la obesidad y clásicamente a su progresión hacia SM y se relaciona con tres factores: índice de masa corporal alcanzada, duración de la obesidad, y el aumento en el peso corporal (Wannamethee & Shaper, 1999).

Sin embargo no solo el incremento del total de grasa tiene impacto sistémico, sino que el patrón de distribución de la grasa también es un predictor de la sensibilidad del cuerpo a la insulina, de modo que se ha observado que aumento de la grasa visceral se relaciona más específicamente con la presencia de resistencia a la insulina, además de los cambios morfológicos, la activación de proliferadores de diferenciación y resguardo se haya de la mano con este crecimiento, donde el PPAR- γ juega un papel fundamental para la capacidad de resguardo lipídico (Kolterman et. al., 1980; Gastaldelli et. al., 2000; Kashiwagi et. al., 1983; Bonora et. al., 1992). Además de estos efectos se ha demostrado que las células del tejido adiposo blanco, que predomina en la grasa visceral, promueven la síntesis y liberación de adipocinas inflamatorias (como IL-6, TNF- α , PAI-1 entre otros) (Zierath et. al., 1998) Arner, 2001)

Cuando el resguardo lipídico por parte del tejido adiposo es insuficiente, a pesar del desarrollo hipertrófico, se produce una liberación por “desborde” de los lípidos de tal modo que el sistema conduce a que el exceso de lípidos ingeridos se resguarde en tejido hepático y muscular exacerbando el desarrollo de resistencia grave a la insulina en estos órganos. Está bien descrito que en animales con mutaciones que limitan la adipogénesis, desarrollan una lipodistrofia que concluye en el depósito de grasa ectópica, liderado por la infiltración de grasa en el hígado y musculo, desatando resistencia a la insulina en ambos tejidos desatando además, alteración en la tolerancia a la glucosa. El desborde lipídico explica perfectamente el comportamiento hipertrófico que correlacionan con resistencia a la insulina incluso más que cualquier otra medida de la adiposidad y dicha hipertrofia celular predice el desarrollo hacia DM2 (Weyer et. al., 2000; (Kim et. al., 2000; Reue et. al., 2000; Péterfy et. al., 2001)

En términos sencillos, una vez que la máxima capacidad de resguardo del tejido adiposo se presenta, los lípidos se “desbordan” a otros tejidos (músculo y del hígado), donde los metabolitos intracelulares de metabolismo de los triglicéridos interfieren con la señalización de la insulina, la glucosa transporte / fosforilación, y la síntesis de glucógeno en el músculo y aumentar la gluconeogénesis hepática /

producción total de glucosa. De esta forma se confirma que el resguardo lipídico se fomenta por el ingreso de glucosa que a su vez estimula la respuesta insulínica necesaria para la actividad del tejido adiposo.

Además de dichos cambios, también se ha descrito que la hiperfosforilación del IRS, así como la fosforilación en sitios catalíticos distintos a las tirosinas, promueve la activación de mediador intracelulares como Shc, así como la activación del PPAR- γ (Kolterman et. al., 1980; Gastaldelli et. al., 2000). También se ha demostrado que en cepas de ratón ob/ob, así como en cultivos celulares de líneas 3T3-L1, que la expresión de PPAR- γ 2 se potencia para resguardo lipídico, que correlaciona con la cantidad de insulina presente en el medio. Estos eventos correlacionan directamente con el incremento de las fracciones proteicas del PPAR; pues se ha evidencia mediante western blot el incremento proteico en dichas circunstancias (Vidal-Puig et. al., 1996). Esta activación conlleva al incremento de la capacidad de resguardo de triglicéridos mediado por el ingreso y almacén en peroxisomas, sirviendo indirectamente como mediador de la capacidad hipertrófica del tejido mediada por la acción de la insulina en estados de sobre-estimulo calórico.

Es a este nivel de análisis donde los efectos de la ingesta de semilla de cilantro se tornan más evidentes, pues tras 30 días de exposición la semilla evita el desarrollo hipertrófico, así como la ganancia de triglicéridos en el tejido. No obstante, no produce cambios en el perímetro abdominal, como podría esperarse. En cambio, al segundo tiempo corte se observo un cambio de especial interés para el tratamiento, pues se observa que la semilla continua con el efecto protector ante el desarrollo hipertrófico donde además se presenta un desarrollo hiperplásico del tejido. Este cambio resulta de especial interés, pues es sugerente de una demanda excesiva del resguardo lipídico mediada por los cambios séricos observados. En complemento a este cambio, es importante y notorio que la ingesta de semilla de cilantro disminuye los índices zoométricos de mayor relevancia; perímetro abdominal, IMC y el porcentaje de grasa corporal, además de reflejar un menor resguardo de triglicéridos en el tejido adiposo.

De esta forma, se aprecia que la respuesta adipocitaria se encuentra altamente estimulada, principalmente por el excesivo aporte calórico, la desregulación sistémica y la respuesta potenciada por insulina. En dicho contexto, se ha descrito que el resguardo de triglicéridos, se realiza primordialmente en el tejido adiposo, por lo tanto el incremento de triglicéridos circulantes observados en este punto de corte conduce a pensar que la semilla de cilantro funciona como un agente limitante en la capacidad de resguardo y distensión del tejido adiposo blanco. Dicho cambio se refleja además en la disminución de los índices zoométricos. Sin embargo, ante la inminente falta de un medio de resguardo, el sistema se ve obligado a promover la activación de mecanismos que conduzcan a la proliferación y/o diferenciación celular como intento de formación de un sistema que realice tal función. Al punto final del estudio, se aprecia que histológicamente, la semilla evita el desarrollo trófico al tiempo que se promueve el desarrollo hiperplásico contundente en el tejido. Este cambio se acompaña nuevamente de la disminución en los niveles morfométricos determinados. Así como el nivel de triglicéridos resguardados en el tejido. Aunado a estos cambios, se aprecia una disminución significativa de los niveles de glucosa y triglicéridos, además de promover una mejora en los niveles de HDL. Estos cambios apoyan la hipótesis propuesta de que la semilla de cilantro sirve como limitante del desarrollo hipertrófico, cuya consecuencia estimula al sistema al desarrollo de un nuevo tejido adiposo recién diferenciado, que sea capaz de realizar el resguardo lipídico, así como la distribución del mismo debido a la diferenciación y presencia de tejido de resguardo en zonas anatómicas donde no se apreciaba previamente, al tiempo que se fomenta el depósito de sustratos energéticos en tejidos periféricos.

Durante la administración de la dieta calórica glúcida-lipídica. Se observó un importante efecto regulador a nivel sérico e histológico por parte de la semilla de cilantro. Sin embargo, la respuesta tisular no se había observado previamente, y ante tales cambios, es importante conocer la respuesta a insulina indirectamente, mediante el comportamiento del transportador GLUT-4. Los resultados observados demostraron que la expresión del transportador no presentó cambios después de 30 días de exposición a la dieta lipídica-glúcida.

Sin embargo, tras 60 y 90 días se observaron incrementos significativos. Resulta interesante observar, que la ingesta de semilla promueve un patrón de expresión inferior para GLUT-4, a los tres puntos de corte, indicando la presencia de un efecto constante bajo estas condiciones. Bajo el modelo descrito y caracterizado, el enfoque global de la desregulación sistémica apunta a pensar en la disminución de respuesta a la insulina. Como se ha mencionado previamente, la semilla de cilantro es rica en flavonoides, y sus compuestos mayoritarios han probado inhibir la recaptura de glucosa estimulada por insulina en adipocitos, mediante la promoción de la caída en la sensibilidad a la insulina, a través de la disminución en la activación de IRS-1, la falta de activación subsecuente de Akt así como, además de una disminución intrínseca debida a una diferenciación deficiente, inducida por falta de activación de todos los elementos involucrados en la misma, como PPAR- γ 2, C/EBP β así como C/EBP δ (Shao et. al., 2013; Nomura et. al., 2008; Prasad et. Al., 2009; Yamamoto et. al., 2002).

