UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

EFECTO ANTIOBESIDAD DE LA NARINGENINA Y EL KAEMPFEROL EN CÉLULAS 3T3-L1

POR

L.N. DENYS ARMANDINA TORRES VILLARREAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

SEPTIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

TESIS

EFECTO ANTIOBESIDAD DE LA NARINGENINA Y EL KAEMPFEROL EN CÉLULAS 3T3-L1

PRESENTA
DENYS ARMANDINA TORRES VILLARREAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO **SEPTIEMBRE DE 2017**

EFECTO ANTIOBESIDAD DE LA NARINGENINA Y EL KAEMPFEROL EN CÉLULAS 3T3-L1

Comité de Tesis

Ph D. Ana Laura De la Garza Hernández

Presidente

Ph D. Heriberto Castro García

Secretario

Dra. en C. Rocío Ortiz López

Vocal

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis **"EFECTO ANTIOBESIDAD DE LA NARINGENINA Y EL KAEMPFEROL EN CÉLULAS 3T3-L1"**, presentada por la L.N. Denys Armandina Torres Villarreal. Con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Comité de Tesis

Ph D. Ana Laura De la Garza Hernández

Presidente

Ph D. Heriberto Castro García

Secretario

Dra. Rocío Ortiz López

Vocal

Monterrey, Nuevo León a 21 de septiembre del 2017

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **1**
ABSTRACT **2**
I. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA **3**
II. ANTECEDENTES **6**
2.1 Obesidad 6
2.1.1 Epidemiología 6
2.1.2 Etiología 7
2.1.2.1 Balance energético 8
2.1.2.2 Factores genéticos 8
2.1.2.3 Factores fisiológicos 9
2.1.2.4 Factores psicológicos 10
2.1.2.5 Factores endocrinos 10
2.1.3 Tratamiento 11
2.1.3.1 Hábitos alimentarios y actividad física 11
2.1.3.2 Tratamiento farmacológico 12
2.1.3.3 Tratamiento quirúrgico 12
2.2 El tejido adiposo 12
2.2.1 Hipertrofia del tejido adiposo 14
2.2.1.1 Metabolismo lipídico: lipogénesis y lipolisis 14
2.2.1.2 Tejido adiposo como órgano secretor 16
2.2.2 Hiperplasia del tejido adiposo: diferenciación adipocitaria 18
2.2.2.1 Modelos para el estudio de la adipogénesis 23
2.3 Compuestos bioactivos como potencial terapéutico contra la obesidad 26
2.3.1 Flavonoides 27

2.3.1.1 Estructura, clasificación y fuentes de consumo 27
2.3.1.2 Biodisponibilidad de los flavonoides 30
2.4 Naringenina y kaempferol 32
2.4.1 Propiedades terapéuticas de la naringenina y el kaempferol 33
2.4.1.1 Propiedades antiobesidad 34
2.4.1.2 Propiedades antiinflamatorias 34
III. JUSTIFICACIÓN 37
IV. HIPÓTESIS 39
V. OBJETIVOS 40
5.1 Objetivo general 40
5.2 Objetivos específicos 40
VI. MATERIALES Y MÉTODOS 41
6.1 Línea celular 3T3-L1 42
6.2 Cultivo de la línea celular 43
6.2.1 Cultivo en frasco 43
6.2.2 Cultivo en placa 43
6.2.3 Diferenciación de adipocitos 3T3-L1 44
6.3 Obtención de los compuestos naringenina y kaempferol 45
6.3.1 Preparación de los compuestos 45
6.3.2 Medida de la citotoxicidad de los compuestos 45
6.3.3 Selección de las dosis según dosis letal media 47
6.3.4 Tinción con rojo oleoso 48
6.4 Tratamiento de la línea celular con los compuestos 49
6.4.1 Cuantificación de inhibición de adipogénesis 49
6.4.2 Cuantificación de la inducción de la lipolisis 50
6.5 Ensayos para cuantificar la expresión génica 51

6.5.1 Extracción y valoración de ARN 52
6.5.2 Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN 54
6.5.3 Análisis por PCR cuantitativa 55
6.5.3.1 Retrotranscripción (RT) del ARNm 55
6.5.3.2 PCR en tiempo real 57
6.5.3.3 Eficiencia de la amplificación por PCR 58
6.5.3.4 Análisis de resultados de los estudios de expresión génica . 59
VII. PLAN DE ANÁLISIS 60
VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD 61
IX. RECURSOS 62
9.1 Equipo, materiales e instrumentos 62
9.2 Financieros 63
9.3 Humanos 63
X. RESULTADOS 64
10.1 Citotoxicidad de los compuestos sobre la línea celular 3T3-L1 64
10.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre los procesos de adipogénesis y lipolisis 66
10.2.1 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inhibición de la adipogénesis 66
10.2.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inducción de la lipolisis 69
10.3 Análisis de expresión génica 72
10.3.1 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la expresión de los genes implicados en la adipogénesis 76
10.3.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la expresión de los genes implicados en lipolisis 77

10.3.3 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la expresión de NF-κB 79

XI. DISCUSIÓN 81

11.1 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inhibición de la adipogénesis 83

11.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inducción de la lipolisis 88

11.3 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre marcadores de inflamación 90

11.4 Futuras directrices 93

XII. CONCLUSIONES 94

XIII. REFERENCIAS 95

LISTA DE TABLAS

Tabla

1. Modelos celulares *in vitro* para el estudio de la diferenciación adipocitaria .. 23
2. Estructura química de los flavonoides y fuentes de consumo 29
3. Eficiencias de amplificación de los genes 75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad 7
Figura 2. Mecanismos celulares implicados en el aumento del tejido adiposo . 13
Figura 3. Metabolismo lipídico en el adipocito 16
Figura 4. Principales interacciones entre los distintos factores de transcripción implicados en la adipogénesis 21
Figura 5. Diferenciación adipocitaria a partir de una célula madre pluripotente 24
Figura 6. Estructura química de los flavonoides 27
Figura 7. Clasificación de los flavonoides 28
Figura 8. Mecanismo de absorción de los flavonoides en el intestino delgado. 31
Figura 9. Estructura química de la naringenina..... 32
Figura 10. Estructura química del kaempferol..... 33
Figura 11. Estrategia general del diseño experimental 41
Figura 12. Esquema del protocolo de diferenciación adipocitaria de preadipocitos 3T3-L1 44
Figura 13. Esquema del ensayo de inhibición de la adipogénesis..... 50
Figura 14. Esquema del ensayo de inducción de la lipolisis 51
Figura 15. Efecto de la naringenina sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento. 64
Figura 16. Efecto de la kaempferol sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento 65
Figura 17. Células 3T3-L1 tratadas con kaempferol y naringenina desde el inicio del ensayo (día 0) hasta el día 21. 67
Figura 18. Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre el contenido lipídico de las muestras tratadas desde el inicio del ensayo (día 0) hasta el día 21. 68
Figura 19. Células 3T3-L1 tratadas con kaempferol y naringenina al intermedio del ensayo (día 12) hasta el día 21. 70
Figura 20. Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre el contenido lipídico de las muestras al intermedio del ensayo (día 12) hasta el día 21. 71

Figura 21. Resultados de la electroforesis capilar posterior a la extracción de ARN 73
Figura 22. Curvas de calibración para los genes PPAR-γ, PNPLA2 y NFkB.... 74
Figura 23. Expresión génica de PPAR-γ y C/EBPα en células 3T3-L1 tratadas con naringenina y kaempferol durante el proceso de diferenciación. 77
Figura 24. Expresión génica de FASN, LIPE y PNPLA2 en células 3T3-L1 tratadas con naringenina y kaempferol durante el proceso de diferenciación. . 79
Figura 25. Expresión génica de NF-κB en células 3T3-L1 tratadas con naringenina y kaempferol durante el proceso de diferenciación. 80
Figura 26. Mecanismos moleculares implicados en el efecto antiinflamatorio de PPAR-γ a nivel de proteosoma, poro nuclear y elementos de respuesta. 92

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADD1	Factor dependiente de determinación y diferenciación de adipocito 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
AP-1	Proteína activadora 1
Ap2	Proteína adipocítica de unión a lípidos 2
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATGL	Lipasa adipocítica de triglicéridos
ATP	Adenosín trifosfato
CBG	β-glucosidasa citosólica
C/EBPs	Proteínas de unión al potenciador CCAAT
CCK	Colecistoquinina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DE	Desviación estándar
DEX	Dexametasona
DL50	Dosis Letal Media
EGCG	Galato de epigalocatequina
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FASN	Enzima sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino

FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GH	Hormona del crecimiento
GLP-1	Péptido 1 análogo al glucagón
GLUT4	Transportador de glucosa 4
Hrs	Horas
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IBMX	Isobutilmetilxantina
IL-1	Interleuquina 1
IL-1	Interleuquina 6
IL-1	Interleuquina 8
IMC	Índice de Masa Corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IκBα	Proteína inhibidora de la familia IκB α
LOX	Lipoxigenasa
LPH	Enzima lactasa floridizin hidrolasa
LPL	Lipoprotein lipasa
MC4R	Receptor de la melanocortina 4
ME	Enzima málica
MgATP 2-	Magnesio-Adenosina Trifosfato
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar

OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PPAR-γ	Receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma
ROS	Especies reactivas de oxigeno
RT	Transcriptasa reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa
SGLT1	Transportador de glucosa dependiente de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
SREBP1c	Proteína de unión a elementos regulatorios de esterol 1
STAT3	Transductor de señales y activador transcripcional 3
STAT5A	Transductor de señales y activador transcripcional 5A
TLR2	Receptor tipo toll 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpha
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar

RESUMEN

Introducción: La obesidad es una condición patológica crónica de etiología multifactorial, asociada a factores genéticos, sociales y ambientales. Actualmente diversas investigaciones científicas están orientadas en la identificación y búsqueda de compuestos bioactivos presentes en los alimentos capaces de ejercer efectos anti-obesidad.

Objetivo: Investigar los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el efecto antiobesidad de la naringenina y el kaempferol en células 3T3-L1.

Metodología: En la presente investigación se evaluó el efecto de la naringenina y el kaempferol en la línea celular 3T3-L1. Con el objetivo de analizar el potencial anti-adipogénico se añadieron 120 µM de naringenina y 60 µM de kaempferol a partir del día 0 del ensayo (inicio). Por otro lado, para evaluar el efecto de los compuestos como inductores de lipólisis, las mismas concentraciones para cada flavonoide fueron añadidas a partir del día 12 del ensayo (intermedio). Una vez concluido el tiempo de tratamiento (21 días) se llevó a cabo la cuantificación relativa del contenido lipídico de las muestras mediante la tinción de las células con *rojo oleoso.* Así mismo, se evaluó la influencia del tratamiento con los compuestos sobre la expresión de genes implicados en los procesos de adipogénesis, lipolisis, lipogénesis e inflamación mediante RT-qPCR.

Resultados: El kaempferol tiene la capacidad de inhibir la adipogénesis evidenciado por una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de acumulación lipídica (-61%) respecto al control positivo *($p < 0.001$),* lo anterior puede ser atribuido a la disminución de la expresión génica de C/EBPα. La combinacion de naringenina y kaempferol mostró efectos adipogénicos aumentando el porcentaje de acumulación lipídica (+18%) y la expresión del gen PPAR-γ. En cuanto a los efectos lipolíticos, los dos flavonoides mostraron un potencial efecto sobre la disminución del contenido intracelular de lípidos al ser añadidos al medio de cultivo a partir del día 12 del ensayo, sin embargo, estos valores no alcanzaron significancia estadística *($p = 0.256$ y 0.778* respectivamente), lo anterior se ve reflejado en el aumento de la expresión de los genes PNPLA2 y LIPE.

Conclusión: En forma individual, la naringenina y el kaempferol poseen efectos anti-obesidad a través de la regulación de la adipogénesis y el metabolismo lipídico de células 3T3-L1.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a chronic pathological condition of multifactorial etiology, associated to genetic, social and environmental factors. Nowadays there is a several scientific investigations oriented to identifying and searching for bioactive compounds found in foods that have anti-obesity effects.

Objective: Research the physiological and molecular mechanisms related to the anti-obesity effect of naringenin and kaempferol in 3T3-L1 cells.

Methodology: In the present investigation the effect of naringenin and kaempferol in 3T3-L1 cells was evaluated. With the objective of analyzing the anti-adipogenic potential, 120 µM of naringenin and 60 µM of kaempferol were added from day 0 of the test (beginning). On the other hand, in order to evaluate the effect of the compounds as lipolysis inductors, the same concentrations for each flavonoid were added from day 12 of the test (intermediate). Once the treatment time concluded (21 days), the quantification related to lipid content of the samples was conducted by dyeing the cells with *Oil Red O*. Furthermore, the influence of the treatment with these compounds on the gene expression implied in the processes of adipogenesis, lipolysis, lipogenesis, and inflammation by RT-qPCR was evaluated.

Results: Kaempferol has the capacity to inhibit adipogenesis proved by a statistically significant decrease in the percentage of lipid accumulation (-61%) in connection with the positive control *($p < 0.001$),* this can be attributed to the decrease of the gene expression of C/EBPα. The combination of naringenin and kaempferol showed adipogenic effects by increasing the percentage of lipid accumulation (+18%) and the expression of the gene PPAR-γ. Regarding the lipolytic effects, both flavonoids showed a potential effect on the decrease of intercellular lipid content when added to the culture medium from day 12 of the test, however, this values did not reach statistic relevance *($p = 0.256$ y 0.778* respectively), this can be reflected in the increase in the expression of genes PNPLA2 and LIPE.

Conclusion: Individually, naringenin and kaempferol have anti-obesity effects by the regulation of adipogenesis and lipid metabolism of 3T3-L1 cells.

I. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo, que puede ser perjudicial para la salud (WHO, 2016). La obesidad resulta de un desequilibrio energético debido a una ingesta calórica excesiva en relación al gasto energético (Jung & Myung-Sook, 2014; Wang et al., 2014).

Actualmente la obesidad es reconocida como un problema de salud pública que eleva el riesgo de síndrome metabólico y comorbilidades asociadas como diabetes, hipertensión, aterosclerosis y problemas cardiovasculares (Raimann, 2009).

Las causas principales de la epidemia de la obesidad en las últimas décadas se han relacionado con cambios conductuales de la población. Los cambios sociales y nutricionales asociados al crecimiento económico de los países, la modernización y la globalización de los mercados de alimentos, la industrialización y las nuevas tecnologías de alimentos (Krzysztoszek, Wierzejska, & Zielinska, 2015). En general el estilo de vida actual y las facilidades del mundo moderno han influido en los hábitos alimentarios de la población, fomentando el consumo de dietas altas en calorías (Palmisciano Bede et al., 2015).

Como resultado de esta nueva tendencia de alimentación ha habido un aumento en el número de estudios sobre las propiedades funcionales de los alimentos y sus compuestos bioactivos, que promueven la salud y previenen enfermedades (Palmisciano Bede et al., 2015). La medicina tradicional ha sido la promotora de la utilización de numerosas plantas como herramienta para el tratamiento de distintos padecimientos, muchos de ellos relacionados con la reducción de peso (Pan et al., 2013).

Dicha evidencia, ha establecido la premisa del potencial terapéutico que poseen diversos compuestos naturales. Así mismo, durante el siglo pasado, surgieron importantes avances en el conocimiento sobre el vínculo

alimentación/nutrición y salud/enfermedad con base en la gran cantidad de estudios sobre la composición de los alimentos, modelos analíticos, experimentales y estudios de laboratorio con el fin de determinar actividades biológicas presentes en los alimentos (Chalé, Ancona, & Campos, 2014; Saibabu et al., 2015). Todo lo anterior ha contribuido a la identificación de determinados componentes de la dieta (compuestos bioactivos) como factores potencialmente implicados en la prevención y control de procesos patológicos (Chalé et al., 2014).

Los compuestos bioactivos de los alimentos, son moléculas capaces de ejercer funciones terapéuticas en el cuerpo, las cuales resultan favorables para la salud, es decir, aportan beneficios al organismo más allá de los considerados como nutrición básica (Abuajah, Ogbonna, & Osuji, 2015; Drago, López, & Saínz, 2006). Estos componentes se encuentran, por lo general en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal (Chalé et al., 2014).

Dentro de estas biomoléculas encontramos los compuestos fenólicos, los cuales constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal; en los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en dichos compuestos puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de distintas enfermedades (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012). Actualmente se conocen más de 8000 estructuras fenólicas, que incluyen desde moléculas con un solo anillo fenólico a compuestos altamente polimerizados, que presentan numerosos anillos fenólicos; en general, todos ellos son comúnmente designados como polifenoles (Pandey & Rizvi, 2009; Tsao, 2010).

Por su parte, los flavonoides constituyen el subgrupo de polifenoles más abundante y a la fecha se han identificado más de 4000 estructuras categorizadas dentro de seis diferentes clases: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Del Rio et al., 2013; Tsao, 2010). En general, son un grupo de sustancias naturales que se encuentran en frutas, verduras, té y vino, que han recibido un gran interés en los últimos años, ya que

se ha estudiado que una vez incorporados a la dieta humana, pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la salud (Eseberri, Miranda, Lasa, Churruca, & Portillo, 2015), como la prevención de distintas enfermedades, entre las que se encuentra la obesidad.

Investigaciones recientes sugieren que el potencial efecto antiobesidad de los flavonoides puede ocurrir a traves de distintos mecanismos como la reducción de la absorción intestinal de lípidos, aumento del gasto energético, supresión del apetito, incremento del metabolismo lipídico, inhibición de la diferenciación adipocitaria, estimulación de la lipolisis y reducción de la inflamación crónica asociada a la obesidad (De La Garza, 2014; De La Garza et al., 2015; Moseti, Regassa, & Kim, 2016; Yang et al., 2008). Algunos de estos mecanismos de accion se han atribuido a la capacidad de modular la expresión de genes involucrados en el desarrollo de la obesdiad, no obstante dichos mecanismos no estan claramente definidos.

Por consiguiente, la literatura sugiere que el uso de compuestos fenólicos con potencial terapéutico es muy prometedor; sin embargo, se requiere de investigación científica, enfocada al correcto entendimiento de las características fisiológicas y moleculares ligadas al desarrollo de la obesidad, con el objetivo de identificar posibles dianas terapéuticas y contribuir a frenar la creciente incidencia de dicha enfermedad (Moseti et al., 2016; Saibabu et al., 2015).

II. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

La obesidad es una condición patológica crónica de etiología multifactorial, asociada a factores genéticos, sociales y ambientales, que desencadenan un equilibrio energético positivo (Rodríguez Scull, 2014).

2.1.1 Epidemiología

En 1997 la OMS declaró la obesidad como una epidemia de dimensión mundial (WHO, 2000). Desde entonces, la prevalencia de obesidad ha continuado aumentando a un ritmo alarmante y en la actualidad se considera un problema de salud pública.

Según lo declarado por la OMS, en el año 2014 alrededor del 13% de la población mundial adulta (11% hombres y 15% mujeres) eran obesos, mientras que, en el caso del sobrepeso, afectó al 39% de los adultos (38% hombres y 40% mujeres). La prevalencia mundial de la obesidad se ha multiplicado a más del doble entre 1980 y 2014 (WHO, 2015).

Particularmente en México, en tan solo cuatro décadas el perfil epidemiológico ha cambiado de una situación en donde la desnutrición y las enfermedades infecciosas eran los mayores problemas de salud pública, a uno dominado por la obesidad, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la nutrición (Rivera, 2013).