A diferencia de la dieta lipídica, el complemento de glucosa en la dieta promovió cambios séricos, tisulares y proteicos importantes. De la misma manera, se observaron cambios importantes a nivel de expresión genética. La interacción de insulina en el tejido adiposo, tiene como efecto ulterior, fomentar el ingreso de glucosa a la célula. Para realizar este fenómeno, se sirve de un complejo mecanismo proteico que implica la translocación del transportador GLUT-4. Este evento depende de la correcta fosforilación de las proteínas intermediarias, siendo fundamentales para tal evento las proteínas IRS y Akt, así como la síntesis efectiva del propio transportador GLUT-4. Como primer acercamiento, se realizó el estudio de la expresión de RNAm de dichas proteínas, el cual indicó un incremento en la expresión de Akt, así como de GLUT-4. Este incremento sugiere una situación compensadora ante una mayor demanda de actividad proteica, probablemente para mantener los sistemas de funcionamiento proteico eficazmente. Sin embargo resulta interesante que el IRS-2 no sufre modificaciones de expresión. Aunque existen pocos estudios respecto a la actividad del IRS-2, la presencia de esta expresión en condiciones basales, podría sugerir que la acción del mediador de acoplamiento se encuentra aun en buen funcionamiento, pues se

ha descrito que la activación del IRS-2 se presenta en estados compensatorio por resistencia insulínica y funciona como proteína de acoplamiento en la señalización río abajo, efecto que también ha sido observado en otros tejidos (Previs et. al.; 2000; Rondinone et. al., 1997; Withers et. al. 1998).

Por otra parte la activación de Shc indica la exigencia extracelular que fomenta la necesidad de un mayor resguardo lipídico, y esta hipótesis adquiere mayor fuerza al observar la regulación positiva del PPAR- γ , cuya funcionalidad se ha descrito previamente. Esta evidencia sugiere fuertemente que independiente del entorno metabólico, el tejido presenta un sufrimiento importante, que intenta compensar desde el nivel básico que compete a la expresión genética, fomentando la respuesta a la insulina como fuente de resguardo glucídico, así como la respuesta de mediadores que apoyen al resguardo lipídico, como lo sería la activación de los peroxisomas.

Posterior a los 60 días de exposición a la dieta, el patrón de expresión genético fue similar, con una regulación positiva para los codificantes de Akt y GLUT-4, acompañado de la sobreexpresión del RNAm de IRS-2. Este cambio, apunta a la aparición de un estatus de insulinoresistencia importante, e invita a ser estudiado mas fondo, pues sugiere la perdida de respuesta compensatoria del tejido adiposo, que como ha sido expuesto previamente tendría como consecuencia el impacto irreversible del daño sistémico. Además se aprecia que la regulación positiva del RNAm de Shc permanece intacta, situación que apoya la hipótesis del estímulo que conlleva a la necesidad de resguardo energético señalado por insulina. Sin embargo, no se aprecia una regulación positiva para PPAR- γ , destacando que este es un cambio transitorio. El cambio en el patrón de expresión genética se presento al final del experimento, pues se observo la regulación negativa de los codificantes de IRS-2, Akt, y GLUT-4, así como Shc como mediador de la vía proliferativa. Estos cambios proveen de un fuerte indicio de la perdida en la actividad intracelular mediada por insulina. De tal forma que en el punto final del experimento, se observa la máxima desregulación sistémica, así como adipocitaria, que promueve la resistencia insulínica y la ausencia de

actividad adipocitaria que tiene como consecuencia la promoción del estado desregulatorio sistémico competente a insulina. A pesar de los escasos reportes sobre estos cambios, se ha observado que en pacientes insulinoresistentes obesos, el RNAm de GLUT-4 es inferior respecto a los grupos control tanto en respuesta a la insulina como en su ausencia, acompañado de la pérdida de respuesta a insulina tanto en condiciones basales como posprandiales (Ducluzeau et. al., 2001).

En relación a la respuesta mediada por la ingesta de semilla de cilantro, la regulación promovida resulta ser notoria desde los 30 días de exposición. Los codificantes de IRS-2, Akt y Shc presentaron una regulación positiva importante. Mientras que la expresión de GLUT-4 y PPAR- γ permanece sin cambios. Como se ha mencionado, la aparición del codificante de IRS-2, es un fuerte indicativo de síntesis necesaria de la proteína, que a su vez obedece a los cambios fosforilativos en el IRS-1. De hecho, se ha observado que la luteolina, así como otros promueve la inhibición en sitios de tirosina del IRS-1, al tiempo que se presenta una disminución de la fosforilación de Akt que conlleva a la disminución en la recaptura de glucosa. (Shao et. al., 2013) Probablemente, este efecto transitorio, permitan la respuesta proteica normal, y en base a este cambio, se produce el ligero incremento en los codificantes de Shc y Akt. Sin que se presenten más cambios.

Sin embargo, estos cambios de regulación desaparecen tras 60 días de exposición al tratamiento. Se observó que la ingesta de semilla de cilantro genera una regulación negativa de los codificantes IRS-2, Akt, GLUT-4 y Shc, indicando nuevamente que los efectos competen a la vía de respuesta insulínica. Se ha mencionado previamente, que los flavonoides que componen a la semilla de cilantro, promueven la baja sensibilidad a la insulina, generando efecto antiobesidad a través de la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1. (Ahn et. al., 2008; Park et. al., 2009). Por esta razón, el efecto observado correlaciona con la hipótesis de la interferencia a nivel de receptor de insulina así como las proteínas de acoplamiento IRS durante el estímulo de la hormona. De esta manera

se puede inferir, que a causa de la ausencia de estímulo proteico, la expresión genética se deriva en una regulación negativa para los codificantes de las proteínas implicadas. Sin embargo, resulta interesante que la expresión de PPAR- γ permanece sin cambios respecto a la dieta lipídica-glúcida. Los resultados obtenidos muestran que el tejido adiposo sufre una regulación del comportamiento trófico, sobre este cambio, se he demostrado que cultivo de células 3T3-L1 la luteolina inhibe la acumulación de triglicéridos intracelulares, cuyo cambio apunta a la disminución en la expresión los factores de transcripción adipogénicos como el PPAR- γ (Park et. al., 2009). Este cambio, provee de información que sugiere que la semilla de cilantro limita el desarrollo trófico celular, y apoya la teoría de que en un intento por desarrollar un sistema de resguardo, se promueva la confluencia preadipocitaria y esto derive en la morfología hiperplásica observada. Después de 90 días de tratamiento, el efecto regulador de la semilla de cilantro se conserva, manteniendo la regulación negativa del RNAm de IRS-2, GLUT-4 y Shc, confirmando las acciones previamente descritas. Sin embargo, a pesar del elevado estatus hiperplásico observado en la morfología tisular, el codificante de PPAR- γ , unos de los promotores de diferenciación más estudiados y caracterizados en el tejido, sufre una regulación negativa notable. Este cambio correlaciona y confirma la hiptesis del desarrollo adipocitario en respuesta a la demanda energética. Se ha descrito que el tejido es capaz de fomentar adipogénesis, al tiempo que existe una inhibición de la lipogenesisis de novo-caracterizada por un descenso en los niveles de RNAm de SRBP-1, C/EBP α y PPAR- γ (Ahn et. al. 2008) Eventos que además guardan una estrecha relación con el cambio observado a nivel de triglicéridos en tejido, pues la ingesta de semilla disminuye significativamente la cantidad de los mismos. Sin embargo los efectos de los componentes de la semilla de cilantro, han demostrado tener efectos en otros tejidos, y aunque los estudios son escasos, Lee et. al. 2009 así como Khang et. al. 2010, han observado que la quercetina y luteolina inhiben la inflamación mediante la disminución en la producción de IKK β y NF- κ B. Además, Wein y colaboradores observaron que la quercetina redujo la concentración de glucosa en plasma aun en presencia de una dieta hipercalórica de origen lipídico.

Así mismo, dichos estudios confirmaron la actividad inhibidora sobre los niveles de RNAm de PPAR- γ ante la misma condición de dieta hiperlipídica. Aunado a estos cambios, observaron el incremento en los niveles de RNAm de adiponectina, lo que apunta a una correcta función celular, y la disminución de resistencia insulina en tejidos ectópicos.