En México se ha documentado uno de los incrementos más rápidos en el mundo en la prevalencia de peso excesivo y sus comorbilidades (Rivera, 2013). Se estima que en los últimos 12 años ha habido un incremento promedio anualizado de 1.3% (Barquera, Campos-Nonato, Hernández-Barrera, Pedroza-Tobías, & Rivera-Dommarco, 2013). La epidemia de obesidad que se experimenta en México ha sido ampliamente documentada a través de las últimas encuestas nacionales. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

(ENSANUT) la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016 (Secretaría de Salud, 2016).

2.1.2 Etiología

La evidencia científica indica que la causa más inmediata de la obesidad es el balance positivo de energía; sin embargo, otras causas más distales de dicha patología, las cuales son complejas y multifactoriales, operan a lo largo del curso de la vida y en distintos niveles del sistema social y global (Rivera, 2013).

Además del balance energético, la obesidad ha sido descrita como una enfermedad crónica consecuencia de interacciones complejas entre distintos factores, entre los que encontramos los genéticos, fisiológicos, psicológicos y endocrinos (Figura 1) (Atkinson, 2005).

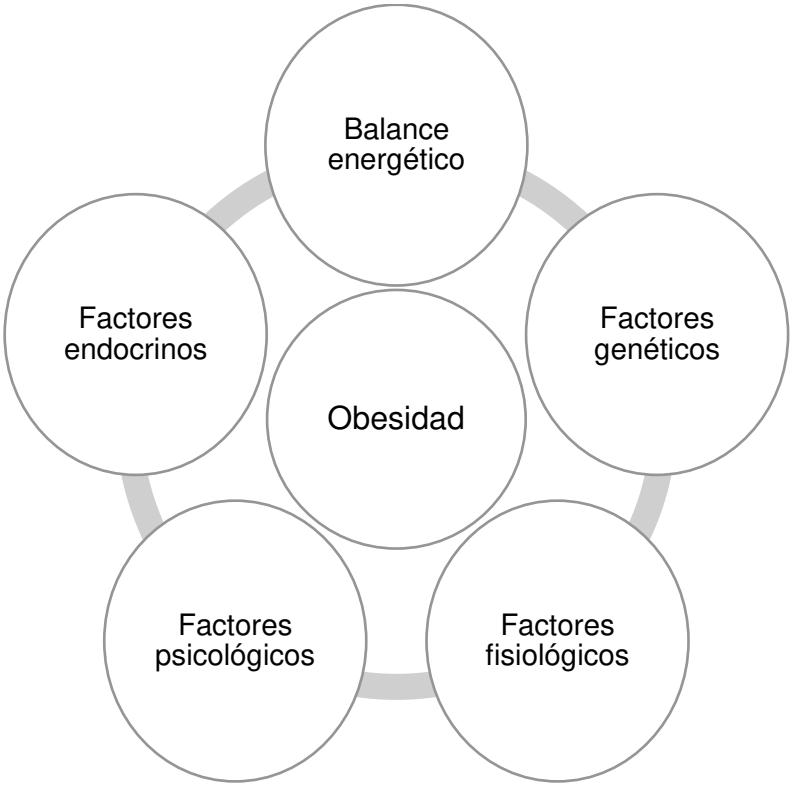


Figura 1. Principales factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad

2.1.2.1 Balance energético

La obesidad emana de un desequilibrio en el balance energético, que conduce a un aumento de peso gradual. El balance positivo de energía se produce cuando el consumo energético por parte del organismo es mayor que el gasto, lo cual promueve la ganancia de peso (Moehlecke et al., 2016). La ingesta dietética excesiva y la falta de actividad física son los factores mayormente implicados en el mantenimiento del balance energético positivo. Si la ingesta de calorías es superior a las necesidades del organismo, este exceso de energía se almacena principalmente en forma de grasa corporal (Atkinson, 2005).

La actividad física se considera fundamental para aumentar el gasto energético. Estudios recientes indican que el aumento en la prevalencia de la obesidad ha ocurrido de manera simultánea a los cambios en los patrones de actividad física (Rivera, 2013).

La evidencia epidemiológica de que los alimentos con elevada densidad energética aumentan el riesgo de ganancia excesiva de peso, es abundante. Entre estos alimentos podemos destacar aquellos con alto contenido de hidratos de carbono y azúcares refinados, los cuales parecen constituir un factor de riesgo de obesidad (Rolls, 2014).

2.1.2.2 Factores genéticos

La etiología de la obesidad es compleja y multifactorial, sin embargo, un aspecto que se ha incorporado recientemente a su estudio es la influencia de los factores genéticos (Calva, González, & Eduardo Madrigal Bujaidar, 2011).

Con relación a la etiología de tipo genético, se ha propuesto que puede ser de origen monogénico, sindrómico, así como poligénica o multifactorial (genes y ambiente) (Calva et al., 2011). Son pocos los casos (5%) en los que la obesidad se desarrolla a partir de alteraciones en un único gen, siendo la forma más frecuente de obesidad monogenética aquella causada por las mutaciones en el gen del receptor de la melanocortina 4 (MC4R), que participa en la

regulación de la ingesta, o bien, alteraciones en genes que codifican hormonas relacionadas con la ingesta y el metabolismo energético, como el gen de la leptina o de sus receptores (Hinney, Vogel, & Hebebrand, 2010). La predisposición genética a la obesidad para la mayoría de los individuos, sin embargo, tiene una base poligénica. Los estudios de ligamiento y asociación han permitido la identificación de genes y variantes genéticas que predisponen a la obesidad (Hinney et al., 2010).

2.1.2.3 Factores fisiológicos

El sistema nervioso central (SNC) recibe información del estado energético en que se encuentra el organismo y en consecuencia envía señales hacia los diversos órganos y sistemas periféricos para lograr un balance energético óptimo a corto y a largo plazo (González, Ambrosio, & Sánchez, 2006).

En el control de la ingesta pueden diferenciarse dos sistemas de regulación:

- El sistema de regulación de la ingesta a largo plazo tiene lugar a expensas de las señales periféricas de adiposidad, las cuales son proporcionales al tamaño de las reservas energéticas en forma de grasa. Destacan tres moléculas importantes en este sistema: insulina, leptina y ghrelina (González-Jiménez & Schmidt Río-Valle, 2012).
- El sistema de regulación de la ingesta a corto plazo actúa modulando las señales de saciedad que se generan tras la entrada de alimento en el tracto digestivo, dichas señales regulan la cantidad de comida y la duración de la ingesta en un corto período de tiempo. Dentro de esta regulación, destacamos diversos péptidos, como la colecistoquinina (CCK) o el péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1), los cuales inhiben la ingesta en un espacio corto de tiempo (González et al., 2006).

Los dos sistemas de regulación generan señales nerviosas y endocrinas que desencadenan ajustes cuantitativos y cualitativos que afectan no solamente la ingesta de nutrientes, sino que tambien actuan sobre el metabolismo energético (Crowell, Decker, Levy, Jeffrey, & Talley, 2006).

2.1.2.4 Factores psicológicos

Hay situaciones en las que las personas tienen tendencia a la sobrealimentación en respuesta a estados de ánimo como la depresión, ansiedad y estrés (Guzmán, Del castillo, & García, 2010). Aunque no puede considerarse como un factor desencadenante, para el desarrollo de la obesidad, los ecosistemas en los que el organismo está inmerso, el ambiente físico y social en el que el individuo se mueve determinan en gran parte el comportamiento de los seres humanos (Tamayo & Restrepo, 2014).

Las valoraciones psicológicas que evalúan ansiedad y emocionalidad, reportan puntajes más altos en los individuos obesos (niños, adolescentes y adultos) que en la gente con peso normal (Guzmán et al., 2010). Por otro lado, también muestran niveles elevados de tensión, impulsividad y agresividad. Otros estudios han detectado que las personas obesas se enfrentan con una serie de dificultades en el reconocimiento, clasificación y descripción de sus emociones (Guzmán et al., 2010).

2.1.2.5 Factores endocrinos

Existen numerosas alteraciones endocrinas asociadas a la obesidad, algunas de las cuales son consideradas como factores causales para el desarrollo del exceso de tejido adiposo en el organismo, dentro de estas alteraciones endocrinas, se encuentran las relacionadas con hormonas tiroideas, el cortisol y la hormona del crecimiento (Baudrand, Arteaga, & Moreno, 2010).

La función tiroidea puede verse disminuida, causando hipotiroidismo, el cual está asociado con una ganancia de peso ponderal acompañada con disminución de la termogénesis (San Román, 2011).

Los glucocorticoides son hormonas que incrementan la ingesta de alimentos debido a que tienen efecto antagónico sobre los péptidos anorexígenos hipotalámicos. El síndrome de Cushing, caracterizado por una sobreproducción de glucocorticoides, genera un fenotipo de obesidad (M. González et al., 2006).

La hormona del crecimiento (GH) tiene acción lipolítica, especialmente en el tejido adiposo visceral, además de aumentar el gasto de energía por el organismo. La disminución de GH puede producir un aumento del índice de masa corporal, disminución de la lipólisis y del gasto energético (Baudrand et al., 2010).

2.1.3 Tratamiento

Desde el siglo XX se han producido numerosos avances en el tratamiento de la obesidad basados en la dieta y el ejercicio, además del desarrollo de nuevos medicamentos que permiten obtener mejores resultados.

2.1.3.1 Hábitos alimentarios y actividad física

La restricción calórica es probablemente la estrategia más utilizada para combatir el exceso de peso y las comorbilidades asociadas a la obesidad, se basa en la consecución de un balance energético negativo, a través de una reducción de la ingesta (De la Iglesia et al., 2016).

La combinación del ejercicio físico y la restricción calórica es más efectiva que cualquiera de ambos por separado. Aunque la adición de ejercicio a la dieta incrementa poco la pérdida de peso en las primeras fases, parece que es el componente del tratamiento que más promueve el mantenimiento de la reducción de peso en el tiempo (G. Rivera, Bocanegra, Acosta, De la Garza, & Flores, 2007).

2.1.3.2 Tratamiento farmacológico

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos, FDA (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration), el tratamiento farmacológico debe considerarse únicamente para pacientes obesos con un IMC ≥ 30, en los que la dieta, el ejercicio y los cambios conductuales, no hayan logrado una diferencia significativa de peso o en aquellos con un IMC ≥ 25, si se asocian factores importantes de morbilidad (Patham, Mukherjee, & Zt, 2013).

En ese sentido, los fármacos utilizados en el tratamiento de la obesidad se clasifican en los siguientes grupos de acuerdo a su mecanismo de acción (Chatzigeorgiou, Kandaraki, Ag, & Koutsilieris, 2014):

1) Fármacos anorexígenos o supresores del apetito
2) Fármacos que aumentan el gasto energético.
3) Fármacos que interfieren con la absorción de grasas

2.1.3.3 Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico, como las técnicas restrictivas y/o las mal absortivas, pueden producir pérdidas de peso a largo plazo, pero debe reservarse sólo a pacientes seleccionados que cumplan una serie de condiciones y tengan un IMC ≥ 35, además, si tienen complicaciones de riesgo asociadas a la obesidad, y naturalmente, que hayan fracasado reiteradamente con los tratamientos no quirúrgicos (G. Rivera et al., 2007). Los procedimientos quirúrgicos usados para el tratamiento de la obesidad se engloban en el término cirugía bariátrica (San Román, 2011).

2.2 El tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano formado por tejido conectivo que consiste principalmente en adipocitos además de una amplia población de células, tales como macrófagos, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, células madre mesenquimales y células precursoras de adipocitos con distintos grados

de diferenciación, fundamentalmente preadipocitos (Ruiz-Ojeda, Rupérez, Gomez-Llorente, Gil, & Aguilera, 2016; Moreno & Martínez, 2002).

El adipocito es un tipo celular derivado del fibroblasto cuya principal función es el almacén de lípidos, en concreto triglicéridos y colesterol esterificado, como reserva energética. Esta célula tiene forma redondeada debido a la vacuola lipídica contenida en su interior, la cual representa el 95% de su peso celular, debido a esto, el citoplasma y núcleo se encuentran comprimidos contra la membrana celular (Manzur, Alvear, & Alayón, 2010).

La obesidad resulta del acumulo excesivo de lípidos en el tejido adiposo, dicha acumulación puede ocurrir a través de dos mecanismos: un aumento en el número (hiperplasia), tamaño (hipertrofia) de los adipocitos o la combinación de ambas (Figura 2) (L. Rivera, 2009; Ruiz-Ojeda et al., 2016).

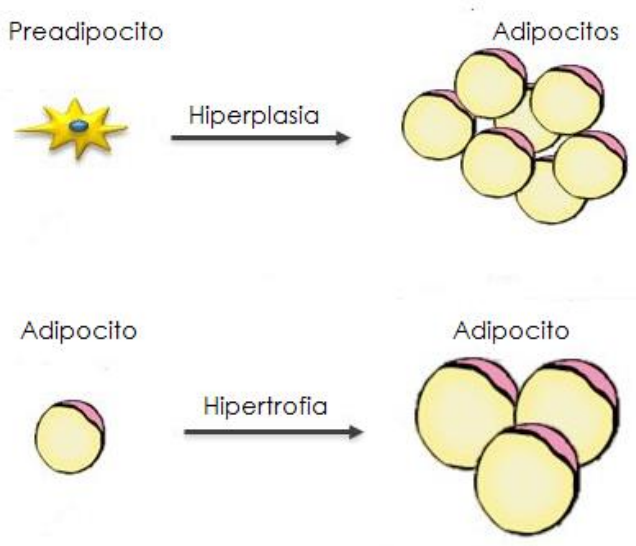


Figura 2. Mecanismos celulares implicados en el aumento del tejido adiposo

Adaptado de Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J., & Vidal, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(1), 16–24.

Como tal, la función más conocida del tejido adiposo es la regulación de la homeostasis energética; durante periodos de exceso nutricional en el organismo, los adipocitos almacenan la energía sobrante en forma de triglicéridos (lipogénesis) y durante estados de necesidad energética son capaces de proveer de energía al organismo en forma de ácidos grasos y glicerol (lipolisis) (Rosen & MacDougald, 2006; Moseti et al., 2016; Bou et al., 2017).

2.2.1 Hipertrofia del tejido adiposo

2.2.1.1 Metabolismo lipídico: lipogénesis y lipolisis

Durante la lipolisis los triglicéridos almacenados en las células adiposas son movilizados para producir ácidos grasos libres y glicerol, con la finalidad de cubrir las necesidades energéticas del organismo (Badimon, Oñate, & Vilahur, 2015). En periodos de ayuno, se secretan diversas hormonas catabólicas como el glucagón y las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), en respuesta a la baja concentración sanguínea de glucosa, las cuales estimulan la lipolisis en el adipocito, promoviendo la hidrolisis de los triglicéridos almacenados por acción de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL), produciendo diacilgliceroles, los cuales son a su vez hidrolizados por la lipasa sensible a hormonas (HSL), liberándose dos ácidos grasos y una molécula de glicerol (Saponaro, Gaggini, Carli, & Gastaldelli, 2015). Los ácidos grasos producidos son secretados como ácidos grasos libres a la circulación, donde serán transportados por la albúmina hasta los órganos de destino, para posteriormente ser oxidados y producir energía.

Por el contrario, el aumento postprandial de insulina en sangre, activa la lipogénesis en los adipocitos. En este proceso el adipocito, degrada los triglicéridos procedentes de los quilomicrones y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en ácidos grasos y glicerol por acción de la lipoprotein lipasa (LPL). Estos son captados por los adipocitos y una vez que se localizan al interior de las células son reesterificados con el glicerol-3 fosfato y sintetizando los

triglicéridos que se almacenarán en la vacuola lipídica al interior del adipocito (Badimon et al., 2015).

Por otro lado, cuando la ingesta energética de carbohidratos excede las necesidades del organismo y la capacidad de almacenamiento en forma de glucógeno hepático, dicho excedente es almacenado en el tejido adiposo (Strable & Ntambi, 2011). Esta ruta metabólica es denominada lipogénesis de *novo* y es promovida debido a la captación de glucosa por el transportador de glucosa 4 (GLUT4), lo cual induce la síntesis de la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la enzima málica (ME), enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos a partir del acetil-CoA procedente de la glucólisis (Figura 3) (González Castejón, 2013).

Un aumento en la lipogénesis de *novo* es un contribuyente importante al aumento de tejido adiposo, mientras que una reducción en la lipogénesis tiene un efecto protector contra el desarrollo de obesidad.

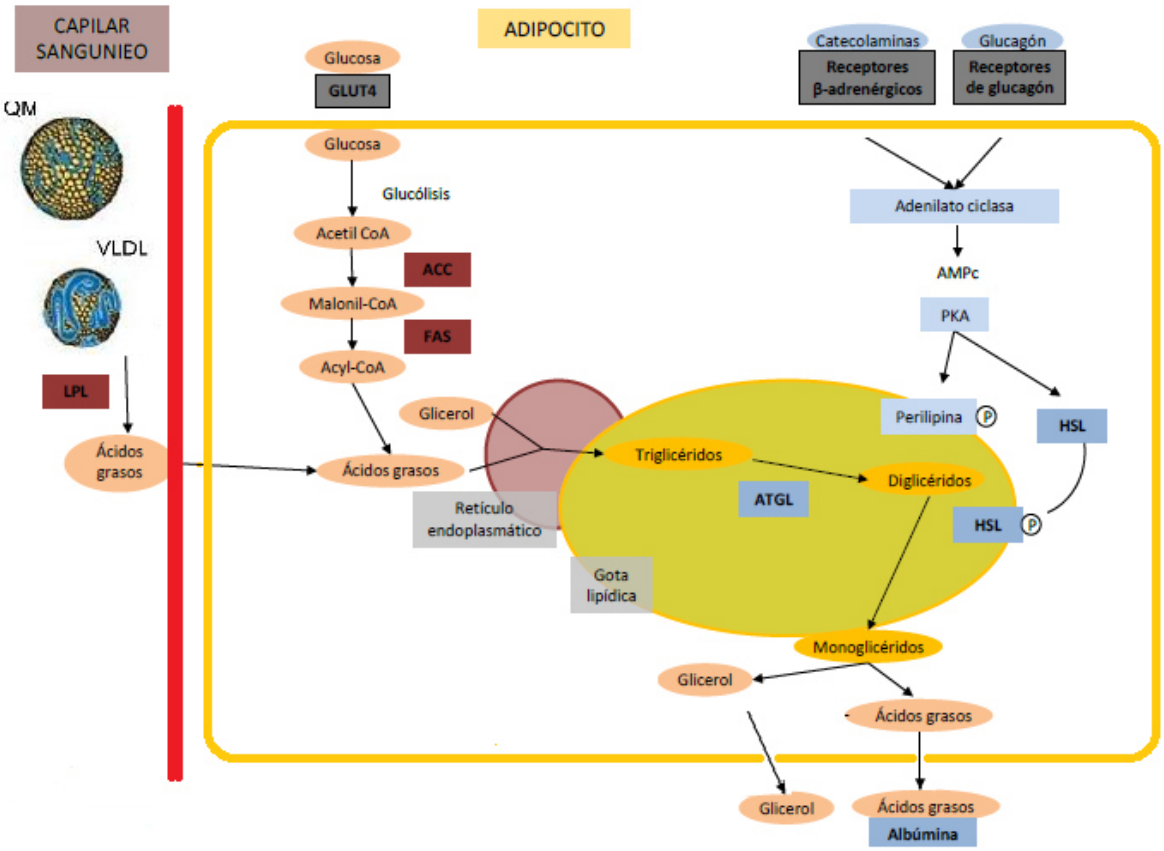


Figura 3. Metabolismo lipídico en el adipocito

Adaptado de González Castejón, M. (2013). *Efecto de extractos de taraxacum officinale sobre la adipogénesis y el metabolismo lipídico de células 3T3-L1.*

2.2.1.2 Tejido adiposo como órgano secretor

El tejido adiposo ha dejado de ser considerado un almacén de energía, a constituir un órgano secretor de diversas sustancias con acción endocrina, paracrina y autocrina (Mayorga, 2009). Estas moléculas secretadas son proteínas conocidas como citoquinas, o propiamente al ser secretadas en el tejido adiposo, también son denominadas adipocitoquinas, las cuales desencadenan el proceso de inflamación crónica de bajo grado característico en la obesidad (Blancas-Flores et al., 2010).