De esta forma, la ingesta de semilla de cilantro promueve una limitación en la acción de la insulina y presentamos evidencia que sugiere la inactivación de PPAR- γ como responsable de la limitante hipertrófica, que en conjunción promueve un ambiente protector para el tejido adiposo. Complementariamente, la respuesta adipocitaria en mediadores como adiponectina podría presentarse de modo normal, reduciendo el impacto sistémico, así como una menor producción de citocinas inflamatorias que promuevan en el sistema, un mejor respuesta a la insulina.

En este contexto, Eid y colaboradores demostraron recientemente que en mioblastos murinos usados como modelo de musculo esquelético, la quercetina potencia la recaptura de glucosa, estimulando la vía de las AMPK. Otro estudio orientado a conocer la respuesta del transportador GLUT-4, demostró que la administración de quercetina en ratones ob/ob mejora la sensibilidad a la insulina reflejada por un incremento en la expresión de GLUT4. Así mismo, disminuye la fosforilación y activación de JNK y TNF α , siendo este camino correlacionado con los niveles normales de GLUT4 en estado desregulados. Por lo tanto, ambos estudios indican que la administración de este compuesto disminuye el estado inflamatorio en musculo, además de regular y revertir los efectos de resistencia (Anhê, et. al. 2012).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron que la ingesta de la dieta hiperlipídica promueve la desregulación sérica de glucosa, triglicéridos así como HDL. Esta desregulación se ve potenciada por la adición de glucosa por vía oral. Se observó que la ingesta de semilla promueve la disminución de triglicéridos ante la dieta lipídica; sin embargo este efecto no se observa con la adición de glucosa.

Aunado a estos cambios la ingesta de ambas dietas calóricas generó el incremento en el perímetro abdominal, porcentaje de grasa e IMC. Se observó que en comparación a la dieta lipídica-glúcida, la ingesta de semilla de cilantro promueve la disminución de estos índices.

Los cambios metabólicos promovidos por las dietas hipercalóricas se vieron reflejados en la ganancia de triglicéridos del tejido adiposo. Esta ganancia fue mayoritaria en la dieta lipídica-glúcida. Dichos cambios correlacionaron con el desarrollo hipertrófico del tejido, que guarda proporción con la ganancia lipídica. Estos cambios fueron regulados por la semilla de cilantro que actúa como limitante del desarrollo hipertrófico en ambas dietas, no obstante frente a la adición de glucosa se observó el desarrollo hiperplásico del tejido.

La expresión de los codificantes analizados no reflejó cambios ante la exposición a la dieta lipídica. Sin embargo, la semilla de cilantro promueve la regulación negativa de los RNAm analizados al final del tratamiento. En complemento, la dieta lipídica-glúcida generó la regulación positiva de los codificantes a los 30 y 60 días de tratamiento, para posteriormente disminuir la expresión al punto final del experimento. En este sentido la semilla promueve la regulación negativa en los genes analizados tras la exposición a 60 y 90 días del tratamiento lipídico-glúcido.

ANEXOS

Determinaciones Séricas de los metabolitos.

Determinación sérica de glucosa

Fundamento de la prueba: La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD):



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

Para realizar la determinación del analito, se requiere un espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm, cubetas de 1,0 cm de paso de luz, tubos de ensayo, gradilla, vortex, baño maría a 37°C. Primero se ajustan el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada y se pipetea en uno tubo de ensayo de la siguiente manera:

	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1	1	1
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C. Leer la absorbencia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Para conocer la concentración, se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{(Abs)_{Muestra}}{(Abs)_{Patrón}} \times \text{Concentración del patrón (100mg/dL)} = \text{mg/dL de glucosa en la muestra}$$

Determinación sérica de colesterol

Fundamento de la prueba: El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Para realizar la determinación del analito, se requiere un espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm, cubetas de 1,0 cm de paso de luz, tubos de ensayo, gradilla, vortex, baño maría a 37°C. Primero se ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada y se pipetea en uno tubo de ensayo de la siguiente manera:

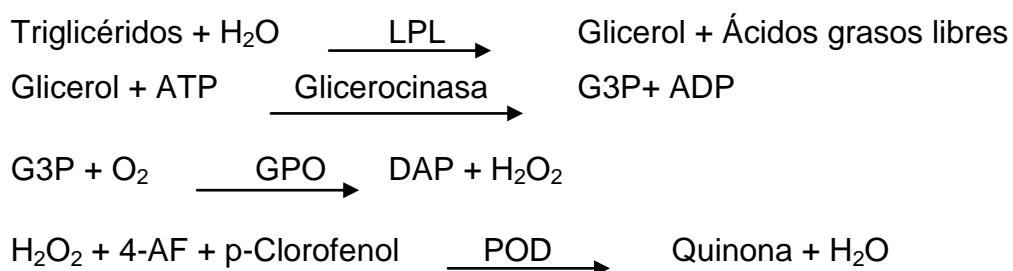
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1	1	1
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos. Para conocer la concentración, se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{(Abs)Muestra}{(Abs)Patrón} \times \text{Concentracion del patrón (200mg/dL)} = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

Determinación sérica de triglicéridos

Fundamento de la prueba: Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) reacciona con 4- aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Para realizar la determinación del analito, se requiere un espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm, cubetas de 1,0 cm de paso de luz, tubos de ensayo, gradilla, vortex, baño maría a 37°C. Primero se ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada y se pipetea en uno tubo de ensayo de la siguiente manera:

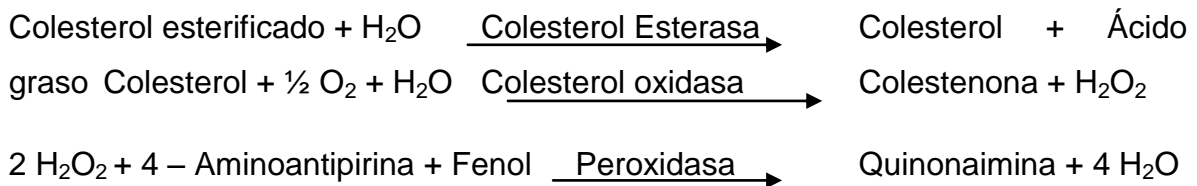
	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo (mL)	1	1	1
Patrón (μ L)	--	10	--
Muestra (μ L)	--	--	10

Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C 5. Leer la absorbencia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos. Para conocer la concentración, se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{(Abs)Muestra}{(Abs)Patrón} \times \text{Concentración del patrón (200mg/dL)} = \text{mg/dL de triglicéridos en la muestra}$$

Determinación sérica de colesterol HDL

Fundamento de la prueba: El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente: Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante contiene las lipoproteínas de elevada densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación:



El primer paso para esta técnica, es realizar la precipitación de las lipoproteínas LDL y VLDL, para lo cual pipeteamos en un tubo que va a ser centrifugado:

Muestra	200 µL
Reactivo (A) (kit de Colesterol HDL)	500 µL

Agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4.000 r.p.m.

Recoger con cuidado el sobrenadante (aproximadamente 150 µL de sobrenadante, sin mover el tubo para evitar el desprendimiento de las otras fracciones que han sedimentado).

Para realizar la determinación del analito, se requiere un espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm, cubetas de 1,0 cm de paso de luz, tubos de ensayo, gradilla, vortex, baño maría a 37°C. Primero se pipetea en un tubo de ensayo de la siguiente manera:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua Destilada	100 µL	--	--
Patrón de colesterol HDL	--	100 µL	--
Sobrenadante de muestra	--	--	100 µL
Reactivo de colesterol	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Una vez realizadas las muestras correspondientes, agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a 37°C. Y posteriormente, leer la absorbencia (A) del Patrón y de la Muestra, ajustando el espectrofotómetro a 500 nm frente al Blanco de reactivo. El color es estable durante al menos 30 minutos.

Para conocer la concentración de la muestra, se realizan las siguientes operaciones

$$\frac{(Abs)Muestra}{(Abs)Patrón} \times \text{Concentración del patrón (200mg/dL)} \times \text{factor de dilución (52,5 mg/dL)} = \text{mg/dL de colesterol HDL en la muestra}$$

Técnicas histológicas.