Dentro de estas adipocitoquinas destacan: el factor de necrosis tumoral alpha (TNF-α), interleuquinas como IL-1 e IL-6 y otras moléculas como leptina, resistina y adiponectina; las cuales regulan numerosas funciones como la homeostasis energética, el metabolismo glucídico y lipídico, la sensibilidad a la insulina; y además, participan en el control del apetito y modulación de la respuesta inmune e inflamatoria (Domínguez, Huitrón, & Mendoza, 2012; Jung & Myung-Sook, 2014; Ferrante, 2007).

- **TNF-α**: es una citoquina que participa en la inflamación sistémica y es un inhibidor del apetito. Es secretada por una gran variedad de células entre las que se encuentran: células del sistema inmune, células endoteliales, miocitos, fibroblastos, células neuronales y adipocitos (Domínguez et al., 2012). Cuando existe obesidad se produce una gran infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, siendo estos la principal fuente de producción de TNF-α (Jung & Myung-Sook, 2014). El TNF-α es un factor regulador clave en el metabolismo lipídico, ya que aumenta la concentración de ácidos grasos libres en la circulación sanguínea, promoviendo la lipolisis (Jung & Myung-Sook, 2014),

- **Adiponectina**: es una hormona sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo. Su principal función es la regulación a largo plazo del apetito además de promover la utilización de la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos (Palomer, Pérez, & Blanco-Vaca, 2005). Por otro lado, ejerce efectos antiinflamatorios, inhibiendo la producción de TNF−α en los macrófagos. (Domínguez et al., 2012).

- **Leptina**: es una hormona sintetizada en el tejido adiposo cuyo receptor específico se encuentra en el hipotálamo, la unión de la leptina a su receptor activa una serie de señales moleculares que promueven la expresión de genes encargados de la síntesis de péptidos supresores del apetito, promoviendo así la reducción de la ingesta energética por medio

de la señal de saciedad en el cerebro (Rosado, Monteiro, Chaia, & Lago, 2006; González Castejón, 2013).

- **IL-6**: es una adipocitoquina secretada por adipocitos y macrófagos (Domínguez et al., 2012). Contribuye de manera importante al desorden sistémico inflamatorio crónico, además de disminuir la señalización de insulina en tejidos periféricos y la secreción de adiponectina (Mayorga, 2009).

2.2.2 Hiperplasia del tejido adiposo: diferenciación adipocitaria

La diferenciación de los adipocitos consta de dos fases, la primera denominada diferenciación temprana, inicia con el compromiso de los fibroblastos generando preadipocitos, que, si bien no son morfológicamente diferentes de sus células precursoras, los preadipocitos han perdido funcionalmente la capacidad de diferenciarse en otro tipo celular debido a que ya expresan marcadores tempranos de adipogénesis. La segunda etapa consiste en la diferenciación terminal, en donde el preadipocito expresa genes característicos de las células adiposas. Todos estos cambios en la expresión y función de genes conducen finalmente a la adquisición fenotípica característica (Christodoulides, Lagathu, Sethi, & Vidal, 2009).

Los cambios morfológicos y funcionales de las células producidos durante este complejo proceso son regulados por la activación de un programa coordinado de expresión génica, mediado por una cascada de factores de transcripción que son activados secuencialmente (Hu et al., 2015).

Aunque algunas de estas moléculas no se han identificado todavía, existen factores de transcripción bien conocidos que establecen las directrices del proceso. Son factores de transcripción que pertenecen a la familia de proteínas de unión al potenciador CCAAT (por sus siglas en inglés CCAAT/enhancer-binding protein) (C/EBPs: α, β y δ) y el receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma (PPAR-γ) los de mayor peso en dirigir la adipogénesis,

aunque también se reconoce la participación del factor dependiente de determinación y diferenciación de adipocito 1 (ADD1) y proteína de unión a elementos regulatorios de esterol 1 (SREBP1c) (Gregoire, Smas, & Sul, 1998).

- **C/EBPs:** esta familia de proteínas tiene la habilidad de formar homo y heterodímeros con otro miembro de la misma familia y unirse al ADN en la secuencia CCAAT contenida en las regiones promotoras de multitud de genes. Varios miembros de la familia de factores de transcripción C/EBPs son expresados en los adipocitos durante el proceso de diferenciación, entre los que se encuentran C/EBPβ, δ y α (Sarjeant & Stephens, 2012).

- **C/EBPβ y δ**: son reguladores tempranos del proceso de adipogénesis, ya que su expresión máxima se detecta durante las primeras 4 hrs desde el inicio de la diferenciación en respuesta a la inducción hormonal. Estos dos factores de transcripción juegan un papel de vital importancia en el proceso de diferenciación adipogénica temprana, debido a que inducen la expresión de PPARγ y C/EBPα (Christodoulides et al., 2009; Guo, Li, & Tang, 2015).

- **C/EBPα**: este factor es activado transcripcionalmente por C/EBPβ y δ. Se expresa en etapas posteriores de la diferenciación y su expresión se mantiene a lo largo de todo el proceso. Está implicado en la terminación de la fase de expansión clonal y en el mantenimiento del fenotipo de adipocitos gracias a la activación mantenida mediante retroalimentación positiva con PPARγ (Mueller, 2014; Moseti et al., 2016). No obstante, se puede afirmar que C/EBPα es necesario y suficiente para inducir la adipogénesis (Otto & Lane, 2005).

- **PPAR-γ**: es un factor perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares. Esta proteína se expresa como dos isoformas, PPARγ1 y PPARγ2, generadas por el uso alternativo del promotor de un mismo gen. PPARγ1 se expresa en casi todos los tejidos, mientras PPARγ2 es la

isoforma específica de adipocitos, la cual funciona para promover la diferenciación adipocitaria y el almacenamiento de triglicéridos al interior de las células (Ruiz-Ojeda et al., 2016). Su expresión es esencial para el mantenimiento del fenotipo de adipocito completamente diferenciado, debido a que es de crucial importancia para la correcta expresión de la mayoría de los genes específicos del adipocito. Entre los genes que regula, se encuentran GLUT4, CD36, FATP, LPL, acetil-CoA sintetasa y las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 (C.-H. Lee, Olson, & Evans, 2003).

- **ADD1/SREBP1c**: su expresión inicia durante la diferenciación temprana y participa en la inducción de la expresión génica y/o aumento de la actividad transcripcional de PPARγ. Es el responsable de activar la transcripción de genes implicados en el metabolismo del colesterol y en la captación y síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Miettinen, Sarkanen, & Ashammakhi, 2008).

Los dos primeros factores activados en la adipogénesis por acción de la DEX e IBMX respectivamente son C/EBPβ y δ (Sook Sul, 2009). Ambos controlan simultáneamente la expresión de PPAR-γ y C/EBPα, los cuales son los reguladores transcripcionales centrales de la adipogénesis. Una vez expresados, PPAR-γ y C/EBPα se activan mutuamente para mantener definitivamente el fenotipo de adipocito diferenciado (Figura 4) (Farmer, 2006; Feng, Reuss, & Wang, 2016; Christodoulides et al., 2009).

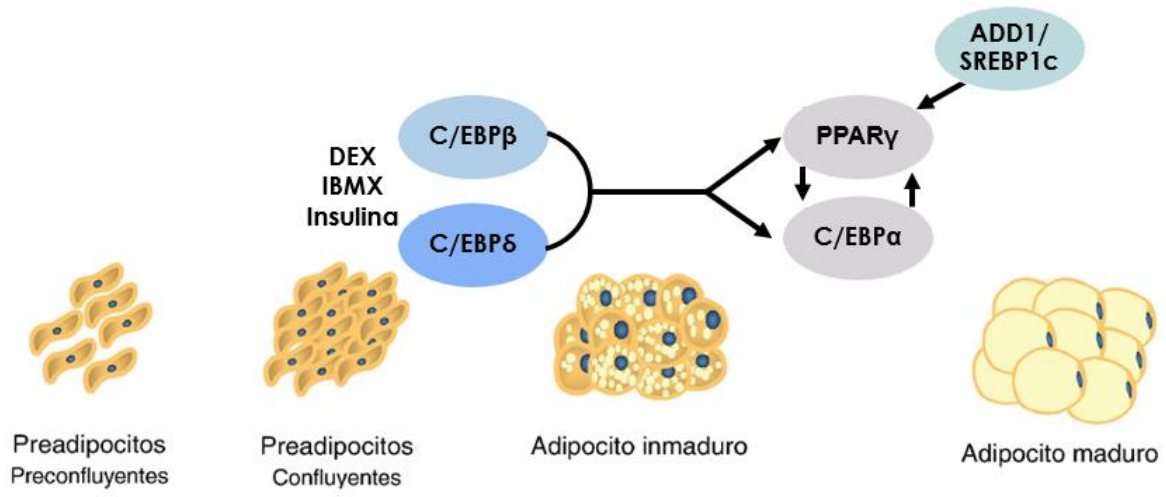


Figura 4. Principales interacciones entre los distintos factores de transcripción implicados en la adipogénesis

La compleja reprogramación genética, previa a la diferenciación celular está controlada por hormonas, nutrientes y otras moléculas que producen el cambio de expresión y actividad de los factores de transcripción implicados en el proceso, y que a su vez regulan el proceso de transformación de los adipocitos (Farmer, 2006). El balance entre estímulos positivos y negativos determina si los pre-adipocitos permanecen inactivos, se dividen o se encaminan hacia la diferenciación.

Aunque los fenómenos moleculares implicados en la diferenciación de los adipocitos no son totalmente conocidos, se describe en seguida un modelo dividido en cuatro etapas, tomando como ejemplo el modelo de diferenciación de la línea celular 3T3-L1:

1) **Inhibición del crecimiento**: Este paso previo en el programa de la adipogénesis ocurre cuando los preadipocitos alcanzan la confluencia. Los adipocitos se multiplican al punto de que llegan a inhibirse por contacto; lo cual cesa el crecimiento (Rosen & MacDougald, 2006).

2) **Expansión clonal**: Después de la detención del crecimiento celular y ante la estimulación hormonal con inductores adipogénicos, que el caso de las células 3T3-L1 consiste en una mezcla de insulina, IBMX y DEX, los preadipocitos entran de nuevo en el ciclo celular y sufren al menos dos rondas de mitosis. Esta etapa conocida como expansión clonal, es esencial para completar la diferenciación terminal en adipocitos maduros (Peña Moreno, 2014).

3) **Cambios tempranos en la expresión de genes**: posterior al cese de la expansión clonal, los factores PPAR-γ y C/EBPs inician su transcripción, desencadenando una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que le otorgan a la célula el fenotipo de adipocito (Rosen & MacDougald, 2006; Moseti et al., 2016).

4) **Diferenciación terminal**: finalmente se produce una inhibición permanente del crecimiento en los adipocitos, encontrando incrementada la expresión y actividad de las enzimas implicadas en la lipogénesis de *novo* tales como la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Moreno & Martínez, 2002).

Como se describió anteriormente, diversos modelos celulares pueden ser utilizados para el estudio del proceso de diferenciación adipocitaria *in vitro*. Por un lado, se encuentran las líneas celulares de fibroblastos multipotentes, tales como C3H 10T1/2, capaces de diferenciarse a distintos tipos de células, entre los que se encuentran los adipocitos. Por otro lado, las líneas celulares de pre-adipocitos unipotentes, tales como 3T3-L1, 3T3-F442A, Ob17 ya determinadas a diferenciarse en adipocitos. Sin embargo, la línea celular 3T3-L1 es el modelo celular mejor caracterizado para el estudio de la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos (Dave et al., 2012; Ruiz-Ojeda et al., 2016).

2.2.2.1 Modelos para el estudio de la adipogénesis

El conocimiento sobre el proceso de diferenciación de los adipocitos deriva inicialmente de estudios con líneas celulares establecidas o con preadipocitos primarios aislados del tejido adiposo (Viveros, Laviada, & Bastarrachea, 2004; Lafontan, 2012; Ruiz-Ojeda et al., 2016).

Las líneas celulares utilizadas para el estudio de la diferenciación adipocitaria se pueden dividir en 3 categorías:

1) Células embrionarias totipotentes capaces de generar todas las líneas celulares.
2) Células multipotentes que pueden dar lugar a miocitos, adipocitos y condrocitos.
3) Células unipotentes: ya comprometidas hacia la línea adiposa, que son las denominadas líneas celulares de preadipocitos (Tabla 1 y Figura 5).

Tabla 1

Modelos celulares in vitro para el estudio de la diferenciación adipocitaria

Línea celular	Origen/ Especie	Categoría	Protocolo de diferenciación
3T3-L1	Fibroblastos/ Embrión de ratón	Unipotente	Insulina + DEX + IBMX + FBS
3T3-F442A	Fibroblastos/ Embrión de ratón	Unipotente	Insulina + FBS
Ob17	Grasa epididimal/ Ratón obeso	Unipotente	Insulina + FBS + T_3
C3H 10T1/2	Células madre/ Embrión de ratón	Multipotente	Insulina + DEX + FBS
MEFs	Fibroblastos/ Embrión de ratón	Pluripotente	Insulina + DEX + IBMX + FBS

Nota: DEX= dexametasona, IBMX= isobutilmetilxantina, FBS= suero fetal bovino y T_3= triyodotironina.
Adaptado de Moreno & Martínez, 2002; Lafontan, 2012; Ruiz-Ojeda et al., 2016.

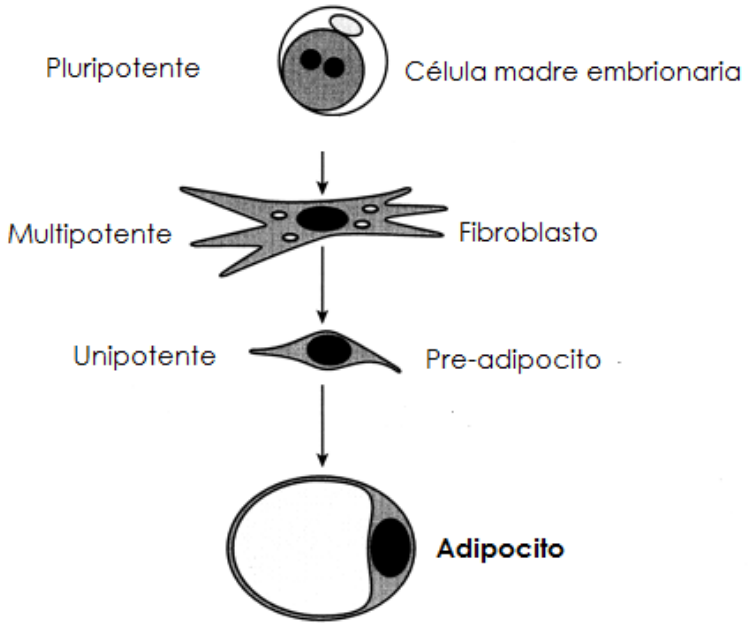


Figura 5. Diferenciación adipocitaria a partir de una célula madre pluripotente Adaptado de Ntambi, J., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *Journal of Nutrition*, 3122–3126.

Durante las fases de crecimiento las líneas celulares de preadipocitos, son morfológicamente similares a los fibroblastos (Lafontan, 2012). Una vez que las células han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*, el tratamiento con los inductores hormonales o farmacológicos adecuados conduce a un cambio drástico en la forma de las células, es decir, los preadipocitos se convierten en células de forma esférica que empiezan a acumular lípidos y que van adquiriendo progresivamente las características fenotípicas propias del adipocito maduro debido a cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes (Moreno & Martínez, 2002; Lafontan, 2012).

El modelo celular mayormente utilizado para el estudio de la diferenciación adipocitaria es la línea celular 3T3–L1. De hecho, cerca de un tercio de los artículos publicados en los últimos cinco años han descrito el uso de células 3T3-

L1 para el estudio de la adipogénesis y las características relacionadas con la obesidad (Ruiz-Ojeda et al., 2016).

El uso de estas células en lugar de emplear adipocitos humanos, se debe a que, estos últimos crecen en forma muy lenta y su diferenciación *in vitro* es insuficiente. Además, los requerimientos y necesidades del cultivo de adipocitos humanos son mayores debido a que demanda de la adición de diferentes componentes como: aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, minerales, compuestos orgánicos, hormonas, factores de crecimiento y una baja concentración de suero fetal bovino (5 %) (Hutley et al., 2004).

La línea celular 3T3-L1, es una línea celular de preadipocitos aislados por clonación a partir de células Swiss 3T3 derivadas de embriones de ratón (Green & Kehinde, 1975). Muestran morfología similar a los fibroblastos y aunque la conversión a adipocito puede ocurrir de forma espontánea dos o cuatro semanas después de haber alcanzado la confluencia, la diferenciación se ve acelerada tras el tratamiento durante 48 hrs con agentes adipogénicos como insulina, dexametasona (DEX) e isobutilmetilxantina (IBMX), que estimulan los niveles de AMPc intracelular en presencia de suero fetal bovino (FBS) (Ruiz-Ojeda et al., 2016; Moreno & Martínez, 2002).

Cuando las células son tratadas con estos inductores de la diferenciación, reciben una combinación de señales mitogénicas y adipogénicas, experimentando de dos a tres ciclos de división celular (expansión clonal) antes de detener su crecimiento y conducir a la expresión de genes para obtener el fenotipo de adipocito, momento en el que pierden su morfología típica de fibroblasto, redondeándose y acumulando triglicéridos al interior de la célula (lipogénesis), lo que conduce a la formación de adipocitos maduros (Moreno & Martínez, 2002; Lafontan, 2012).

2.3 Compuestos bioactivos como potencial terapéutico contra la obesidad

Actualmente existen evidencias que demuestran la fuerte interacción entre dieta y salud, por lo que en las últimas décadas el potencial terapéutico frente a la obesidad de diversos productos naturales y los compuestos bioactivos presentes en los mismos, ha despertado gran interés en la investigación científica (Martínez-López, García-García, Campos-Pérez, & González-Becerra, 2013; Meydani & Hasan, 2010).

Se considera compuesto bioactivo de un alimento, a aquel que aporta un beneficio a la salud más allá de lo considerado como nutrición básica. Estos componentes se encuentran en pequeñas cantidades en productos de origen vegetal (Chalé et al., 2014).

Entre estos compuestos bioactivos destacan los flavonoides, los cuales pueden ser estudiados a partir de extractos naturales o como compuestos aislados. Sus efectos anti-obesidad comprenden desde la reducción de la absorción intestinal de lípidos, aumento del gasto energético, supresión del apetito e incremento del metabolismo lipídico (De La Garza et al., 2015; De La Garza, 2014; Moseti, Regassa, & Kim, 2016).

Sin embargo, como se describió anteriormente el incremento del tejido adiposo característico de la obesidad involucra principalmente dos procesos metabólicos y celulares: la hiperplasia e hipertrofia de las células adiposas. Por lo tanto, la manipulación de estos mecanismos fisiológicos y moleculares es un objetivo prometedor para el tratamiento de esta condición patológica (Heber, 2010). En ese sentido, se ha evidenciado que diversos flavonoides actúan como agentes terapéuticos naturales en la prevención y tratamiento de la obesidad ya que tienen la capacidad de inhibir la adipogénesis y estimular la lipólisis en los adipocitos (Kowalska, 2011).

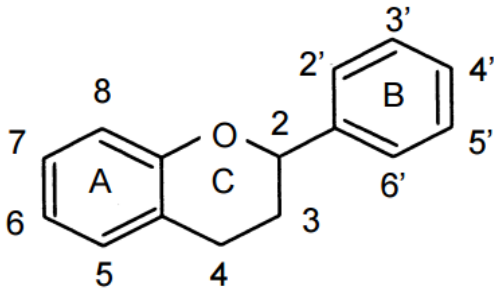
2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son el grupo más extenso de sustancias no energéticas ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal; principalmente frutas, verduras, semillas y leguminosas (soya), así como en diferentes bebidas tales como el vino y algunos tés. Debido a su distribución, son ampliamente consumidos en la dieta humana de forma habitual (Tabla 2) (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2003).

En general, son un grupo de sustancias naturales que han recibido un gran interés en los últimos años, debido a que se ha estudiado que una vez incorporados a la dieta humana, pueden ejercer efectos benéficos sobre la salud, como la prevención de distintas enfermedades, entre las que destaca la obesidad (Eseberri et al., 2015; Meydani & Hasan, 2010).

2.3.1.1 Estructura, clasificación y fuentes de consumo

Químicamente, los flavonoides comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C_6-C_3-C_6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2 al 6 (Figura 6) (Quiñones et al., 2012; Martínez-Flórez et al., 2003).



Flavonoide

Figura 6. Estructura química de los flavonoides

La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo C y de la posición del anillo B; obteniendo así, seis diferentes subgrupos de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Figura 7 y Tabla 2) (Del Rio et al., 2013; Tsao, 2010).

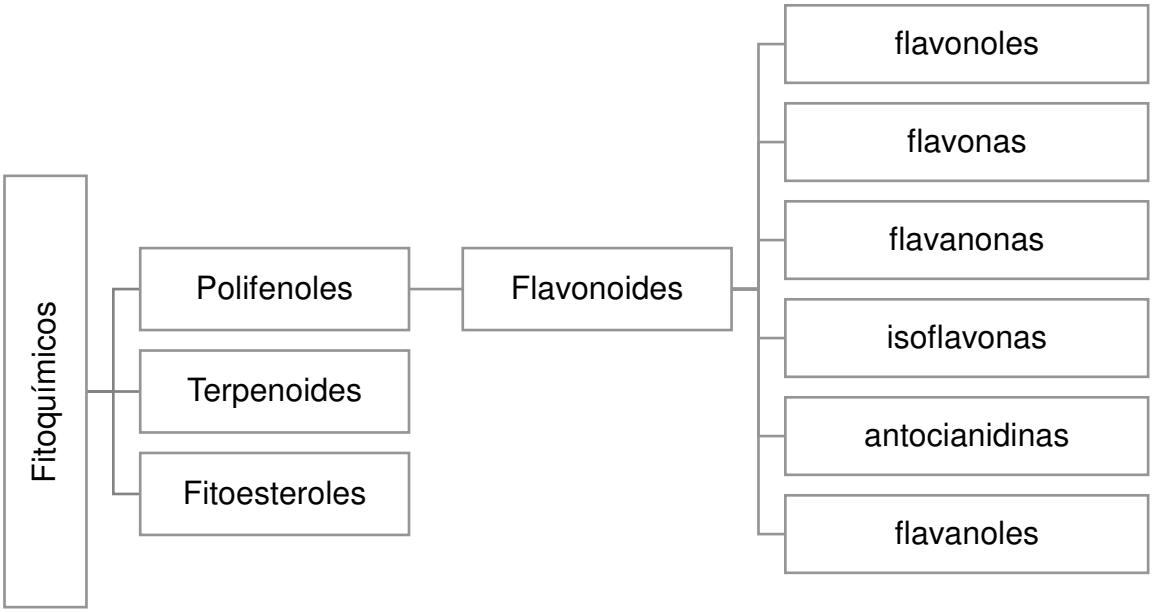
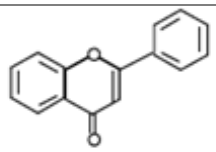
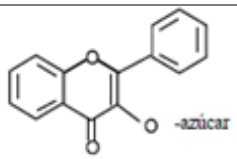
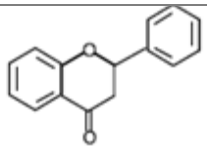
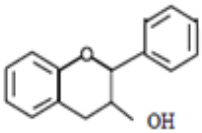
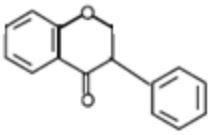
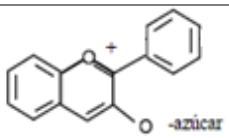


Figura 7. Clasificación de los flavonoides

Adaptado de De La Garza, A. L. (2014). *Anti-obesity and anti-diabetic properties of two natural extracts rich in flavonoids (Helichrysum and Grapefruit): Physiological and molecular mechanisms.*

Tabla 2

Estructura química de los flavonoides y fuentes de consumo

Subclase	Estructura	Compuestos	Fuente
Flavona		Sinensetina, apigenina y luteolina.	Hierbas, apio, pimiento, uvas, naranja y limón.
Flavonol		**Kaempferol**, quercetina y myricetina	Cebolla, brócoli, uvas, vino, tomate, naranja, manzana, té, frutos rojos.
Flavanona		**Naringenina**	Miel, cítricos (principalmente toronja), tomate.
Flavanol o catequina		Catequina, epicatequina y gallocatequina	Vino, chocolate, cocoa, té, uva, manzana y pera.
Isoflavona		Genisteína, daidzenina y gliciteína	Soya y leguminosas
Antocianina		Cianidina, pelargonidina, delfinidina y peonidina.	Frutos rojos, manzana, pera, uva y naranja.

Nota: Adaptado de Kozłowska & Szostak-Wegierek, 2014.

Por su parte, el consumo de flavonoides varía mucho dentro y entre las poblaciones, debido no sólo a las diferencias reales en la ingesta, sino también a causas como la variabilidad propia de las plantas, los métodos de procesamiento de los alimentos para su consumo, los análisis químicos utilizados para medir los

flavonoides presentes y el uso de diferentes bases de datos para el análisis de resultados. No obstante, la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, USDA (por sus siglas en inglés: United States Department of Agriculture) es una base de datos completa, precisa y ampliamente utilizada para estimar la ingesta total de flavonoides (Peterson, Dwyer, Jacques, & Mccullough, 2015).

Aunque no se cuenta con datos de ingesta promedio diaria de flavonoides en población mexicana, según Peterson et al., (2015) basado en los resultados de la encuesta NHANES (National Health and Nutrition Examination), para el 2014 en Estados Unidos, la ingesta total de flavonoides fue de 353 mg/día, siendo los flavanoles los de mayor consumo (81%), seguido de flavonoles (8%), flavanonas (5%), antocianidinas (5%), isoflavonas (1%) y flavonas (<1%).

2.3.1.2 Biodisponibilidad de los flavonoides

Para evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, uno de los aspectos más importantes a considerar es la biodisponibilidad de los mismos, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución y eliminación (Martínez-Flórez et al., 2003).

Además de las características químicas y estructurales revisadas con anterioridad, cabe destacar que los flavonoides se encuentran en los alimentos en forma de aglicona o mayoritariamente como glucósidos unidos a azucares como D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa y D-rutinosa (Martínez-Flórez et al., 2003; Tsao, 2010; Calderón-Montaño, Burgos-Morón, Pérez-Guerrero, & López-Lázaro, 2011).

Dicha estructura (aglicona o glucósido) determina las propiedades biológicas del compuesto y es un factor importante en el proceso de absorción. La cual inicia en el intestino delgado en donde las agliconas pasan mediante difusión pasiva por las células epiteliales; en cambio una porción de los flavonoides que se encuentran en forma de glucósidos son sometidos a hidrolisis

por la enzima lactasa floridizin hidrolasa (LPH), ubicada en el cepillo de las microvellosidades intestinales; otra porción son transportados al interior de las células epiteliales mediante el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) para posteriormente ser hidrolizadas a su forma aglicona gracias a la acción del enzima β-glucosidasa citosólica (CBG), por último una pequeña porción de compuestos que no son absorbidos en el intestino delgado llegan al colon, donde quedan disponibles para su degradación por la microbiota colónica (Figura 8) (Hollman, 2004; Del Rio et al., 2013). Las agliconas absorbidas en el intestino delgado y colon, son transportados en plasma a los distintos tejidos y órganos, donde ejercen sus funciones (Vicente-Vicente, Prieto, & Morales, 2013; Alvarez-Suarez, Giampieri, & Battino, 2013).

En cuanto a la excreción, los flavonoides se eliminan de forma lenta principalmente a través de la orina, aunque una parte puede ser secretada en la bilis y posteriormente eliminada en las heces (Vicente-Vicente et al., 2013).

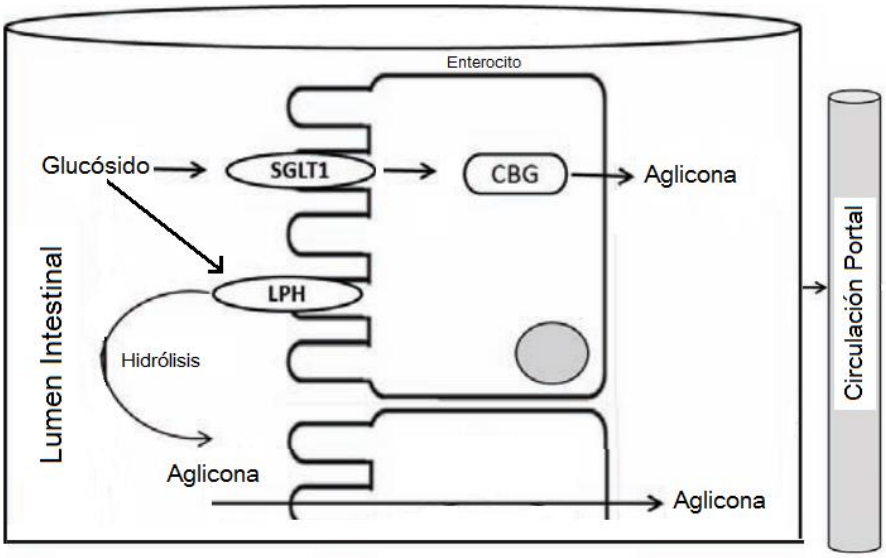


Figura 8. Mecanismo de absorción de los flavonoides en el intestino delgado

Adaptado de Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. Current Medicinal Chemistry, 20(5), 621–638.

La mayoría de las investigaciones que buscan elucidar los posibles efectos biológicos de los flavonoides en modelos celulares, hacen uso de los compuestos en su estructura aglicona, debido a que, como se describió anteriormente, después de ser absorbidos en el enterocito, pasan al sistema circulatorio y son transportados en esta forma a los diversos órganos diana en donde ejercen diversos efectos terapéuticos.

Investigaciones previas han utilizado dosis de tratamiento con flavonoides en valores de milimolar (mM), esto debido a que su concentración en plasma después de la ingesta dietética rara vez excede concentraciones nanomolares (nM). La baja biodisponibilidad de los polifenoles sugiere la necesidad de un consumo diario y crónico de alimentos ricos en flavonoides para mantener las concentraciones plasmáticas y garantizar el efecto de las propiedades fisiológicas que se les asocian (Del Rio et al., 2013).

2.4 Naringenina y kaempferol

La naringenina pertenece al subgrupo de flavanonas, los cuales son análogos de las flavonas con el anillo C saturado, se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C7 (Figura 9). Se encuentra abundantemente en la toronja y otros cítricos, además de estar presente en el tomate y en la miel (Quiñones et al., 2012).

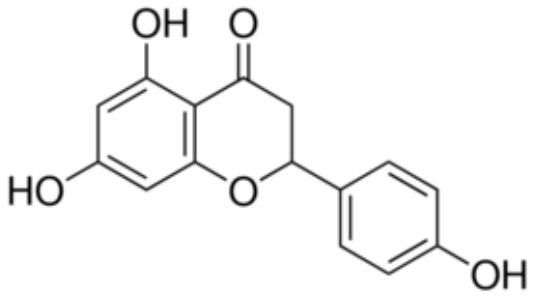


Figura 9. Estructura química de la naringenina

El kaempferol es un flavonol que estructuralmente se caracteriza por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Posee además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3 (Figura 10). Está presente en diversas fuentes naturales incluyendo manzanas, cebollas, brócoli, tomate, cítricos, uvas y frutos rojos (Quiñones et al., 2012).

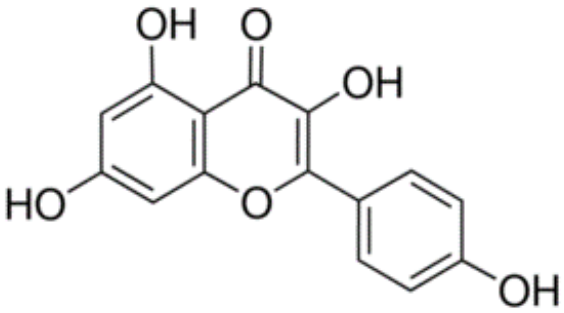


Figura 10. Estructura química del kaempferol

2.4.1 Propiedades terapéuticas de la naringenina y el kaempferol

En las últimas décadas ha habido un aumento en el número de investigaciones científicas sobre las diversas actividades farmacológicas de los flavonoides, principalmente a través de estudios *in vitro* y con modelos animales. Dichas investigaciones han evidenciado que los flavonoides son componentes dietéticos con la capacidad de modificar procesos fisiológicos, afectando así en la incidencia y severidad de distintas enfermedades (Martínez-López et al., 2013).

Particularmente las propiedades terapéuticas de la naringenina y el kaempferol se llevan a cabo a través de diferentes mecanismos biológicos entre los que destaca su actividad anti-oxidante, anti-inflamatoria y anti-obesidad.

2.4.1.1 Propiedades antiobesidad

Algunos mecanismos antiobesogénicos de los flavonoides, derivan de la capacidad que estos poseen de modular la expresión de genes involucrados en la diferenciación adipocitaria o adipogénesis (Yeon-Joo et al., 2015; Richard, Amini-Vaughan, Ribnicky, & Stephens, 2013).

Recientemente, se ha demostrado que el kaempferol regula negativamente la adipogénesis y disminuye la expresión de factores de transcripción relacionados con la diferenciación adipocitaria. El tratamiento con 30 µM de kaempferol en células 3T3-L1, mostró reducción en la acumulación de lípidos por las células, además de disminuir la expresión de genes diana involucrados en el proceso adipogénico (PPARγ y C/EBPα), dicho efecto sugiere que los flavonoides pueden reducir la masa del tejido adiposo inhibiendo las señales que promueven la adipogénesis (Yeon-Joo et al., 2015).

Por otra parte, según lo reportado por Richard, Amini-Vaughan, Ribnicky, & Stephens en el 2013, la naringenina posee efectos metabólicos beneficiosos, ya que inhibe la adipogénesis, indicando posibles efectos protectores ante la expansión del tejido adiposo. En este estudio utilizaron el modelo celular de preadipocitos de la línea 3T3-L1 y expusieron a los adipocitos a concentraciones de 50 µg/mL de naringenina, observando cambios substanciales en la disminución de la acumulación lipídica, además de que se encontró una disminución en la expresión de los genes aP2, PPARγ y STAT5A, los cuales están involucrados de manera importante en el proceso de adipogénesis.

2.4.1.2 Propiedades antiinflamatorias

Numerosos estudios han puesto en manifiesto que los flavonoides poseen efectos antiinflamatorios a través de múltiples mecanismos.

La actividad antiinflamatoria de kaempferol puede ser mediada por varios mecanismos de acción. La activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) aumenta la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas y enzimas

como TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, COX-2, entre otras. Diversos estudios han demostrado que el kaempferol inhibe la actividad de NF-κB (Yeon-Joo et al., 2015).

La proteína activadora 1 (AP-1) es un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones. En este sentido el kaempferol ha demostrado inhibir la activación de AP-1 (Calderón-Montaño et al., 2011). Las enzimas ciclooxigenasas (COX), lipoxigenasa (LOX) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se sabe que juegan un papel importante en la inflamación mediante la participación en la síntesis de eicosanoides y en la producción de especies reactivas de oxigeno (ROS), algunos estudios han demostrado que el kaempferol puede inhibir COX-2, LOX y iNOS (Calderón-Montaño et al., 2011).

Según lo reportado por Kim y colaboradores en el 2015, el tratamiento con 50 y 100 μM de kaempferol en líneas celulares de macrófagos, tiene la capacidad de inhibir la producción de óxido nítrico, además de reducir los niveles NF-κB y AP-1 y su actividad transcripcional, produciendo una disminución de los niveles de expresión de ARNm de genes inflamatorios que codifican óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), TNF-α, y ciclooxigenasa (COX) (Kim et al., 2015).

En resumen, numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han revelado que el kaempferol tiene actividad antiinflamatoria por diversos mecanismos implicados en esta actividad.

Por otro lado, estudios demuestran que la naringenina posee actividad antiinflamatoria, en modelos celulares de macrófagos con inflamación inducida. Este flavonoide normalizó los niveles de TNF-α y redujo la infiltración de células inflamatorias (Alam et al., 2014). Según lo reportado por Hämäläinen, Nieminen, Vuorela, Heinonen, & Moilanen en el 2007, el tratamiento con 100 μM de naringenina durante 6 hrs en líneas celulares de macrófagos disminuyó los

niveles de ARNm de la iNOS, además de inhibir la actividad de NF-κB (Hämäläinen, Nieminen, Vuorela, Heinonen, & Moilanen, 2007).

En modelos *in vivo* de ratas se demostró que la suplementación con naringenina disminuía la liberación de TNF-α (Patel, Singh, & Patel, 2014), además de regular positivamente los niveles de ARNm de las enzimas implicadas en β-oxidación, tales como el PPARγ (Alam et al., 2014).

Sin duda, el mejor tratamiento para combatir la obesidad consistiría en una modificación de los hábitos de vida, combinando el ejercicio con una alimentación adecuada. Una posible contribución a dicha alimentación podría basarse en la inclusión de alimentos funcionales que contengan moléculas que contribuyan a mejorar las alteraciones funcionales y metabólicas características de la obesidad. Este podría ser el caso de distintos flavonoides de la dieta, que han manifestado numerosas acciones beneficiosas para la salud.