Deshidratación e inclusión en parafina

Una vez que se realizan los sacrificios de los animales, se procede a obtener el tejido adiposo retroventral para las distintas técnicas. Para el caso de las técnicas histológicas, tinción de PAS e inmunofluorescencia de Glut-4, la muestra se obtiene y se conserva en formalina tamponada con buffer de fosfatos al 10%. Se anestesia al espécimen con ketamina/xilazina por vía intraperitoneal y se procede a realizar la obtención del tejido.

Continuando con el proceso, la deshidratación del tejido para su posterior inclusión en parafina se realiza de la siguiente manera.

Deshidratación:

Formalina Neutra	Indefinido
Lavado con buffer de fosfatos (PBS)	3 veces
Alcohol 80%	1:30
Alcohol 80%	1:30
Alcohol 95%	1:30
Alcohol 95%	2:00
Alcohol Absoluto	1:30
Alcohol Absoluto	2:00
Xilol	1:30
Xilol	2:00
Parafina-Xilol	1:30
Parafina	1:30
Parafina	2:00

Una vez embebidos en el segundo cambio de parafina, se conservan los bloques listos para cortes, que se realizaron a 7 micras cada uno de ellos.

Tinción ácido peryódico de Schiff

La técnica del Ácido Periódico de Schiff (PAS), es utilizada para colorear carbohidratos y sustancias relacionadas con ellos.

El reactivo de PAS, consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido peryódico para incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presente en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente por el reactivo de Schiff. El ácido periódico es un oxidante selectivo, a través del cual el tejido es preparado por medio de una oxidación, reaccionando sobre los azúcares que contienen y los convierten en aldehídos, momento en que actúa el reactivo de Schiff.

El reactivo de Schiff, se conoció en el año 1886, como una recoloración de la fucsina básica, la cual es tratada con ácido sulfuroso, que hace desaparecer un doble enlace existente en el centro de la molécula, transformándose en una sustancia incolora (ácido sulfofucsínico o reactivo de Schiff). Cuando el reactivo de Schiff reacciona con dos grupos aldehídicos contiguos flanqueados por los correspondientes radicales OH, aparece de nuevo el doble enlace (grupo cromóforo) y, con él, la coloración rojo fucsia característica.

Reactivos necesarios:

- a) Solución de Acido peryódico al 5%
- b) Solución de ácido clorhídrico 1N
- c) Reactivo Schiff de Coleman
- d) Solución de hematoxilina de Harris

La secuencia de pasos para realizar la tinción es la siguiente:

Xilol	5 lavados
Alcohol 95%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Agua corriente	1 minuto

Agua destilada	1 minuto
Oxidar en la solución de ácido peryódico	15 minutos
Agua destilada	1 minuto
Colocar en reactivo de Schiff de Coleman	15 minutos
Lavar con agua tibia	10 minutos
Contrastar con hematoxilina de Harris	10 minutos
Agua corriente	15 minutos
Alcohol 95%	2 minutos
Alcohol 95%	2 minutos
Alcohol absoluto	2 minutos
Alcohol absoluto	2 minutos
Xileno	2 minutos
Xileno	2 minutos

Al final de procedimiento se monta con resina.

El glucógeno, mucinas y algunas membranas basales se tiñen de color rojo a púrpura, mientras los núcleos se tiñen azules.

Técnica para rojo oleoso

Propilenglicol al 85% y 100%

Solución de aceite rojo O al 0.5%

Acetite rojo O	0.5 g
Propilenglicol 100%	100 mL

Agregar pequeñas cantidades de propilenglicol al aceite rojo O, mezclar bien y triturar los tozos grandes. Gradualmente agregar el resto del propilenglicol revolviendo periódicamente. Calentar moderadamente hasta que la solución alcance los 95° C. No dejar que sobrepase los 100° C. Revolver mientras se

calienta y pasar a través de un papel filtro grueso. Dejarlo permanecer temperatura ambiente durante la noche. Filtrar a través de un filtro de vidrio poroso con la ayuda de vacío. Si la solución aparece turbia, filtrar nuevamente.

Jalea de glicerina para montar.

Grenetina	10 g
Agua destilada	60 mL

Calentar hasta la disolución y agregar:

Glicerina	70 mL
Fenol	1 mL

Procedimiento de tinción

Xilol	5 lavados
Alcohol 95%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Agua corriente	1 minuto
Agua destilada	1 minuto
Propilenglicol absoluto	5 minutos
Sumergir en la solución del aceite rojo O	72 horas
Solución de propilenglicol al 85%	3 enjuagues
Hematoxilina de Harris	10 minutos
Agua corriente	3 minutos
Agua destilada	2 cambios

Montar con jalea de glicerina.

Los núcleos se tiñen de color azul pálido y los lípidos de color rojo-naranja.

Determinación de triglicéridos en tejido

Para realizar la determinación de triglicéridos en tejido, el primer paso es obtener la muestra para ser analizada mediante un proceso de homogenado, tomando 900 μL de solución salina y 100 μL de tejido.

Una vez que se homogenea la muestra en su totalidad, se realiza una dilución, que consiste en tomar 100 μL del homogenado, mas 300 μL del solución salina. Esta dilución es considerada la muestra de análisis, que se obtiene por duplicado.

Las condiciones para determinar los triglicéridos en la muestra, se realizan de la misma forma que las muestras séricas ya descritas, utilizando solo 10 μL para la reacción.

Aislamiento de RNA total

TRIzol, es un reactivo listo para su uso, orientado a la extracción y aislamiento de ácidos nucleicos. El procedimiento se basa en las características de solubilidad que se tienen respecto a los componentes de la mezcla, así como una serie de separaciones y lavados posteriores, que lo convierten en una técnica de fácil acceso y buenos resultados. Después de homogeneizar la muestra con TRIzol, se añade cloroformo, y el homogeneizado se deja separar en una capa superior clara acuosa, una interfase, y una roja capa orgánica inferior. El ARN se precipitó de la capa acuosa con isopropanol. Dicho precipitado se lava para eliminar impurezas, y después se resuspende para su uso en aplicaciones posteriores. Los reactivos necesarios para el proceso son: cloroformo, alcohol isopropílico, etanol al 75% y Agua libre de RNasa.

El procedimiento utilizado en este proyecto se adaptó tomando en cuenta las condiciones propuestas por el fabricante. El resultado para optimizar el procedimiento de aislado se describe a continuación:

Técnica para tejido adiposo

Importante: Todos los reactivos deben estar a 4°C al inicio del proceso, y mantenerlos en hielo picado durante el mismo, para mantener la cadena de frío).

1. Añadir 1 ml de TRIzol por 200 mg de tejido adiposo, cuidando esta proporción y la cadena de frío, procurando una temperatura entre 2 y 8 °C. Se homogeneiza la muestra utilizando un envase de vidrio.
2. Una vez realizada la homogenización se procede a centrifugar la muestra a 12000g durante 10 minutos, a 4°C. Se toma con cuidado y se separa la fase superior, que es el componente mayor de la muestra: lípidos.
3. Pasar la fase intermedia a un tubo nuevo, dejándola incubar 5 minutos más a temperatura ambiente para disociación completa del complejo nucleoproteico.

4. Añadir 0,2 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Se deja incubar 5 minutos, posterior a esto, centrifugar la muestra a 12.000 g durante 15 minutos a 4 ° C, para separar la fase acuosa.

5. Tomar la fase acuosa de la muestra inclinando el tubo a 45 °. Evitar cualquier dibujo de la capa de interfase o fase orgánica en la pipeta. Colocar la fase acuosa a un tubo nuevo.

6. Adicionar 0.5 mL de isopropanol Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y después centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos a 4 ° C.

7. Decantar el sobrenadante para recuperar el pellet de RNA. Lavar el precipitado con 300 µL de etanol al 75%. Se resuspende la muestra y posteriormente se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C. Este procedimiento se repite una vez, desechando el primer lavado.

Nota: El ARN puede ser almacenado en etanol al 75% por lo menos 1 año a -20 ° C, o por lo menos 1 semana a 4 ° C.