III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad tiene un importante impacto sobre la salud de las personas que la padecen ya que no solo disminuye la calidad de vida, sino que además reduce la esperanza de vida y provoca que se requiera el uso de recursos sanitarios con mayor frecuencia y de forma más intensa (San Román, 2011).

Actualmente la obesidad es reconocida como un problema de salud pública que eleva el riesgo de múltiples enfermedades (hipertensión, diabetes tipo II, enfermedades coronarias, y ciertos tipos de cáncer).

La prevalencia de sobrepeso y obesidad aumenta en todo el mundo a una velocidad preocupante, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. La OMS declaró que la prevalencia mundial de obesidad se ha multiplicado más del doble tan solo en las últimas tres décadas.

Debido a estas cifras alarmantes a nivel mundial y nacional, considerando su etiología multifactorial y su carácter crónico se hacen necesarias acciones urgentes en una escala global, puesto que uno de los aspectos más críticos que presenta es su tratamiento (G. Rivera et al., 2007).

En esta patología, destaca el rol central de las células adiposas, al estar implicadas en el mantenimiento de la homeostasis lipídica y el balance energético (Badimon et al., 2015). El acúmulo excesivo de grasa corporal característico de la obesidad se puede producir mediante el aumento en el número (hiperplasia) o tamaño (hipertrofia) de los adipocitos (Heber, 2010). Por consiguiente, en los últimos años, se ha hecho un esfuerzo significativo en incrementar el conocimiento de los procesos moleculares implicados en el aumento del tejido adiposo, con la finalidad de localizar posibles dianas terapéuticas que resulten de utilidad en el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas (Miettinen et al., 2008; Moseti et al., 2016).

Actualmente existe una gran cantidad de suplementos dietéticos de origen natural que se utilizan con frecuencia en todo el mundo, sin embargo, la mayoría

de ellos carecen de estudios científicos que demuestren su eficacia (Pan et al., 2013).

En ese sentido, el potencial terapéutico de diversos componentes dietéticos o biomoléculas funcionales presentes en los alimentos ha despertado un gran interés en la investigación científica (Chalé et al., 2014). Entre estos compuestos destacan los flavonoides, que se encuentran en abundancia en alimentos de origen vegetal y tienen diferentes propiedades fisiológicas ya reconocidas (Eseberri et al., 2015; Meydani & Hasan, 2010).

Dentro de los mecanismos de acción por los cuales los flavonoides ejercen dichos efectos benéficos, se sabe que muchos de estos compuestos tienen la capacidad de afectar el genoma humano de manera directa o indirecta, al modificar la expresión de genes, influyendo así en el desarrollo de diversas patologías (Sanhueza & Valenzuela, 2012)

Sin embargo, se requiere de la realización de estudios *in vivo* e *in vitro* en el campo de la genómica nutricional que brinden los conocimientos base para la utilización e idenficación de diversos flavonoides con el propósito del realce de los mismos y la inclusión en dietas personalizadas, con el objetivo de prevenir y/o controlar enfermedades (Martínez-López et al., 2013; Pavlidis et al., 2015).

Los conocimientos derivados de la nutrigenómica permitirán proporcionar las herramientas para el correcto entendimiento de la obesidad; además de que en un futuro, proporcionará pautas para el control de dicha epidemia mundial, lo cual involucra la transición a efectuar una nutrición capaz de ser predictiva, preventiva, personalizada y participativa con la finalidad de modular la expresión de los genes a través de factores ambientales como la alimentación (Martínez-López et al., 2013).

IV. HIPÓTESIS

La naringenina y el kaempferol ejercen efectos antiobesidad a través de la regulación de la expresión de genes involucrados en el proceso de adipogénesis, lipolisis e inflamación.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Investigar los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el efecto antiobesidad de la naringenina y el kaempferol en células 3T3-L1.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la DL50 de naringenina y kaempferol en un modelo *in vitro*.

2. Evaluar el efecto de la naringenina y el kaempferol sobre el proceso de diferenciación adipocitaria en células 3T3-L1.

3. Analizar el efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la estimulación de la lipolisis en estudios *in vitro*.

4. Establecer el efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la regulación en la expresión de genes implicados en los procesos de diferenciación, lipolisis e inflamación en células 3T3-L1.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

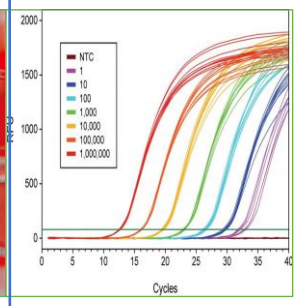
	Objetivo # 1	Objetivo # 2 y 3	Objetivo # 4
			
Cultivo de la línea celular 3T3-L1	**Medida de la citotoxicidad de los compuestos** •Uso del sistema luciferina / luciferasa •Elección de la dosis según DL50	**Tratamiento de la línea celular con kaempferol y naringenina** •Ensayos de inhibición de adipogénesis •Ensayos de inducción de la lipolisis •Análisis de datos	**Ensayos para cuantificar la expresión génica** •Extracción de ARN •Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN •Retrotranscripción del ARNm •PCR en tiempo real •Análisis de datos

Figura 11. Estrategia general del diseño experimental

6.1 Línea celular 3T3-L1

En el presente estudio se utilizó una línea celular preadipocitaria 3T3-L1, la cual es una subcepa desarrollada a través del aislamiento clonal de fibroblastos embrionarios de ratones Swiss albinos (Green & Kehinde, 1975). Esta línea celular 3T3 fue sometida al proceso de aislamiento clonal, desarrollado por Green & Kehinde, eligiendo aquellos clones capaces de diferenciarse de fibroblastos a adipocitos en presencia de una mezcla de inductores hormonales, obteniéndose así la línea celular 3T3-L1 (Green & Kehinde, 1975; Green & Kehinde, 1976).

La línea 3T3-L1 fue adquirida directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvo según las pautas establecidas por el proveedor, además se hizo uso del kit Adipogenesis Assay Kit Cell-Based (Abcam) para su adecuado cultivo y mantenimiento.

Material Biológico

- Línea celular 3T3-L1 (American Type Culture Collection, ATCC)

Reactivos

- Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, Caisson)
- Penicilina/estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml)
- Suero fetal bovino inactivado por el calor (FBS) 10%
- Dexametasona (Adipogenesis Assay Dexamethasone Solution, Abcam)
- Insulina (Adipogenesis Assay Insulin Solution, Abcam)
- Isobutilmetilxantina (IBMX) (Cell Based Assay IBMX Solution, Abcam)
- Tripsina-EDTA 0.25%.
- Dimetil sulfóxido (DMSO)

Equipo

- Campana de flujo laminar (Labconco)
- Estufa incubadora (Thermo Scientific)
- Cámara de Neubauer.

- Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5810 R)

Medios de cultivo

- *Medio de mantenimiento*: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS y un 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina.
- *Medio de iniciación*: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS y un 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, 1 µL/mL de IBMX, dexametasona e insulina.
- *Medio de continuación*: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS y un 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina y 1 µL/mL de insulina.

6.2 Cultivo de la línea celular

6.2.1 Cultivo en frasco

Las células se sembraron a una densidad inicial de 1000 células/cm^2 sobre frascos de cultivo T75 con 10 ml de medio de mantenimiento. El cultivo se mantuvo a 37ºC en atmósfera de CO_2 al 5% y cada dos días se hizo cambio de medio.

Después de 7 días a partir de la siembra inicial cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 60-80%, se retiró el medio de cultivo, se despegaron las células con 5 ml de solución de Tripsina- EDTA al 0.25%, y se incubaron a 37ºC por 10 min. Después se añadieron 5 ml de medio, se resuspendió en un tubo cónico y se procedió a centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, para posteriormente retirar todo el excedente. El pellet de células obtenido tras la centrifugación se resuspendió en 1ml de medio de mantenimiento.

6.2.2 Cultivo en placa

Después de que las células fueron despegadas con Tripsina- EDTA al 0.25% y transcurrida la centrifugación, se llevó a cabo el conteo de células en una cámara de Neubauber y posteriormente se sembraron en placas de6 cultivo

de 96 pocillos a una concentración de 2,500 células por pocillo. Una vez sembradas las células en las placas, se dejaron en medio de mantenimiento durante 24 hrs en donde se observó la formación de una monocapa confluente.

6.2.3 Diferenciación de adipocitos 3T3-L1

Una vez sembradas en las placas de 96 pocillos, formada la monocapa confluente y transcurridas las 24 hrs después de la confluencia (día 0) se indujo la diferenciación mediante la sustitución del medio de mantenimiento por medio de iniciación (DMEM + FBS + penicilina/estreptomicina + IBMX + dexametasona + insulina), el cual contiene factores que aumentan la concentración intracelular de APMc y la expresión de factores de transcripción implicados en la adipogénesis.

Después de 48 hrs (día 2), se cambió el medio de iniciación por medio de continuación (DMEM + FBS + penicilina/estreptomicina + insulina) el cual es enriquecido con insulina, en donde las células continúan almacenando grasa en su interior.

A partir de ese día las células se mantuvieron únicamente con ese medio (DMEM + FBS + penicilina/estreptomicina + insulina) y se hizo cambio de medio cada 2 días (Figura 12).

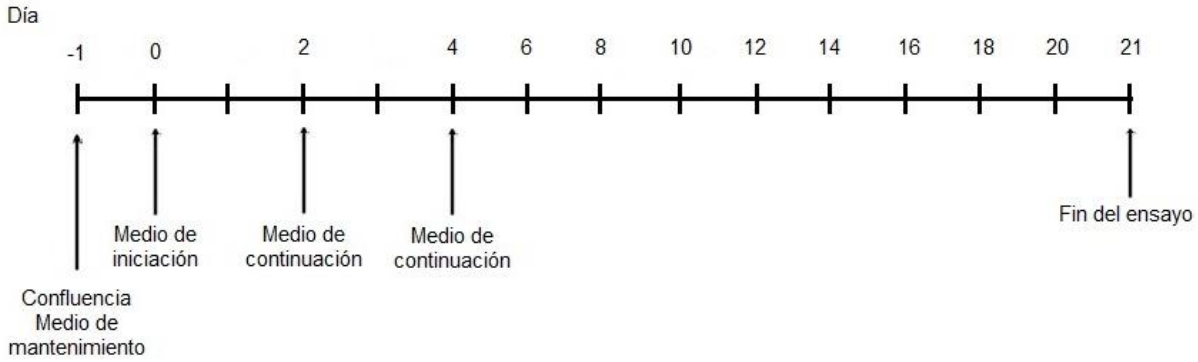


Figura 12. Esquema del protocolo de diferenciación adipocitaria de preadipocitos 3T3-L1

6.3 Obtención de los compuestos naringenina y kaempferol

Los compuestos naringenina (número de referencia: N5893) y el kaempferol (número de referencia: K0133) se obtuvieron directamente de la casa comercial Sigma-Aldrich.

6.3.1 Preparación de los compuestos

Previo a su utilización en los ensayos sobre la línea celular 3T3-L1, la naringenina y el kaempferol fueron disueltos en dimetilsulfóxido DMSO para facilitar su solubilidad en el medio de cultivo celular. Los compuestos fueron disueltos a una concentración de 10Mm, tomando 2.289 y 2.178 mg de kaempferol y naringenina respectivamente y 800 µL de DMSO. Una vez preparados los compuestos fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

6.3.2 Medida de la citotoxicidad de los compuestos

La adición de compuestos químicos distintos a los propios del medio de cultivo, como la naringenina y el kaempferol, pueden afectar la viabilidad de los cultivos celulares ejerciendo un efecto tóxico; la citotoxicidad puede manifestarse por una reducción del número de células viables en el cultivo.

El adenosín trifosfato (ATP) es el principal portador de energía en las células de todos los sistemas biológicos (Lomakina, Modestova, & Ugarova, 2015). Sirve como el principal donante inmediato de energía libre y está presente en todas las células metabólicamente activas, siendo este el principal indicador de la viabilidad celular, debido a que todas las células requieren ATP para permanecer vivas y llevar a cabo sus funciones (Lomakina et al., 2015).

En 1947 McElroy describe la reacción de bioluminiscencia del sistema luciferina/luciferasa y demuestra el rol del ATP como factor determinante en la emisión de luz (McElroy, 1947). En la década de 1990 los estudios bioquímicos del sistema luciferina/luciferasa señalan que la emisión luminosa es directamente

proporcional a la cantidad de ATP presente en el medio (Crouch, Kozlowski, Slater, & Fletcher, 1993).

Por lo tanto, en el presente estudio se determinó la citotoxicidad de los compuestos mediante el sistema luciferina/luciferasa descrito por Crouch, Kozlowski, Slater, & Fletcher, el cual es un método homogéneo para determinar el número de células viables en un cultivo celular en base a la cuantificación del ATP presente, que evidencia la presencia de células metabólicamente activas (Crouch et al., 1993). Este método se basa en la reacción luciferina-luciferasa, en donde el MgATP 2- convierte la luciferina en una forma que es capaz de ser catalíticamente oxidada por la luciferasa en una reacción quimioluminiscente de alto rendimiento cuántico. En condiciones óptimas la intensidad de la luz se relaciona linealmente con la concentración de ATP (Crouch et al., 1993).

En este sentido, se determinó la citotoxicidad de los compuestos sobre la línea celular, para obtener las concentraciones a utilizar para el tratamiento de las células. Dicho ensayo se desarrolló haciendo uso del kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), el cual implica la adición de un único reactivo (CellTiter-Glo Reactivo) directamente a las células cultivadas. La adición de dicho reactivo resulta en la lisis celular y la generación de una señal de luminiscencia proporcional a la cantidad de ATP presente, el cual a su vez es directamente proporcional al número de células presentes en cultivo.

Se emplearon placas de 96 pocillos, se sembraron 15,000 células por pocillo y se mantuvieron durante 24 hrs en medio de mantenimiento, tras las cuales el medio fue adicionado con distintas concentraciones de naringenina y kaempferol (20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 170 µM). Se analizó el efecto sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 hrs. Para ello, una vez concluidos los tiempos de tratamiento con los compuestos se hizo uso del sistema luciferina/luciferasa antes descrito para la medición de la citotoxidad de los compuestos en las células.

Reactivos

- CellTiter-Glo Buffer (Promega)
- Cell Titer-Glo Sustrato (Promega)

Equipo

- Luminómetro (Turner BioSystems Veritas Microplate Luminometer, Promega)

Procedimiento

a) Preparación de los reactivos

1. Descongelar la CellTiter-Glo Buffer, y equilibrar a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Equilibrar el sustrato liofilizado CellTiter-Glo a temperatura ambiente antes de su uso.
3. Transferir el volumen de CellTiter-Glo Buffer en la botella de Cell Titer-Glo sustrato, para reconstituir la enzima y formar el reactivo CellTiter-Glo.
4. Mezclar suavemente por agitación, girando o invirtiendo el contenido para obtener una solución homogénea.

b) Descripción del procedimiento

1. Se añadieron 100 µL de medio de cultivo a cada pocillo y 100 µL CellTiter-Glo Reactivo.
2. Se mezclaron los componentes durante 2 min para inducir la lisis celular.
3. Después de 10 min de estabilización de la señal luminiscente, se cuantificó la energía lumínica en el luminómetro.

6.3.3 Selección de las dosis según dosis letal media

Una vez realizado el estudio de toxicidad de los compuestos, para la evaluación de los mismos, se llevó a cabo la determinación de la Dosis Letal Media (DL50).

El valor de DL50 es el más representativo de la toxicidad de una sustancia, el cual se desarrolló en 1927 por J. W. Trevan y se define como: "aquella dosis que origina la muerte del 50% de la población expuesta". Este valor se utiliza para seleccionar la dosis a utilizar de un determinado compuesto o sustancia en diversos tipos de ensayos.

La selección de la dosis de naringenina y kaempferol a aplicar sobre los ensayos de diferenciación adipocitaria, se realizó en base a la DL50, la cual parte de graficar los resultados obtenidos según la medición de la absorbancia al término del ensayo. La concentración se eligió a partir de aquella primera dosis administrada que, a las 72 hrs de incubación se encuentre por arriba de la DL50 para cada compuesto.

6.3.4 Tinción con rojo oleoso

El rojo oleoso (*Oil Red O*) es un colorante histoquímico que tiñe lípidos neutros. Esta tinción, descrita por Ramírez-Zacarías fue utilizada para evaluar la cantidad de lípidos neutros de las células diferenciadas a adipocitos, representativo del grado de diferenciación adipocítica (Ramirez-Zacarias, Castro-Muñozledo, & Kuri-Harcuch, 1992).

En el presente estudio se hizo uso de los reactivos proporcionados por el kit Adipogenesis Assay Kit Cell-Based (Abcam).

Reactivos

- Lipid Droplets Assay Fixative (10X)
- Lipid Droplets Assay Wash Solution
- Lipid Droplets Assay Oil Red O Solution
- Lipid Droplets Assay Dye Extraction Solution

Equipo

- Microscopio óptico invertido (Carl Zeiss)

- Espectrofotómetro (iMark Microplate Reader, BIO-RAD)

Procedimiento

Una vez diferenciadas las células, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 75 µl de la solución fijadora Lipid Droplets Assay Assay Fixative, dejando reposar la solución por 15 min. Posteriormente se procedió a lavar por duplicado con 100 µl de la solución Lipid Droplets Assay Wash Solution, se dejó reposar por 5 min entre cada lavado y al finalizar se dejó secar; una vez secas se les adicionó la solución Lipid Droplets Assay Oil Red O Solution y se dejó reposar durante 20 min; transcurrido este tiempo se eliminó la tinción mediante tres lavados utilizando 100 µl de la solución Lipid Droplets Assay Wash Solution; por último, se extrajo el colorante incorporado por las células mediante la adición de 100 µl de la solución Lipid Droplets Assay Dye Extraction Solution y se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en el espectrofotómetro.

6.4 Tratamiento de la línea celular con los compuestos

Para el estudio del efecto funcional de los compuestos naringenina y kaempferol sobre la inhibición de la adipogénesis e inducción de la lipolisis, se utilizaron las concentraciones obtenidas a partir de los ensayos de citotoxicidad, en base a la DL50, dichas concentraciones fueron añadidas al medio de iniciación y de crecimiento, según el ensayo correspondiente.

6.4.1 Cuantificación de inhibición de adipogénesis

Para evaluar el efecto de la presencia de los compuestos en el medio de cultivo sobre el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1, las concentraciones seleccionadas de los compuestos naringenina y kaempferol, fueron añadidas por triplicado a los cultivos celulares en placas de 96 pocillos, junto con el medio de iniciación (100 µL por pocillo). En cada placa de ensayo se

utilizaron controles negativos los cuales únicamente contenían medio de iniciación.

Las células se incubaron con los compuestos a partir del día 0 y en cada cambio de medio se añadieron las dosis correspondientes para cada compuesto hasta completar los 21 días desde su inicio (Figura 13).