8. Secar el precipitado de ARN durante 5-10 minutos. No secar el sedimento por centrifugación al vacío. No se debe permitir que el ARN se seque por completo, porque la pastilla puede perder solubilidad, cristalizar y la muestra se vuelve inutilizable. Proceder a la re suspensión de ARN hasta el momento en que se vaya a utilizar según la técnica deseada.

9. Resuspender el pellet de ARN en agua libre de RNasas haciendo pasar la solución arriba y hacia abajo varias veces a través de la punta de la pipeta. El volumen de agua se ajusta, dependiendo de la cantidad del pellet observable, teniendo de esta forma, muestras de concentraciones similares. Se procede a determinar la concentración de la muestra.

Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Todas la muestras que serán sujetas a la amplificación de genes. Son sometidas a digestión con DNAsa de la siguiente manera, considerando los parámetros de la muestra para RT-PCR.

El protocolo de reacción es el siguiente:

Pipetear en un tubo de 0.20 μL libre de DNAsas y RNAsas:

RNA total	6.6 μL
10x DNasa I Reaction Buffer	1 μL
DNasa amplification grade	0.30 μL
Free Nuclease Water	2.1 μL
Total	10 μL

Posteriormente la muestra se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se agrega 1 μL de EDTA y se incuba durante 5 minutos a 65° C.

Una vez terminado este procedimiento se continúa de inmediato con el protocolo de la RT- PCR.

Al volumen previo se anexa 1 μL de hexámeros y se procede a incubar durante 5 minutos nuevamente a 65° C y una vez cumplid este tiempo. Se agrega a a la mezcla de reacción, los siguientes componentes:

5x Reaction Buffer	4 μL
Ribolock RNase inhibitor (20 U/ μL)	1 μL
10 μM dNTPmix	2 μL
RevertAidMinus MMvLV reverse transcriptase (20 U/ μL)	1 μL
Volumen final	20 μL

Posteriormente se lleva la muestra al termociclador, y se incuba durante 60 minutos a 42° C.

Una vez concluido este procedimiento se realiza una incubación durante 5 minutos a 70° C.

Protocolo de PCR

En un tubo de 0.20 µL y libre de DNAsas, pipetear para un volumen final de reacción de 50 µL:

PCR Master Mix(x2)	25 µL
Forward Primer	0.1 – 1.0 µM
Reverse Primer	0.1 – 1.0 µM
Platilla de DNA	10 pg – 1 µg
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 50 µL
Total	50 µL

Condiciones finales para protocolo de PCR según el gen correspondiente

	T° Alineamiento	Ciclos
Rps29	59.1	33
PPAR-γ	59.1	35
IRS-2	63	36
Shc	61.5	30
Akt	61.5	35
Glut-4	60.6	36

Corrimiento de las muestras en gel se agarosa

Con el objetivo de verificar como primer paso la integridad del RNA total. Se realizo una corrida en un gel de agarosa de concentración porcentual 0.8%. Se deja gelificar y se procede a colocarlos en la cámara de electroforesis con buffer de corrimiento (TAE 1X) y se dejó correr el gel durante 60 minutos y 70 volts, para su posterior visualización en el transiluminador.

Para el corrimiento de los productos de PCR, se preparan geles de agarosa de concentración porcentual 1.5% (para los genes de amplicones más grandes, IRS-2, Akt, Glut-4 y shc) y 3% (para Rps29 y PPAR- γ). Los geles de concentración 1.5% se dejaron correr durante 70 minutos a 60 volts y los geles de concentración 3% durante 90 minutos a 60 volts.

Secuencias de los primers utilizados

GEN	Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tm °C	%GC	Long. iniciador	Amplicon (bases)
PPAR- γ 2	Sentido	CAGAAACTGGGAGTAGCCTG	60.23	55	20	159
	Antisentido	CCTTGGATATTAGTGGTTCACAGC	61.75	45	24	
Rps29	Sentido	GTCTGAAGGCAAGATGGGTC	60.88	55	20	215
	Antisentido	GGGTAGACAGTCGAATCATCC	60.15	52	21	
IRS-2	Sentido	CCAGTAGTCCTGCTTCATCC	60.01	55	20	514
	Antisentido	CTGGCTGACTTGAAGGAAGG	60.81	55	20	
Glut-4	Sentido	CTGAGCTGAAGGATGAGAAACG	61.49	50	22	510
	Antisentido	CAGTTGGAGAAACCAGCTACAG	61.38	50	22	
Akt-1	Sentido	CTTCTCAGTGGCACAATGTCAG	61.95	50	22	526
	Antisentido	CGTACTCCATGACAAAGCAGAG	61.49	50	22	
Shc	Sentido	GGAAGGAGTAACCTGAAGTTTGC	61.88	47	23	554
	Antisentido	CTGTTTACGGACTTCATGGTCTC	61.43	47	23	

Resultados de RT-PCR (normalizados del gen constitutivo).

Para conocer los cambios producidos en los niveles de ARNm de los genes involucrados, se empleo la técnica de RT-PCR y posteriormente se elaboró un analisis densitometrico del productos obtenidos en el corrimiento electroforético para el grupo control y los grupos problema. Una vez efectuado, los valores obtenidos fueron normalizados con los datos del analisis de expresion de la proteina ribosomal 29 (Rps29); utilizada como gen de expresion constitutiva.

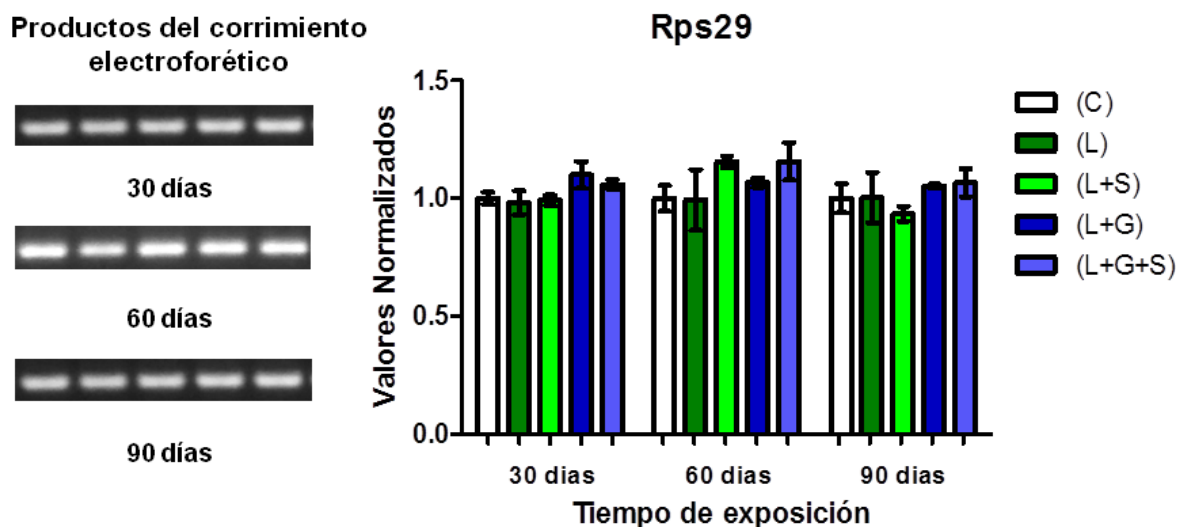


Figura 12. Efecto de los distintos retos dietéticos a los 30, 60 y 90 días de exposición, en los niveles de RNAm de Rps29. Los niveles de ARNm fueron determinados por RT-PCR realizando un análisis densitométrico de los productos. Los valores del grupo problema fueron normalizados con la media del grupo control negativo (C). Cada barra representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

BIBLIOGRAFIA

Abumrad, N. A., Perkins, R. C., Park, J. H., & Park, C. R. (1981). Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem*, 256(17), 9183-9191.D

Adams, M., Montague, C. T., Prins, J. B., Holder, J. C., Smith, S. A., Sanders, L., & O'Rahilly, S. (1997). Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 100(12), 3149.

Adeli, K., Taghibiglou, C., Van Iderstine, S. C., & Lewis, G. F. (2001). Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends in cardiovascular medicine*, 11(5), 170-176.

Aerts, J. M., Ottenhoff, R., Powlson, A. S., Grefhorst, A., van Eijk, M., Dubbelhuis, P. F. & Overkleeft, H. S. (2007). Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes*, 56(5), 1341-1349.