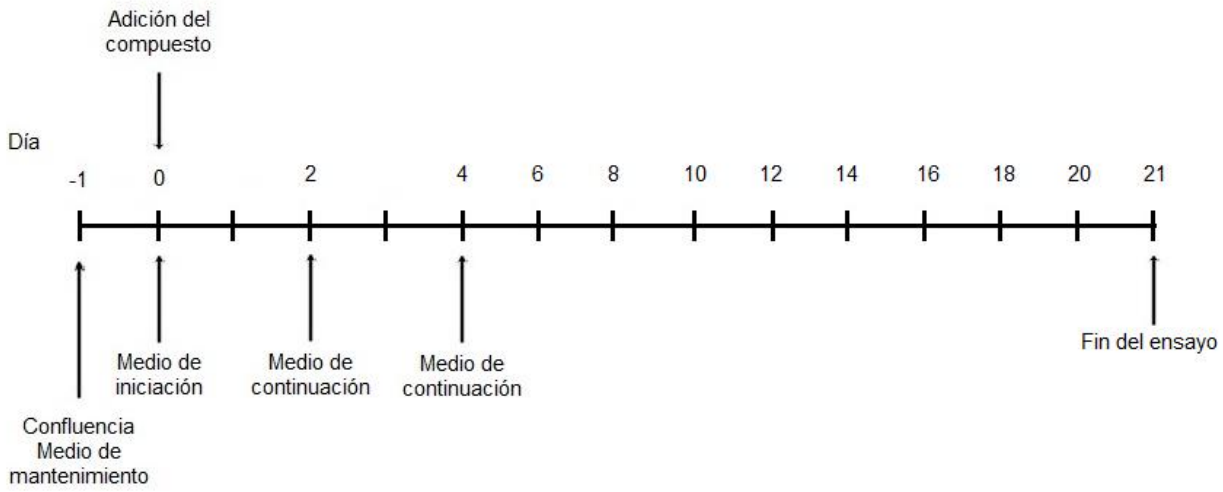


Figura 13. Esquema del ensayo de inhibición de la adipogénesis

Una vez concluido el experimento, la cuantificación relativa del contenido lipídico de las muestras se llevó a cabo mediante la tinción de las células con rojo oleoso. Las acumulaciones lipídicas fueron observadas al microscopio y fotografiadas. Después se procedió a la medición de la absorbancia de la muestra a 490 nm en el espectrofotómetro.

6.4.2 Cuantificación de la inducción de la lipolisis

Para evaluar el efecto de la presencia de los compuestos en el medio de cultivo sobre la inducción de la lipolisis en las células 3T3-L1, se realizó un ensayo que evaluó la capacidad de la naringenina y el kaempferol de inducir la

liberación de glicerol al medio de cultivo celular en los adipocitos ya diferenciados. En cada placa de 96 pocillos se añadieron junto con el medio de continuación las concentraciones establecidas de naringenina y kaempferol a las células ya diferenciadas. De igual manera, se utilizaron controles negativos los cuales contenían únicamente medio de iniciación.

Las células se incubaron con los compuestos a partir del día 12 y en cada cambio de medio se añadieron las dosis correspondientes para cada compuesto hasta completar los 21 días desde su inicio (Figura 14).

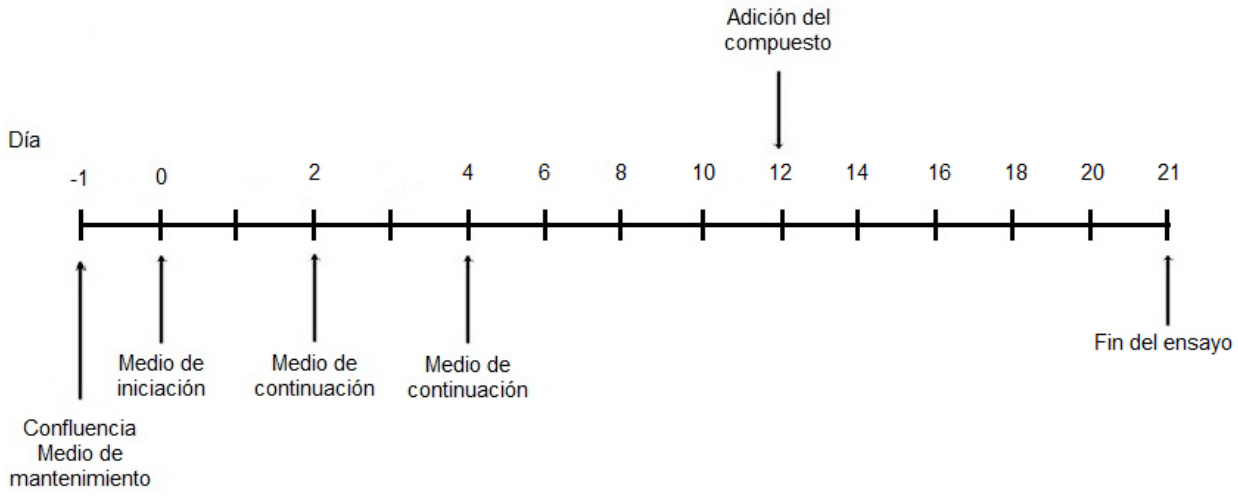


Figura 14. Esquema del ensayo de inducción de la lipolisis

La inducción de la lipolisis por parte de los compuestos se cuantificó mediante la tinción con rojo oleoso descrita anteriormente.

6.5 Ensayos para cuantificar la expresión génica

La expresión génica es el proceso por el que la información de un gen es usada en la síntesis de un producto génico funcional.

En 1993 Higuchi y colaboradores desarrollaron un método de análisis cuantitativo para cualquier secuencia de ADN amplificable que utiliza una videocámara para monitorear múltiples reacciones en cadena de polimerasa (PCR) simultáneas detectando la acumulación de ADN de doble cadena mediante el aumento de la fluorescencia de bromuro de etidio; dicha acumulación de fluorescencia durante la reacción de amplificación es directamente proporcional al número de copias de ADN (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993). Hoy en día esta técnica es conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa o en tiempo real con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR) y su capacidad para detectar y medir minúsculas cantidades de ácidos nucleicos en un amplio rango de muestras de diferentes orígenes la convierte en una herramienta excelente para su uso en la investigación científica (Bustin, 2000; Gadkar & Filion, 2008).

En conjunto, el método RT-qPCR empieza con la extracción de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), seguida de la síntesis de una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm, para finalmente amplificarlo en la PCR, en donde el producto amplificado puede detectarse a tiempo real dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc producida en cada ciclo.

6.5.1 Extracción y valoración de ARN

Uno de los métodos utilizados con frecuencia para la extracción de ARN, es el método BOOM, desarrollado por Boom y colaboradores en 1990 en donde se lleva a cabo la extracción con el ácido tiosanato de guanidina, separando los ácidos nucleicos con base en su alta afinidad para enlazarse en matrices de sílica, en vez de utilizar fenol. Dado que este método aísla tanto ADN como ARN, resulta esencial utilizar las nucleasas específicas para eliminar el ADN de la muestra (Boom et al., 1990).

En el presente estudio la extracción del ARNm se realizó mediante RNeasy Mini Kit (Qiagen), el cual está basado en el método descrito anteriormente; el procedimiento de extracción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este sistema consiste en unas columnas de centrifugado con una membrana con elevada especificidad por ARN.

Reactivos

- Columnas QIAshredder
- Buffer RW1
- Buffer RLT
- Buffer RPE
- Etanol al 70%
- Agua libre de RNasas

Equipo

- Microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417 R)

Procedimiento

Al concluir el proceso de diferenciación y el tratamiento con los compuestos, las células fueron lisadas directamente en la placa de 96 pocillos, agregando 100 µL de Buffer RLT a cada pocillo para lograr la rotura celular y liberar el contenido intracelular. Una vez lisadas las células, se recolectó el contenido de cada muestra por triplicado (300 µL) en tubos eppendorf y se siguió el protocolo establecido por el kit comercial RNeasy Mini Kit:

1. Añadir 300 µL de etanol al 70% al ARN diluido y mezclar bien por pipeteo.
2. Transferir la muestra (600 µL) a una columna de centrifugación RNeasy Mini ajustadas en un tubo colector y centrifugar a 10,000 rpm durante 15 segundos.
3. Seguidamente, decantar el eluído.

4. Añadir 700 µL de Buffer RW1 a la columna de centrifugación RNeasy y volver a centrifugar a 10,000 rpm durante 15 seg.
5. Decantar el eluído.
6. Añadir 500 µL de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy y centrifugar a 10,000 rpm durante 15 segundos.
7. Decantar el eluído.
8. Volver a añadir 500 µL de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy y centrifugar a 10,000 rpm durante 2 min para lavar la membrana.
9. Decantar el eluído.
10. Finalmente colocar la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo colector y agregar 30 µL de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna de centrifugación y proceder a centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min.
11. Los productos fueron conservados a -80º C hasta su utilización.

6.5.2 Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN

Un paso crítico para el análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real, es la calidad de las muestras de ARN. Existen varios procedimientos que aportan información sobre la calidad y cantidad del ARN. En el presente estudio se usaron dos técnicas: espectrofotometría y electroforesis.

Reactivos

- Agarosa (Bio-Rad)
- Buffer TBE 1x (Tris HCl, ácido bórico y EDTA)
- Buffer de carga para geles de agarosa (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega)

Equipo

- Espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 8000)
- Cámara de electroforesis (Bio-Rad)

Procedimiento

La cantidad y pureza de ARNm extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm corresponde al pico de absorbancia de los ácidos nucleicos y a 280 nm corresponde al pico de las proteínas. Si el ratio entre la absorbancia a 260 y 280 nm se encuentra en valores cercanos a 1.8 - 2, la muestra se considera pura y libre de contaminación de proteínas.

Además, se comprobó la calidad e integridad del material genético mediante una electroforesis, cargando 3 µL de muestra en gel de agarosa al 1% y observando posteriormente las dos bandas principales de ARN ribosómico.

6.5.3 Análisis por PCR cuantitativa

El análisis de la expresión génica en el presente estudio se realizó partiendo de ADNc sintetizado a partir de ARN total que fue aislado de la línea celular de adipocitos 3T3-L1.

La expresión génica se cuantificó mediante RT-qPCR y se llevó a cabo en dos pasos: retrotranscripción haciendo uso del kit GoScript Reverse Transcription System, Promega y PCR en tiempo real, para lo cual se utilizaron TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems.

6.5.3.1 Retrotranscripción (RT) del ARNm

Como el ARN no puede ser usado como molde para la PCR, el primer paso en un ensayo de RT-qPCR es una reacción de transcripción reversa, la cual consiste en la producción de una copia de ADNc del ARN de interés a través de la acción de la enzima transcriptasa reversa o retro transcriptasa (RT) (Bustin, 2000).

Esta reacción de retrotranscripción se realizó siguiendo el protocolo del kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), que permite la amplificación del ADNc utilizando como cebadores una mezcla de random primers (cebadores de secuencia aleatoria), que amplifican toda la población de ARNs presentes en la muestra.

Reactivos

- Random Primers
- H_2O libre de nucleasas
- GoScript Reaction Buffer
- $MgCl_2$
- Mix de nucleótidos, el cual contiene dNTPs
- Enzima Transcriptas Reversa
- Proteína recombinante inhibidora de ribonucleasas.

Equipo

- Termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Roche)

Procedimiento

Se utilizaron 16 µL de la mezcla de reactivos en tubos de PCR y se añadieron 4 µL de muestra de ARN a cada reacción (todas las muestras fueron previamente homogenizadas a una concentración final de 9 ng/uL). Los tubos se colocaron en el termociclador, el cual fue programado con el siguiente patrón térmico:

- 25°C por 5 min (extensión de hexámeros)
- 50°C por 60 min (síntesis de ADNc)
- 85°C por 15 min (inactivación de la transcriptasa reversa)

Una vez terminada la retrotranscripción, las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su utilización en la RT-qPCR.

6.5.3.2 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de amplificación del ADN.

Reactivos

- TaqMan Gene Expression Master Mix
- TaqMan Gene Expression Assay
- H_2O libre de nucleasas

Equipo

- Termociclador (Light Cycler 480, Roche)

Procedimiento

Una vez obtenido el ADNc de las muestras mediante transcripción reversa, se llevaron a cabo las reacciones de PCR a tiempo real en un termociclador con capacidad para placas de 96 pocillos. En cada uno de ellos se cargaron 10 µl de la siguiente mezcla de reacción:

- 5 µL TaqMan Gene Expression Master Mix
- 0.5 µL TaqMan Gene Expression Assay
- 0.5 µL ADNc correspondiente a cada muestra
- 4 µL H_2O libre de nucleasas

Una vez cargadas las placas, se llevaron al termociclador e incubadas siguiendo el protocolo establecido por el proveedor:

- 50°C por 2 min (incubación de UDG, sugerido por indicación del kit)
- 95°C por 10 min (inactivación de UDG y activación de la ADN polimerasa)
- Luego 40 ciclos de:
    - 95°C por 15 segundos (desnaturalización)
    - 60°C por 1 min (hibridación)

Las amplificaciones de cada muestra de ADNc se corrieron por triplicado, en placas de reacción de 96 pocillos en el equipo Light Cycler 480, Roche.

Los experimentos de RT-qPCR incluyen un gen de referencia o control para poder normalizar los resultados. Típicamente, el gen normalizador es un gen endógeno que se expresa de forma constitutiva y constante. En este trabajo, se utilizó el gen GAPDH.

Las sondas TaqMan utilizadas fueren seleccionadas de la base de datos del proveedor Applied Biosystems. Para la cuantificación de la eficacia de los ensayos llevados a cabo como inhibidores de la adipogénesis se utilizaron los genes PPAR-γ (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*, Mm00440940_m1) y C/EBPα (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*, Mm00514283_s1) al ser genes clave en el proceso de diferenciación adipocitaria. La cuantificación de la expresión génica en células 3T3-L1 de los genes ATGL (*Patatin-like phospholipase domain containing 2*, Mm00503040_m1) LIPE (*Lipase hormone sensitive,* Mm00495359_m1) y FASN (*Fatty acid synthase*, Mm00662319_m1) se llevaron a cabo a partir de los ensayos inductores de la lipolisis. Por último, el gen NFκB (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2*, Mm00479807_m1) fue seleccionado para su cuantificación al estar implicado en procesos inflamatorios.

6.5.3.3 Eficiencia de la amplificación por PCR

Previo a los ensayos por PCR en tiempo real, se hicieron curvas de calibración para calcular la eficiencia de las reacciones. A partir de las muestras de ADNc se hicieron cinco diluciones seriadas para su posterior análisis por PCR en tiempo real. Lo que permite establecer una correlación lineal entre el grado de dilución de la muestra, el cual se expresa como logaritmo en base 10 y los valores de Ct obtenidos.

La eficiencia de las reacciones se determinó a partir de las pendientes de la curva de calibración obtenidas y de acuerdo a la siguiente fórmula (Higuchi et al., 1993):

$$E=10[-1/\text{ pendiente}]$$

6.5.3.4 Análisis de resultados de los estudios de expresión génica

El análisis de expresión génica se realizó en base al valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el Light Cycler 480 Software Roche. Se hizo uso del método ΔΔCt, el cual permite determinar valores de expresión génica relativa (Livak & Schmittgen, 2001).

Los valores de Ct obtenidos para cada gen (gen diana) son normalizados con los valores del gen de referencia (gen control) y comparados entre las dos condiciones empleadas (tratamiento y control).

Con los valores de Ct, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\mathbf{\Delta Ct} = \text{Ct (gen diana)} - \text{Ct (gen control)}$$

$$\mathbf{\Delta\Delta Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct (calibrador)}$$

$$\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct}} = \text{Incremento de expresión del gen diana sobre el calibrador}$$

VII. PLAN DE ANÁLISIS

Las muestras utilizadas en cada experimento se analizaron por triplicado. Los resultados provienen de la media aritmética de los triplicados y se expresan como media ± desviación estándar de la media (DEM). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa informático SPSS Statistics 15.0. Se realizaron Análisis de Varianzas (ANOVAS) para comprobar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y se utilizó la Prueba de Dunnet para confirmar dichas diferencias. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El presente proyecto de investigación se apegó a las condiciones y lineamientos de trabajo a llevar a cabo en un laboratorio establecidas por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud de la U.A.N.L (COBICIS).

Estos comités se apegan a las disposiciones emitidas por organismos nacionales e internacionales en materia de investigación y establecen pautas a seguir para el adecuado manejo de material biológico como cultivos celulares, dentro de estos lineamientos destacan:

- Se deberá contar con la indumentaria apropiada como bata y guantes, los cuales serán portados en todo momento.
- Se deberán mantener abastecidos frascos aspersores con soluciones de descontaminación.
- Se deberá contar con un estuche de desechos biológicos específicos para las líneas celulares.
- Al inicio y término de la jornada laboral se deberán limpiar las áreas de trabajo correspondientes al cuarto de cultivo.
- Únicamente pueden ser utilizadas pipetas, micropipetas, puntillas, frascos de cultivo o cualquier otro material destinado a cultivo celular que haya sido previamente esterilizado.
- Cualquier material utilizado para la manipulación del cultivo celular deberá ser desechado en el bote de residuos biológicos.

IX. RECURSOS

9.1 Equipo, materiales e instrumentos

El presente proyecto se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), particularmente en la Unidad de Genómica, y se hizo uso de los siguientes equipos, materiales e instrumentos:

Equipos

- Campana de flujo laminar (Labconco)
- Estufa incubadora (Thermo Scientific)
- Cámara de Neubauer.
- Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5810 R)
- Luminómetro (Turner BioSystems Veritas Microplate Luminometer, Promega)
- Microscopio óptico invertido (Carl Zeiss)
- Espectrofotómetro (iMark Microplate Reader, BIO-RAD)
- Microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417 R)
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 8000)
- Cámara de electroforesis (BIO-RAD)
- Termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Roche)
- Termociclador (Light Cycler 480, Roche)

Reactivos

- Línea celular 3T3-L1 (American Type Culture Collection, ATCC)
- Kit Adipogenesis Assay Kit Cell-Based (Abcam)
- Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, Caisson)
- Penicilina/estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml)
- Suero fetal bovino inactivado por el calor (FBS) 10%
- Tripsina-EDTA 0.25%.
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)

- Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Agarosa (BIO-RAD)
- Buffer TBE 1x
- Buffer de carga para geles de agarosa (Green Go Taq Flexi Buffer, Promega)
- Kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega),
- TaqMan Gene Expression Master Mix
- TaqMan Gene Expression Assay

9.2 Financieros

Proyecto financiado por PRODEP con número de registro 16-FaSPyN-SA-10.

9.3 Humanos

Participaron investigadores de la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), así como asistentes y técnicos de laboratorio.

X. RESULTADOS

10.1 Citotoxicidad de los compuestos sobre la línea celular 3T3-L1

Antes de llevar al acabo los ensayos para la determinación del efecto de los flavonoides sobre el proceso de diferenciación celular y el contenido lipídico, se realizó la determinación del efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la viabilidad celular, con el objetivo de descartar un posible efecto citotóxico en las células.