Afzaal S, Wahab A. (2002) Thiazolidinediones: Beyond Glycemic Control.

Agius, L., & Peak, M. (1997). Binding and translocation of glucokinase in hepatocytes. *Biochemical Society Transactions*, 25(1), 145-150.

Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J., & Ha, T. (2008). The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 373(4), 545-549.

Anhê, G. F., Okamoto, M. M., Kinote, A., Sollon, C., Lellis-Santos, C., Anhe, F. F. & Machado, U. F. (2012). Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. *European journal of pharmacology*, 689(1), 285-293.

Argueta, V.A., y Cano, A.L. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. pp. 443-444.

Arner, P. (2001). Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 72-75.

Argyropoulos, G., & Harper, M. E. (2002). Invited review: uncoupling proteins and thermoregulation. *Journal of Applied Physiology*, 92(5), 2187-2198.

Aronoff, S., Rosenblatt, S., Braithwaite, S. U. S. A. N., Egan, J. W., Mathisen, A. L., & Schneider, R. L. (2000). Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month

randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes care*, 23(11), 1605-1611.

Asociación Latinoamericana de Diabetes (2006) Guías ALAD 2006 para el diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.

Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. In *Insulin Action* (pp. 31-48). Springer US.

Al-Jafari, A. A., & Cryer, A. (1986). The lipoprotein lipase of white adipose tissue. Changes in the adipocyte cell-surface content of enzyme in response to extracellular effectors in vitro. *Biochem. J*, 238, 239-246.

Backer, J. M., Myers Jr, M. G., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M & Schlessinger, J. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO journal*, 11(9), 3469.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

Bakker, A. H., Dielen, F. M., Greve, J. W. M., Adam, J. A., & Buurman, W. A. (2004). Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obesity Research*, 12(3), 488-498.

Bajaj, M., Suraamornkul, S., Piper, P., Hardies, L. J., Glass, L., Cersosimo, & DeFronzo, R. A. (2004). Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(1), 200-206.

Bahl, J. J., Matsuda, M., DeFronzo, R. A., & Bressler, R. (1997). In vitro and in vivo suppression of gluconeogenesis by inhibition of pyruvate carboxylase. *Biochemical pharmacology*, 53(1), 67-74.

Bazuine, M., van den Broek, P. J., & Maassen, J. A. (2005). Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 326(2), 511-514.

Barroso, I., Luan, J. A., Middelberg, R. P., Harding, A. H., Franks, P. W., Jakes, R. W. & Wareham, N. J. (2003). Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in β -cell function as well as insulin action. *PLoS biology*, 1(1), e20.

Bergman, R. N., & Ader, M. (2000). Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(9), 351-356.

Bhakoo, O. N., & Scopes, J. W. (1974). Minimal rates of oxygen consumption in small-for-dates babies during the first week of life. *Archives of disease in childhood*, 49(7), 583-585.

Bhattacharya, S., Dey, D., & Roy, S. S. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *Journal of biosciences*, 32(2), 405-413.

Bhuiyan, M. N. I., Begum, J., & Sultana, M. (2009). Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(2), 150-153.

Birgel, M., Gottschling-Zeller, H., Röhrig, K., & Hauner, H. (2000). Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(6), 1682-1687.

Booth, F. W., Gordon, S. E., Carlson, C. J., & Hamilton, M. T. (2000). Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *Journal of Applied Physiology*, 88(2), 774-787.

Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H. C., Marinopoulos, S., & Brancati, F. L. (2007). Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 147(6), 386-399.

Bonora, E., Del Prato, S., Bonadonna, R. C., Gulli, G., Solini, A., Ghiatas, & DeFronzo, R. A. (1992). Total body fat content and fat topography are associated differently with in vivo glucose metabolism in nonobese and obese nondiabetic women. *Diabetes*, 41(9), 1151-1159.

Boden, G., Chen, X. I. N. H. U. A., Ruiz, J., White, J. V., & Rossetti, L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *Journal of Clinical Investigation*, 93(6), 2438.

Bortoluzzi, M. N., Attoub, S., Moizo, L., Le Marchand-Brustel, Y., Kermorgant, S., Lehy, T., ... & Bado, A. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature: International weekly journal of science*, 394(6695), 790-793.

Bray, G. A., & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity!. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1157-1173.

Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models:

metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of molecular endocrinology*, 36(3), 485-501.

Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798-808.

Bi, S., & Moran, T. H. (2002). Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides*, 36(2), 171-181.

Cannon, B., & Nedergaard, J. A. N. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*, 84(1), 277-359.

Castrejón, V., Carbó, R., & Martínez, M. (2007). Mecanismos Moleculares que Intervienen en el Transporte de la Glucosa. *REB*, 26(2), 49-57.

Chakravarthy, M. V., & Booth, F. W. (2004). Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *Journal of Applied Physiology*, 96(1), 3-10.

Cheng, A., Dubé, N., Gu, F., & Tremblay, M. L. (2002). Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *European Journal of Biochemistry*, 269(4), 1050-1059.

Chithra, V., & Leelamma, S. (1997). Hypolipidemic effect of coriander seeds (*Coriandrum sativum*): mechanism of action. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(2), 167-172. Charles River Laboratories International, Inc.; 2015

Choi, S. M., Tucker, D. F., Gross, D. N., Easton, R. M., DiPilato, L. M., Dean, A. & Birnbaum, M. J. (2010). Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 30(21), 5009-5020.

Chen, X., Iqbal, N., & Boden, G. (1999). The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 103(3), 365.

Chin, J. E., Dickens, M., Tavaré, J. M., & Roth, R. A. (1993). Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6338-6347.

Choi, S. Y., Hirata, K. I., Ishida, T., Quertermous, T., & Cooper, A. D. (2002). Endothelial lipase a new lipase on the block. *Journal of lipid research*, 43(11), 1763-1769.

Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E., & Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *Journal of Clinical Investigation*, 108(12), 1875.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., ... & Caro, J. F. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, 334(5), 292-295.

Cohen, S. L., Halaas, J. L., Friedman, J. M., Chait, B. T., Bennett, L., Chang, D., ... & Collins, F. (1996). Characterization of endogenous human leptin. *Nature*, 382, 589.

Cinti, S. (2006). The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 16(8), 569-574.

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*, 46(11), 2347-2355.

Clarke, S. D. (2000). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition*, 83(S1), S59-S66.

Day, C. (1999). Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabetic Medicine*, 16(3), 179-192.

DeFronzo, R. A. (1988). The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 37(6), 667-687.

DEFRONZO, R. A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes.

DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., & Simonson, D. C. (1989). Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism*, 38(4), 387-395.

De Fea, K., & Roth, R. A. (1997). Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry*, 36(42), 12939-12947.

DeFronzo, R. A. (1999). Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*, 131(4), 281-303.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., ... & Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 253.

Diaz J.C., Juarez M. A. (2007) Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida. McGraw Hill. Segunda Edición. ISBN 970-10-4818-0

Dulloo, A. G., & Samec, S. (2001). Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. *British Journal of Nutrition*, 86(02), 123-139.

Ducluzeau, P. H., Perretti, N., Laville, M., Andreelli, F., Vega, N., Riou, J. P., & Vidal, H. (2001). Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes*, 50(5), 1134-1142.

Exton, J. H., Corbin, J. G., & Park, C. R. (1969). Control of gluconeogenesis in liver IV. Differential effects of fatty acids and glucagon on ketogenesis and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 244(15), 4095-4102.

Eid, H. M., Martineau, L. C., Saleem, A., Muhammad, A., Vallerand, D., Benhaddou-Andaloussi, A., ... & Haddad, P. S. (2010). Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Molecular nutrition & food research*, 54(7), 991-1003.

Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., ... & Rutter, W. J. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 40(4), 747-758. **FIND**

Ehrmann, D. A., Schneider, D. J., Sobel, B. E., Cavaghan, M. K., Imperial, J., Rosenfield, R. L., & Polonsky, K. S. (1997). Troglitazone Improves Defects in Insulin Action, Insulin Secretion, Ovarian Steroidogenesis, and Fibrinolysis in Women with Polycystic Ovary Syndrome 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(7), 2108-2116.

Eid, H. M., Martineau, L. C., Saleem, A., Muhammad, A., Vallerand, D., Benhaddou-Andaloussi, A., ... & Haddad, P. S. (2010). Stimulation of

AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Molecular nutrition & food research*, 54(7), 991-1003.

Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 606-619. **FIND**

Erlanson-Albertsson, C. (2003). The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta physiologica scandinavica*, 178(4), 405-412.

Errico, T. L., Chen, X., Campos, J. M. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 25(2), 98-103.

Eva Kassi, Panagiota Pervanidou, Gregory Kaltsas and George Chrousos (2011) Metabolic syndrome: definitions and controversies.

Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, 4(4), 263-273.

Fawcett D. W. (1995) Tratado de Histología. Bloom Fawcett. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 12ª edición. ISBN 968-25-2450-4

Ferris, W. F., & Crowther, N. J. (2011). Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue: review article. *Cardiovascular journal of Africa*, 22(3), 147-154.

Flores-Riveros, J. R., McLenithan, J. C., Ezaki, O., & Lane, M. D. (1993). Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: effects on transcription and mRNA turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 512-516.

Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.

Forman, B. M., Chen, J., & Evans, R. M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4312-4317.

Freedland, E. S. (2004). Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 1(1), 12.

Gallou-Kabani, C., & Junien, C. (2005). Nutritional epigenomics of metabolic syndrome new perspective against the epidemic. *Diabetes*, 54(7), 1899-1906.

Garaulet, M., Hernandez-Morante, J. J., Lujan, J., Tebar, F. J., & Zamora, S. (2006). Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *International journal of obesity*, 30(6), 899-905.

Gavin 3rd, J. R., & Bohannon, N. J. (2010). A review of the response to oral antidiabetes agents in patients with type 2 diabetes. *Postgrad Med*, 122(3), 43-51.

Gonzales, A. M., & Orlando, R. A. (2007). Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr Metab (Lond)*, 4, 22.

Goldberg, I. J., Eckel, R. H., & Abumrad, N. A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase-and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S86-S90.

Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., Simoneau, J. A., & Kelley, D. E. (1997). Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes*, 46(10), 1579-1585.

Gastaldelli, A., Baldi, S., Pettiti, M., Toschi, E., Camastra, S., Natali, A., ... & Ferrannini, E. (2000). Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes*, 49(8), 1367-1373.

Groop, L. C., Bonadonna, R. C., Simonson, D. C., Petrides, A. S., Shank, M. Y. R. O. N., & DeFronzo, R. A. (1992). Effect of insulin on oxidative and nonoxidative pathways of free fatty acid metabolism in human obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 263(1), E79-E84.

Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 367-377.

Golay, A., Swislocki, A. L. M., Chen, Y. I., & Reaven, G. M. (1987). Relationships between plasma-free fatty acid concentration, endogenous glucose production, and fasting hyperglycemia in normal and non-insulin-dependent diabetic individuals. *Metabolism*, 36(7), 692-696.

Geloen, A., Roy, P. E., & Bukowiecki, L. J. (1989). Regression of white adipose tissue in diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 257(4), E547-E553.

Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131(2), 242-256.

Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews*, 78(3), 783-809.

Gross, M. (2004). Flavonoids and cardiovascular disease. *Pharmaceutical biology*, 42(s1), 21-35.

Grummer, R. R., & Carroll, D. J. (1988). A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *Journal of Animal Science*, 66(12), 3160-3173.

Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., ... & Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, 112(17), 2735-2752.

Gottschling-Zeller, H., Röhrig, K., & Hauner, H. (2000). Troglitazone reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in cultured human adipocytes. *Diabetologia*, 43(3), 377-383.

Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87(1), 99-109.

Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., & Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 37(3), 753-768.

Halliwel, K. J., Fielding, B. A., Samra, J. S., Humphreys, S. M., & Frayn, K. N. (1996). Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast. *Journal of lipid research*, 37(9), 1842-1848.

Hausman, G. J., & Hausman, D. B. (2006). Search for the preadipocyte progenitor cell. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3103.

Herman, M. A., & Kahn, B. B. (2006). Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1767.

Hernández A.G. (2010) Tratado de nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Madrid Panamericana. Segunda edición. ISBN 978-84-9835-346-4.

Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*, 11(1), 11-18.

Inzucchi, S. E. (2002). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *Jama*, 287(3), 360-372.

Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912.

Kahn, C. R., & White, M. (1988). The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *Journal of Clinical Investigation*, 82(4), 1151.

Kim, J. K., Gavrilova, O., Chen, Y., Reitman, M. L., & Shulman, G. I. (2000). Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8456-8460.

Kashiwagi A, Verso MA, Andrews J, Vasquez B, Reavan GM, Foley JE (1983). In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 72(4), 1246.

Kolterman, O. G., Insel, J., Saekow, M., & Olefsky, J. M. (1980). Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. *Journal of Clinical Investigation*, 65(6), 1272.

Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X. J., Fahlman, R., Myers, M. G., ... & Zierath, J. R. (2000). Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 49(2), 284-292.

Kalhan, S. C., Mahajan, S., Burkett, E., Reshef, L., & Hanson, R. W. (2001). Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12928-12931.

Kim, K. H. (1997). Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annual review of nutrition*, 17(1), 77-99.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., & Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & metabolism*, 30(4), 294-309.

Kruszynska, Y. T., Worrall, D. S., Ofrecio, J., Frias, J. P., Macaraeg, G., & Olefsky, J. M. (2002). Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 226-234.

Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M., & Natori, T. (1992). Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications: Otsuka

Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C. P., Lee, J. H., Kruhlak, M., & Levine, M. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *The FASEB Journal*, 21(2), 366-377.

Kang, O. H., Choi, J. G., Lee, J. H., & Kwon, D. Y. (2010). Luteolin isolated from the flowers of *Lonicera japonica* suppresses inflammatory mediator release by blocking NF- κ B and MAPKs activation pathways in HMC-1 cells. *Molecules*, 15(1), 385-398.

Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., & Viberti, G. (2006). Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *New England Journal of Medicine*, 355(23), 2427-2443.

Kubo, I., Fujita, K. I., Kubo, A., Nihei, K. I., & Ogura, T. (2004). Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3329-3332.

Kuk, J. L., & Ross, R. (2009). Influence of sex on total and regional fat loss in overweight and obese men and women. *International Journal of Obesity*, 33(6), 629-634.

Lazar, M. A. (2005). How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*, 307(5708), 373-375.

Lebovitz, H. E., Dole, J. F., Patwardhan, R., Rappaport, E. B., & Freed, M. I. (2001). Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(1), 280-288.

Lee, J., & Pilch, P. F. (1994). The insulin receptor: structure, function, and signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(2), C319-C334.

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., & Kliewer, S. A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 12953-12956.

Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 41(11), 1422-1428.

Lee, S. H., Kim, Y. J., Kwon, S. H., Lee, Y. H., Choi, S. Y., Park, J. S., & Kwon, H. J. (2009). Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB reports*, 42(5), 265-270.

Lam, T. K., Carpentier, A., Lewis, G. F., van de Werve, G., Fantus, I. G., & Giacca, A. (2003). Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 284(5), E863-E873.

Liu, H., Kublaoui, B., Pilch, P. F., & Lee, J. (2000). Insulin activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase and Akt is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in rat adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 274(3), 845-851.

Lekstrom-Himes, J., & Xanthopoulos, K. G. (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28545-28548.

Lozoya, X., Velázquez, D.G., y Flores, A.A. (1992). La medicina tradicional en México. En: Plantas Medicinales de México: Introducción a su estudio. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Unidad de Estudios Etnobotánicos. (2): 169-198.

Maedler, K., Carr, R. D., Bosco, D., Zuellig, R. A., Berney, T., & Donath, M. Y. (2005). Sulfonylurea induced β -cell apoptosis in cultured human islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(1), 501-506.

Marcela, R. J. (2012). Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 136-144.

Mathews C., Van Holde K. E., Apling D., Spencer (2013) Bioquímica. Pearson Education. Cuarta edición. ISBN 9788490353110

Manzano, S., & Williamson, G. (2010). Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular nutrition & food research*, 54(12), 1773-1780.