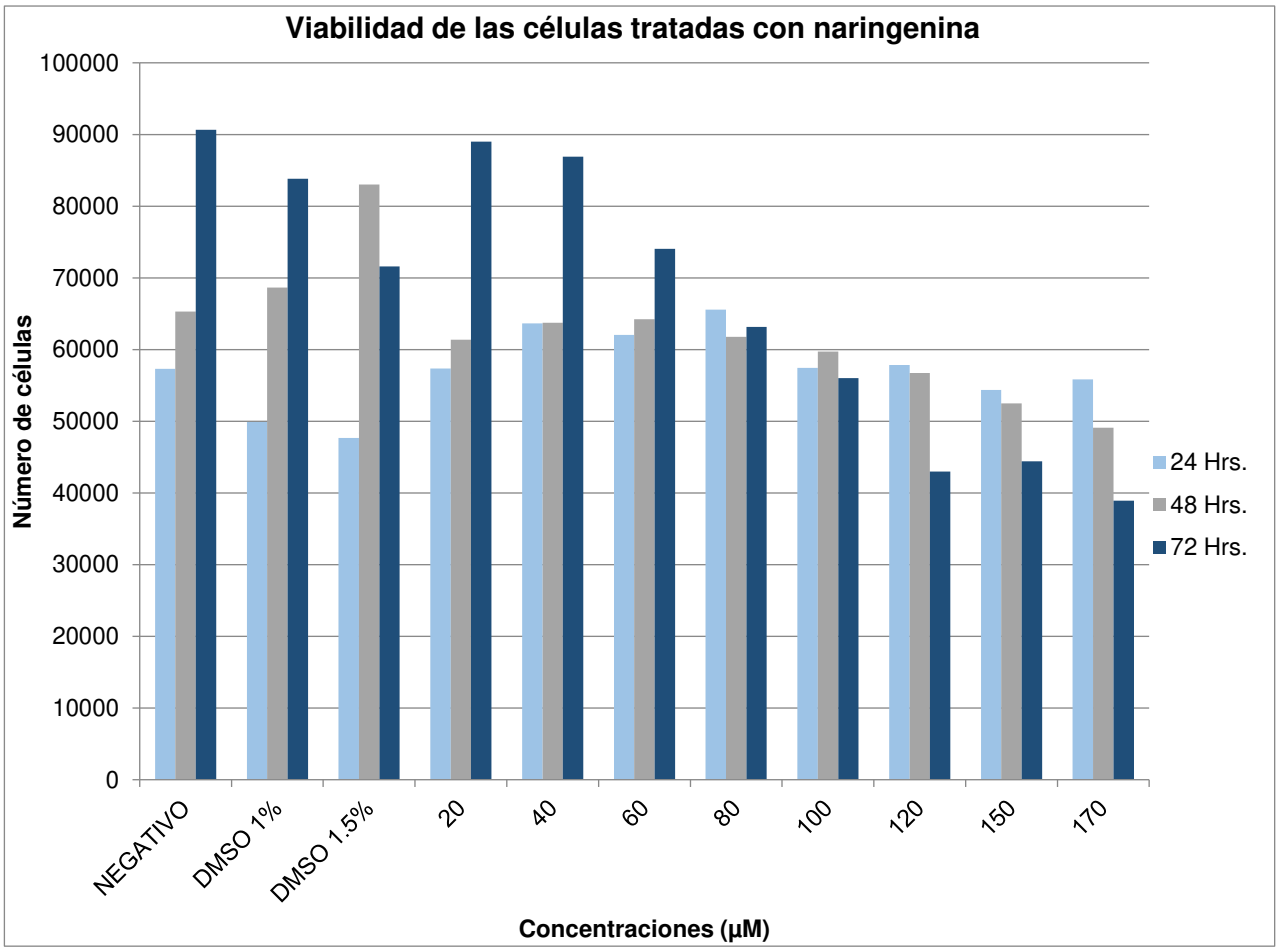


Figura 15. Efecto de la naringenina sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

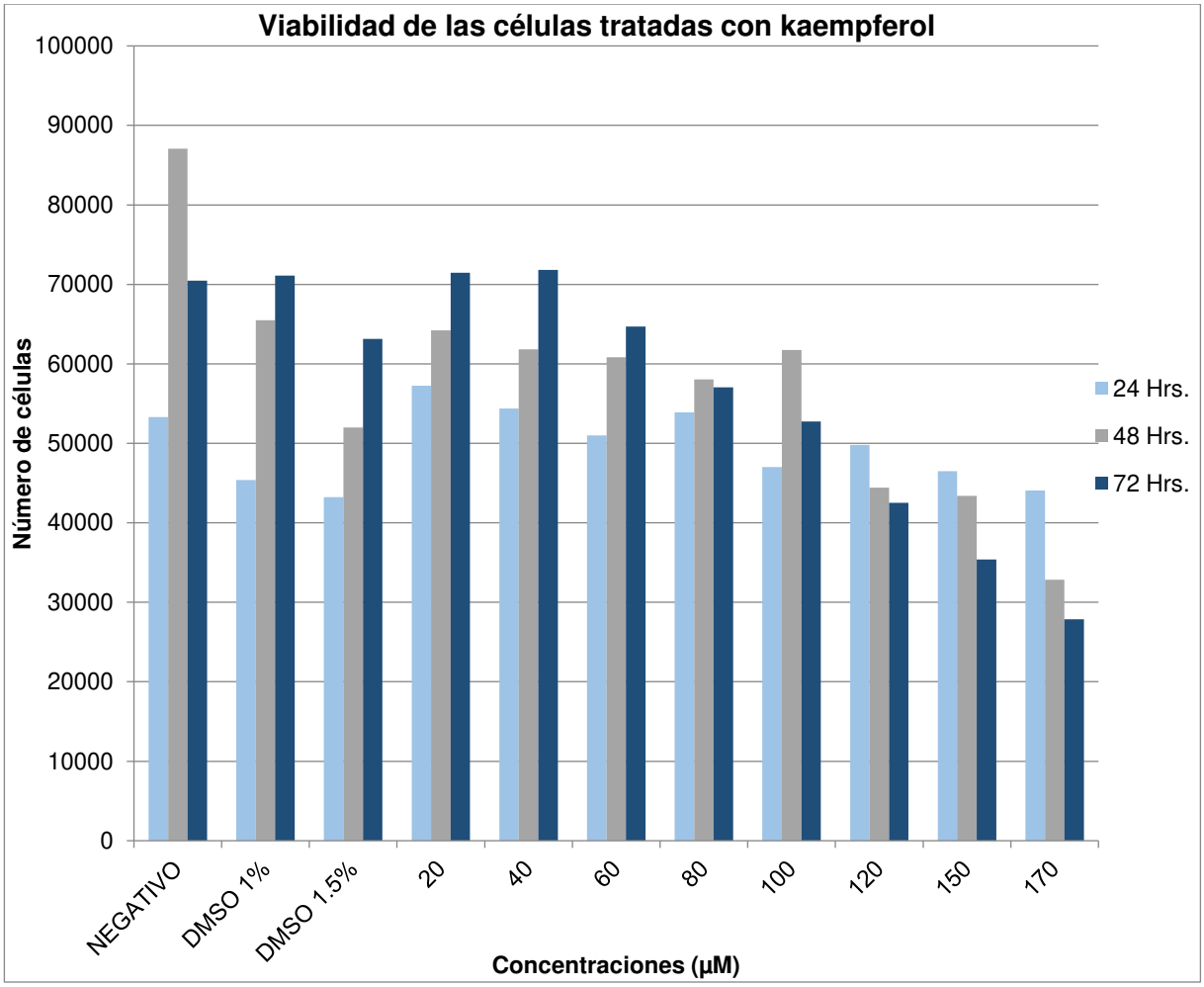


Figura 16. Efecto de la kaempferol sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento

Las Figuras 15 y 16 muestran el efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 hrs de tratamiento. La naringenina no mostró diferencias en el número de células a las 24 y 48 hrs de tratamiento, sin embargo, a las 72 hrs se observó un descenso significativo en la viabilidad celular dependiente de las concentraciones utilizadas. La DL50 se encontró en los 150 µM, en ese sentido, se determinó la concentración a utilizar en el estudio que fue de 120 µM.

Por otro lado, el kaempferol mostró efectos citotóxicos a partir de las 48 hrs, disminuyendo el número de células vivas. A las 72 hrs de tratamiento la DL50 se registró en 150 µM, por lo que a primera instancia se determinó utilizar 120

µM del compuesto para el tratamiento de la línea celular 3T3-L1 (21 días), sin embargo, después de la cuarta adición del flavonoide al medio de cultivo, se pudo observar que generaba un efecto citotóxico provocando la apoptosis celular. Por lo anterior, se eligió trabajar con 60 µM, debido a que esta dosis no generó ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular durante los 21 días del ensayo.

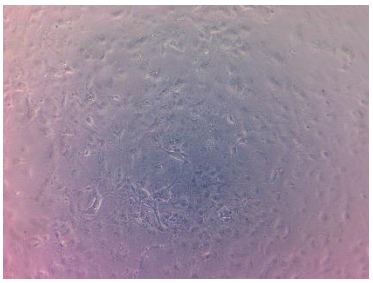
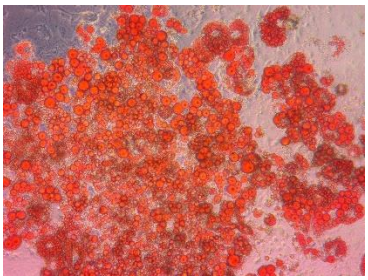
10.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre los procesos de adipogénesis y lipolisis

El potencial anti-obesidad *in vitro* de la naringenina y el kaempferol se ha evaluado mediante el análisis del efecto producido por los mismos en la inhibición de la diferenciación de las células 3T3-L1 (adipogénesis) y de la capacidad de disminuir el contenido lipídico intracelular (inducción de lipolisis).

Una vez realizados los ensayos de viabilidad celular y llevado a punto la técnica de diferenciación, se llevaron a cabo los ensayos de inhibición de adipogénesis e inducción de lipolisis por los compuestos. Dichos ensayos se realizaron en placas de cultivo de 96 pocillos como se describió en la metodología y todas las placas de ensayo presentaron controles negativos (células 3T3-L1 sin inductores de diferenciación y sin compuestos) y positivos (células 3T3-L1 con inductores de diferenciación y sin compuestos).

10.2.1 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inhibición de la adipogénesis

Después de la inducción de la diferenciación se empezaron a observar cambios morfológicos entre el control positivo y las células tratadas con los flavonoides. A los 21 días del ensayo, la proporción de células diferenciadas en presencia o ausencia de naringenina y kaempferol, fue determinada de manera cualitativa mediante visualización en microscopio (Figura 17) y cuantitativamente haciendo uso de técnicas espectroscópicas según el grado de tinción de las células con el colorante histoquímico rojo oleoso (Figura 18).

Controles	
 *Negativo* DMEM + FBS 10%	 *Positivo* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1%

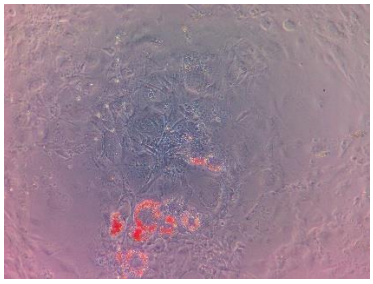
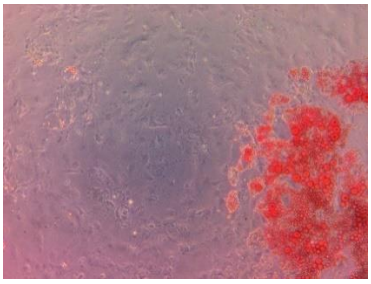
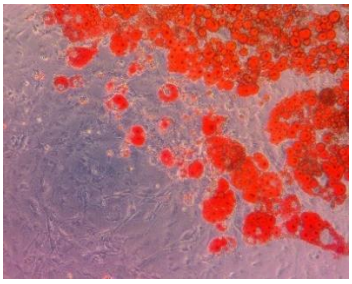
Tratamiento		
 *Kaempferol* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1% + 60 µM de kaempferol	 *Naringenina* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1% + 120 µM de naringenina	 *Kaempferol + Naringenina* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1% + 30 µM de kaempferol 60 µM de naringenina

Figura 17. Células 3T3-L1 tratadas con kaempferol y naringenina desde el inicio del ensayo (día 0) hasta el día 21.

Nota: Las fotografías corresponden a un experimento representativo para cada compuesto. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico (Carl Zeiss) a 40x.

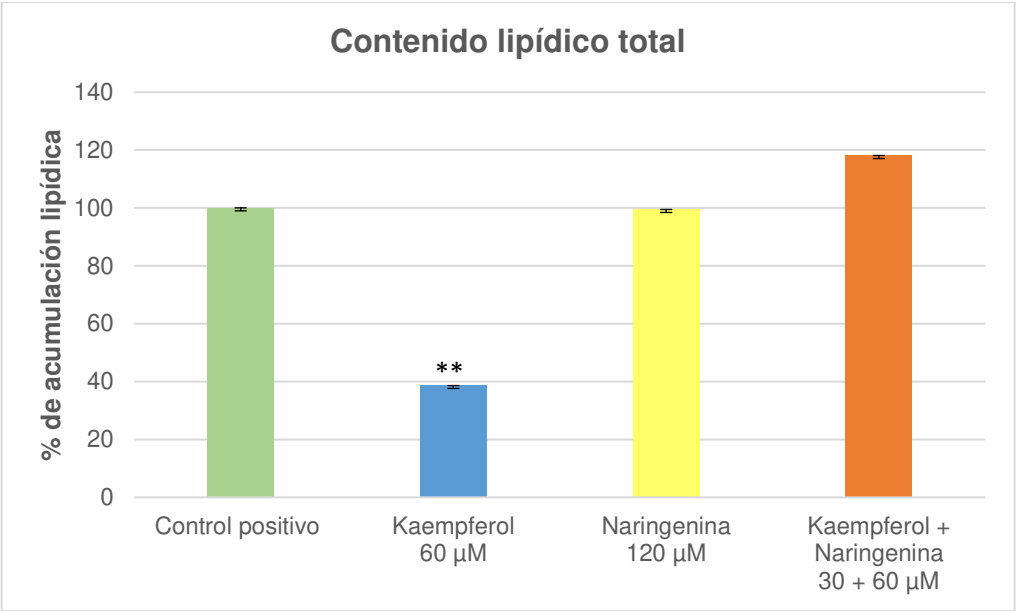


Figura 18. Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre el contenido lipídico de las muestras tratadas desde el inicio del ensayo (día 0) hasta el día 21.

*Los resultados son expresados como porcentaje de acumulación lipídica respecto al control positivo de células diferenciadas sin tratamiento (100%). Los datos corresponden a la media ± DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y prueba de Dunnett para analizar las diferencias entre los tratamientos y el control positivo (n = 6/grupo) ** $p < 0.01$.*

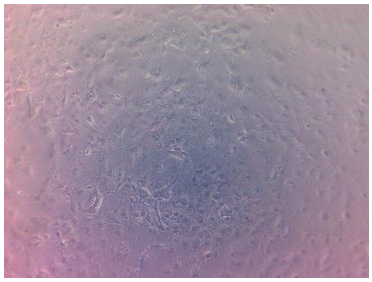
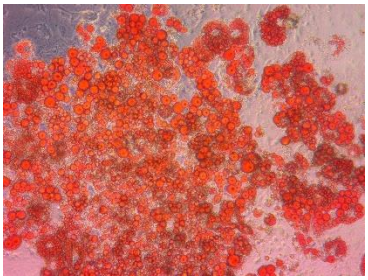
La gráfica resultante muestra una reducción significativa en el % de acumulación lipídica cuando el kaempferol es añadido al medio de cultivo a partir del día 0 del ensayo, lo que indica que dicho flavonoide ejerce un potente efecto inhibitorio sobre el proceso de adipogénesis, reduciéndolo un 62% respecto al control positivo *($p < 0.001$).*

En cuanto al tratamiento de la línea celular con 120 µM de naringenina no se observaron cambios en el % de acumulación lipídica, presentando valores de 99.44% respecto al control positivo (100%).

Por otro lado, la combinación de los flavonoides kaempferol y naringenina aumentó aunque no de manera significativa el % de acumulación lipídica en las células 3T3-L1, produciendo un aumento del 18% respecto al control positivo.

10.2.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inducción de la lipolisis

Una vez analizado el efecto de la naringenina y el kaempferol sobre los procesos de diferenciación celular, se procedió a evaluar el efecto de los flavonoides sobre el contenido lipídico intracelular en células 3T3-L1 diferenciadas, es decir, adipocitos maduros. Para este ensayo las células fueron tratadas con los compuestos a partir del día 12 y de igual manera al día 21 del ensayo, el contenido lipídico de las muestras en presencia o ausencia de naringenina y kaempferol, fue determinada de manera cualitativa mediante visualización en microscopio (Figura 19) y cuantitativamente con el colorante histoquímico rojo oleoso (Figura 20).

Controles	
 *Negativo* DMEM + FBS 10%	 *Positivo* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1%

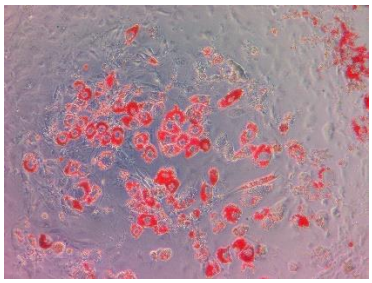
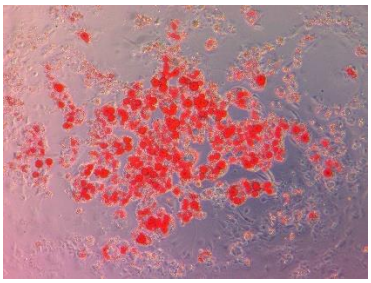
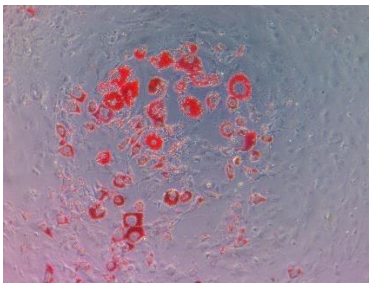
Tratamiento		
 *Kaempferol* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1% + 60 µM de kaempferol	 *Naringenina* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1% + 120 µM de naringenina	 *Kaempferol +* *Naringenina* DMEM + FBS 10% + IBMX, DEX e Insulina 1% + 30 µM de kaempferol 60 µM de naringenina

Figura 19. Células 3T3-L1 tratadas con kaempferol y naringenina al intermedio del ensayo (día 12) hasta el día 21.

Nota: Las fotografías corresponden a un experimento representativo para cada compuesto. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico (Carl Zeiss) a 40x.

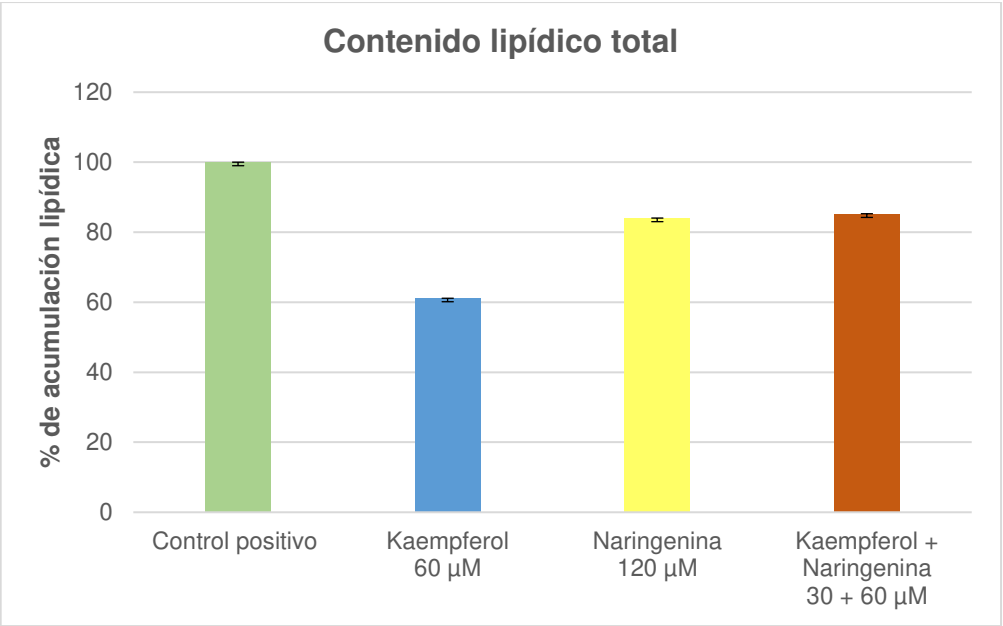


Figura 20. Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre el contenido lipídico de las muestras al intermedio del ensayo (día 12) hasta el día 21.