Nomura, M., Takahashi, T., Nagata, N., Tsutsumi, K., Kobayashi, S., Akiba, & Miyamoto, K. I. (2008). Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(7), 1403-1409.

Martins, I. J., & Redgrave, T. G. (2004). Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine?. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(3), 130-141.

Massillon, D., Barzilai, N., Hawkins, M., Prus-Wertheimer, D., & Rossetti, L. (1997). Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes*, 46(1), 153-157.

Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., ... & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine*, 1(11), 1155-1161.

Mittelman, S. D., & Bergman, R. N. (2000). Inhibition of lipolysis causes suppression of endogenous glucose production independent of changes in insulin. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 279(3), E630-E637.

Merkel, M., Eckel, R. H., & Goldberg, I. J. (2002). Lipoprotein lipase genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of lipid research*, 43(12), 1997-2006.

Montalto, M. B., & Bensadoun, A. (1993). Lipoprotein lipase synthesis and secretion: effects of concentration and type of fatty acids in adipocyte cell culture. *Journal of lipid research*, 34(3), 397-407.

Massillon, D., Barzilai, N., Hawkins, M., Prus-Wertheimer, D., & Rossetti, L. (1997). Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes*, 46(1), 153-157.

Mauriege, P., Imbeault, P., Langin, D., Lacaille, M., Almeras, N., Tremblay, A., & Despres, J. P. (1999). Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. *Journal of lipid research*, 40(9), 1559-1571.

Maury, E., & Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 314(1), 1-16. McCarthy, A. M., & Elmendorf, J. S. (2007). GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian Journal of Medical Research*, 125(3), 373.

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., ... & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263-1284.

McDevitt, R. M., Bott, S. J., Harding, M., Coward, W. A., Bluck, L. J., & Prentice, A. M. (2001). De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *The American journal of clinical nutrition*, 74(6), 737-746.

Meegalla, R. L., Billheimer, J. T., & Cheng, D. (2002). Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochemical and biophysical research communications*, 298(3), 317-323.

Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 77(5), 1146-1155.

Morrison, R. F., & Farmer, S. R. (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *The Journal of nutrition*, 130(12), 3116S-3121S.

Murray R., Granner D., Mayes P., Rodwell. (1999). Bioquímica de Harper. México. Manual moderno S.A. de C.V. 1999. ISBN 968-426-756-8

Myers MG Jr, White MF (2002) The Molecular Basis of Insulin Action. En: Insulin Signaling: From cultured cells to animal models. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, New York, pp 55-87. FIND

Nadeem, M., Muhammad Anjum, F., Issa Khan, M., Tehseen, S., El-Ghorab, A., & Iqbal Sultan, J. (2013). Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.) A review. *British Food Journal*, 115(5), 743-755.

Naquvi, K. J., Ali, M., & Ahamad, J. (2004). Antidiabetic activity of aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. fruits in streptozotocin induced rats. *Indian J Exp Biol*, 42(9), 909-912.

Nelson D. and Cox M. (2008) Principles of biochemistry. Freeman and company. Quinta edición. ISBN 978-0-7167-7108-1

Newton, A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28495-28498.

Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical Reviews*, 101(8), 2353-2364.

Oakes, N. D., Camilleri, S., Furler, S. M., Chisholm, D. J., & Kraegen, E. W. (1997). The insulin sensitizer, BRL 49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat. *Metabolism*, 46(8), 935-942.

Padmaa M Paarakh (2009) *Coriandrum sativum* Linn.

Parks, E. J. (2002). Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S247-S253.

Permutt, M. A., Wasson, J., & Cox, N. (2005). Genetic epidemiology of diabetes. *Journal of clinical Investigation*, 115(6), 1431.

Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 165.

Peyssonnaud, C., & Eychène, A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the Cell*, 93(1-2), 53-62.

Phillips, L. S., Grunberger, G., Miller, E., Patwardhan, R., Rappaport, E. B., & Salzman, A. (2001). Once-and twice-daily dosing with rosiglitazone improves glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 24(2), 308-315.

Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., & Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early human development*, 10(1), 1-11.

Poitout, V., & Robertson, R. P. (2002). Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, 143(2), 339-342.

Ranganathan, G., Unal, R., Pokrovskaya, I., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Lecka-Czernik, B., ... & Kern, P. A. (2006). The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *Journal of lipid research*, 47(11), 2444-2450.

Reginato, M. J., & Lazar, M. A. (1999). Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 10(1), 9-13.

Ron, D., & Kazanietz, M. G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *The FASEB Journal*, 13(13), 1658-1676.

Ronti, T., Lupattelli, G., & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical endocrinology*, 64(4), 355-365.

Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*, 14(11), 1293-1307

- Rosenheck, R. (2008). Fast food consumption and increased caloric intake: a systematic review of a trajectory towards weight gain and obesity risk. *Obesity Reviews*, 9(6), 535-547
- Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A. M., Bouillaud, F., & Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53(suppl 1), S130-S135.
- Saini, V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 1(3), 68.
- Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a008417.
- Schaefer, E. J., Eisenberg, S., & Levy, R. I. (1978). Lipoprotein apoprotein metabolism. *Journal of lipid research*, 19(6), 667-687.
- Schaffer, J. E., & Lodish, H. F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, 79(3), 427-436.
- Schwarz, J. M., Linfoot, P., Dare, D., & Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *The American journal of clinical nutrition*, 77(1), 43-50.
- Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB journal*, 9(9), 726-735.
- Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of lipid research*, 48(6), 1253-1262.
- Shao, D., & Lazar, M. A. (1997). Peroxisome proliferator activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21473-21478.
- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., ... & Heymsfield, S. B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obesity research*, 11(1), 5-16.
- Shi, Y., & Cheng, D. (2009). Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(1), E10-E18.

Smith, S. A., Lister, C. A., Toseland, C. D. N., & Buckingham, R. E. (2000). Rosiglitazone prevents the onset of hyperglycaemia and proteinuria in the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2(6), 363-372.

Stephenson, T., Budge, H., Mostyn, A., Pearce, S., Webb, R., & Symonds, M. E. (2001). Fetal and neonatal adipose maturation: a primary site of cytokine and cytokine-receptor action. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 80-85.

Straczkowski, M., Kowalska, I., Baranowski, M., Nikolajuk, A., Otziomek, E., Zabielski, P., ... & Gorska, M. (2007). Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(11), 2366-2373.

Stremmel, W., Lotz, G., Strohmeyer, G., & Berk, P. D. (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *Journal of Clinical Investigation*, 75(3), 1068.

Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A. W., Garcia, A., Bhattacharyya, & Brasaemle, D. L. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42062-42071.

Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Zajac, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(2).

Tchkonina, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Tchoukalova, Y., Karagiannides, I., Forse, R. A., ... & Kirkland, J. L. (2002). Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(5), R1286-R1296.

Trayhurn, P. (2005). The biology of obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(01), 31-38.

Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A., & Poos, M. (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(11), 1621-1630.

Tschöp, M., & Heiman, M. L. (2000). Rodent obesity models: an overview. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 109(6), 307-319.

Unger, R. H. (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes*, 44(8), 863-870. **FIND**

Unger, R. H., & Zhou, Y. T. (2001). Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes*, 50(suppl 1), S118.

Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N., & Tovar, A. R. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of medical research*, 39(8), 715-728.

Vijaya Durga, P., Kumaraswamy, B., Dhanaraju, M., & Ramachandran, S. (2013). Antihyperglycemic, hypolipidemic and antioxidant effect of aqueous extract of coriander sativum (seed) and ginger officinale (rhizome) combination in streptozotocin induced diabetes mellitus rats. *Int J Biol Pharm Res*, 4(12), 872-77.

Virkamäki, A., Ueki, K., & Kahn, C. R. (1999). Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 103(7), 931.

Wein, S., Behm, N., Petersen, R. K., Kristiansen, K., & Wolffram, S. (2010). Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- γ independent mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 16-22.

Zick, Y. (2001). Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends in cell biology*, 11(11), 437-441.

Zimmet, P. Z., Alberti, K. G., & Shaw, J. E. (2005). Nueva definición mundial de la FID del síndrome metabólico: argumentos y resultados. *Diabetes Voice*, 50(3), 31-3.