Los resultados son expresados como porcentaje de acumulación lipídica respecto al control positivo de células diferenciadas sin tratamiento (100%). Los datos corresponden a la media ± DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y prueba de Dunnett para analizar las diferencias entre los tratamientos y el control positivo (n = 6/grupo).

El kaempferol disminuye el contenido lipídico intracelular cuando es añadido al medio de cultivo a partir del día 12 del ensayo (Figura 19), observándose células morfológicamente más pequeñas respecto al control positivo, este mismo efecto se ve representado en la gráfica (Figura 20), con un 39% de disminución en el porcentaje de acumulación lipídica, sin embargo, este resultado no obtuvo la significancia estadística *(p=.256).*

Por su parte, el contenido lipídico intracelular en adipocitos maduros disminuyó un 16% tras el tratamiento con naringenina y un 15% en las células tratadas con la combinación de ambos flavonoides (kaempferol + naringenina).

10.3 Análisis de expresión génica

Finalizados los 21 días de tratamiento de la línea celular adipocitaria 3T3-L1 con los flavonoides, y analizados los diversos efectos antiobesidad que éstos producen (inhibición de la diferenciación y disminución en el contenido lipídico intracelular en adipocitos maduros), se llevó a cabo el análisis de expresión génica que acompañan dichos cambios fenotípicos, mediante RT-qPCR.

Primero se llevó a cabo la extracción del ARN de las muestras, cuya integridad y concentración se determinó mediante espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop 8000) y electroforesis con geles de agarosa al 1% (Figura 21). Posteriormente se igualaron cada una de las muestras a la concentración mínima obtenida (9 ng/uL), para proceder a la síntesis de ADNc utilizando como cebadores una mezcla de nucleótidos de secuencia aleatoria. A continuación, se realizaron los ensayos de RT-qPCR, empleando sondas TaqMan específicas para los genes PPAR-γ, C/EBPα, PNPLA2, LIPE, FASN, NFκB y GAPDH (gen control).

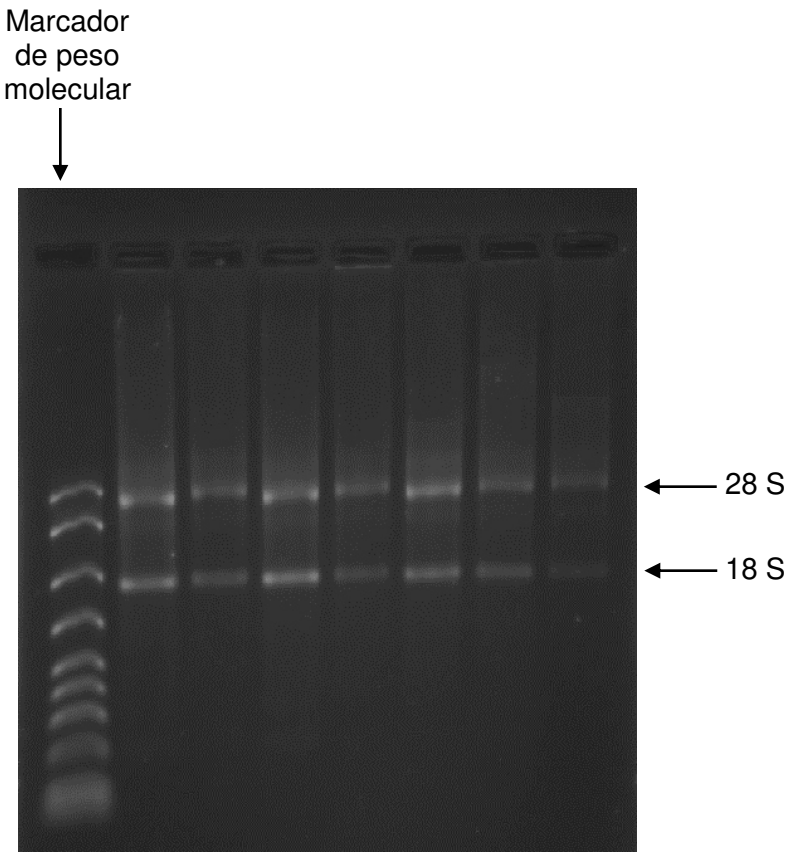
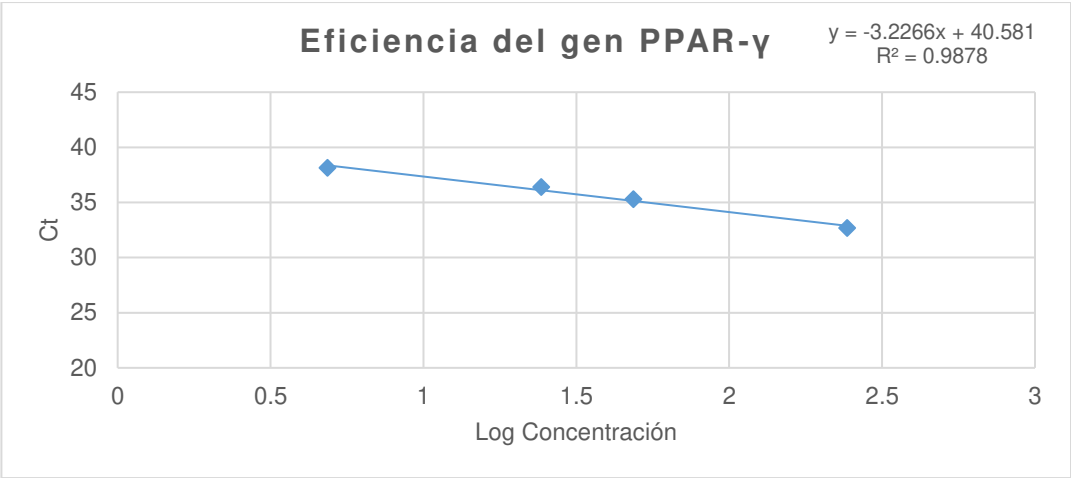
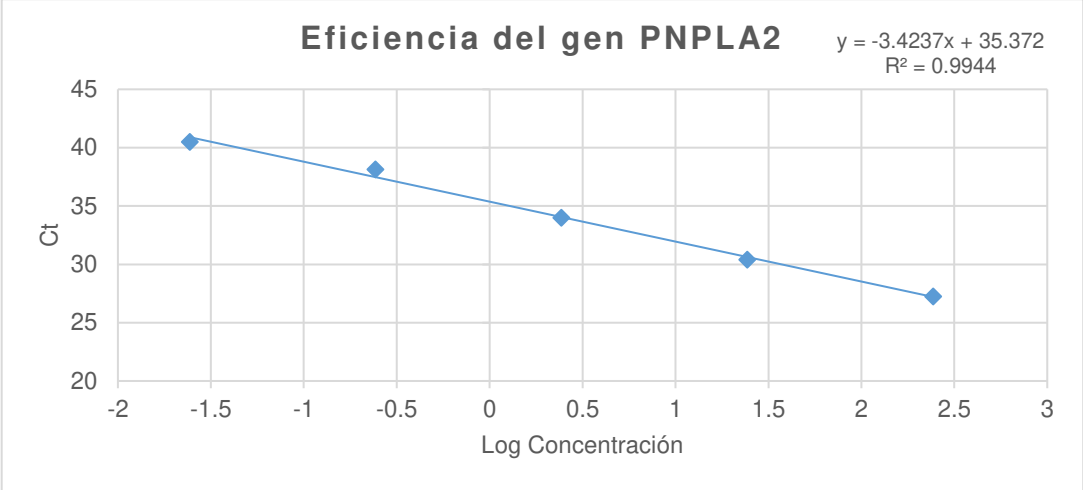


Figura 21. Resultados de la electroforesis capilar posterior a la extracción de ARN

Nota: Las muestras corresponden a un experimento representativo para cada compuesto.

Previo a los ensayos de cuantificación de expresión génica, se llevó a cabo la puesta a punto de la técnica de qPCR, en dónde se determinó la eficiencia de amplificación de cada una de las sondas. Los resultados de estos ensayos demostraron que las eficiencias de amplificación para todas las sondas se encontraban dentro del rango (90 – 115%), lo que asegura obtener datos de expresión génica fiables y precisos (Figura 22 y Tabla 3).





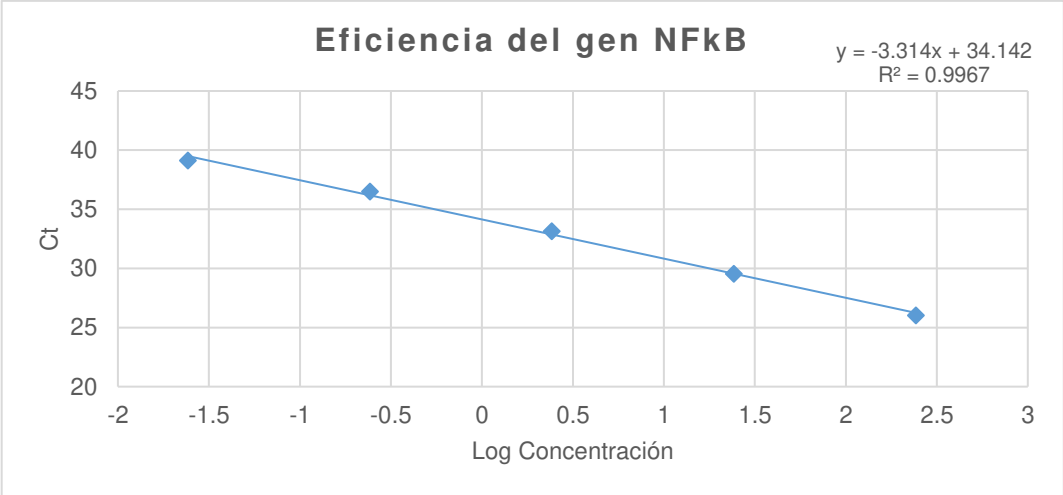


Figura 22. Curvas de calibración para los genes PPAR-γ, PNPLA2 y NFkB

Tabla 3

Eficiencias de amplificación de los genes

Gen	% de Eficiencia
PPAR-γ	104
C/EBPα	115
PNPLA2	95
LIPE	92
FASN	91
NFκB	100
GAPDH	93

Otro paso previo a los ensayos de expresión, fue determinar que los valores de Ct entre los distintos genes no mostraran variabilidad en relación a GAPDH, por lo que se graficaron las diferentes concentraciones empleadas de ADNc y la diferencia entre el ciclo de amplificación del gen de estudio y el gen control. Todos los valores de las pendientes obtenidas para cada uno de los genes fue 0, es decir, estos ensayos validaron la utilización de GAPDH como gen control.

Para el cálculo de la expresión génica relativa (RQ) se utilizó el método ΔΔCt utilizando como control la expresión de cada gen en las células 3T3-L1 con inductores de diferenciación y sin compuestos (control positivo), y como gen de referencia para la normalización de los datos, la expresión de GAPDH.

10.3.1 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la expresión de los genes implicados en la adipogénesis

El proceso de diferenciación adipocitaria es principalmente regulado por los factores de transcripción PPAR-γ y C/EBPα, los cuales son codificados por los genes PPAR-γ y C/EBPα respectivamente, y en conjunto son los encargados de regular la expresión de un gran conjunto de genes fenotípicos de adipocitos maduros (Hu et al., 2015). Ambos genes fueron analizados en el presente estudio, con la finalidad de observar cambios en su expresión en las células 3T3-L1.

Se observa un aumento significativo en la expresión del gen PPAR-γ en las células que fueron tratadas con la combinación de los dos flavonoides (kaempferol y naringenina). Por otro lado, la expresión del factor de transcripción C/EBPα se ve disminuida en las células 3T3-L1 tratadas con kaempferol (Figura 23).

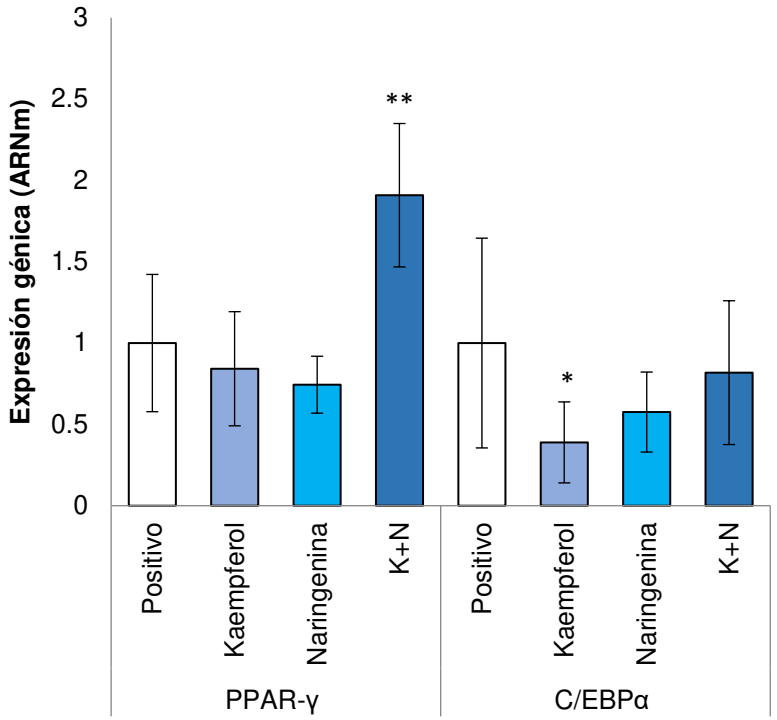


Figura 23. Expresión génica de PPAR-γ y C/EBPα en células 3T3-L1 tratadas con naringenina y kaempferol durante el proceso de diferenciación.

El nivel de expresión se calculó mediante cuantificación relativa con respecto al control positivo. Los resultados se expresan como Fold change y los datos corresponden a la media ± DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y prueba de Dunnett para analizar las diferencias entre los tratamientos y el control positivo (normalizado a 1) (n = 6/grupo). ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$).*

10.3.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la expresión de los genes implicados en lipolisis

Una vez diferenciadas las células 3T3-L1 (día 12), fueron tratadas con los compuestos para evaluar su potencial lipolítico. En el análisis por RT-qPCR se incluyó el estudio de la expresión génica de LIPE, PNPLA2 y FASN.

La lipólisis es una de las rutas metabólicas de gran importancia, mediante la cual los triglicéridos, que se encuentran en los adipocitos son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol con la finalidad de cubrir las necesidades energéticas del organismo, lo que a su vez conduce en la disminución de la cantidad de grasa acumulada en el tejido adiposo (Cedikova et al., 2016). Las dos enzimas

principales que participan en este proceso son la lipasa adipocítica para triglicéridos (ATGL) y la lipasa sensible a hormonas (HSL), las cuales son codificadas por los genes PNPLA2 y LIPE, respectivamente. La enzima ATGL, es responsable del primer paso en la hidrolisis de triglicéridos a diglicéridos y ácidos grasos libres, para posteriormente hidrolizarse mediante la actividad de la HSL (Ogasawara et al., 2015).

Las células tratadas con kaempferol aumentan de manera significativa la expresión génica de PNPLA2 y LIPE; además la naringenina muestra de igual manera un aumento estadísticamente significativo en la expresión de PNPLA2 (Figura 24)

Por otro lado, la enzima sintetizadora de ácidos grasos (FAS), es una de las enzimas clave en el proceso de lipogénesis ya que cataliza la síntesis de palmitato a partir de acetil y malonil- CoA en presencia de NADPH. Para nuestro estudio, pudimos observar que ninguno de los tratamientos mostró efecto significativo sobre la expresión génica de FASN (Figura 24).

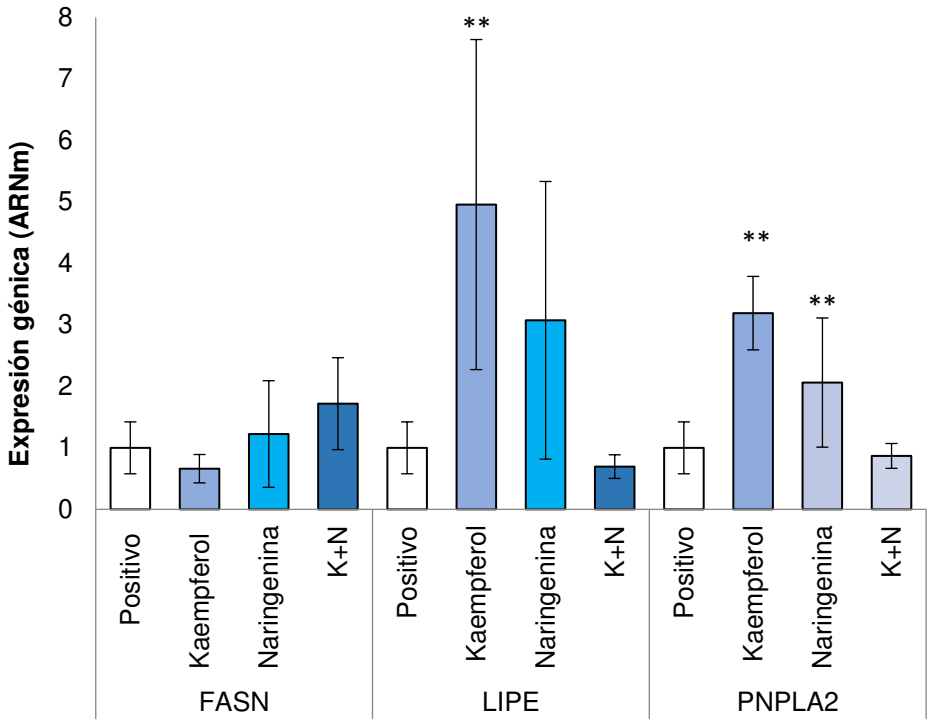


Figura 24. Expresión génica de FASN, LIPE y PNPLA2 en células 3T3-L1 tratadas con naringenina y kaempferol durante el proceso de diferenciación.

*El nivel de expresión se calculó mediante cuantificación relativa con respecto al control positivo. Los resultados se expresan como Fold change y los datos corresponden a la media ± DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y prueba de Dunnett para analizar las diferencias entre los tratamientos y el control positivo (normalizado a 1) (n = 6/grupo). (** $p < 0.01$).*

10.3.3 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la expresión de NF-κB

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB), regula la transcripción de una gran variedad de genes, en particular aquellos involucrados en la respuesta inmune como TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-8.

En el presente estudio, se determinó la expresión génica de NF-κB, con la finalidad de evaluar el potencial antiinflamatorio de la naringenina y el kaempferol en las células 3T3-L1.

Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de NF-κB en las células tratadas con naringenina. Así mismo, el kaempferol y la

combinación del kaempferol y naringenina aumentaron la expresión de NF-κB, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo (Figura 25).

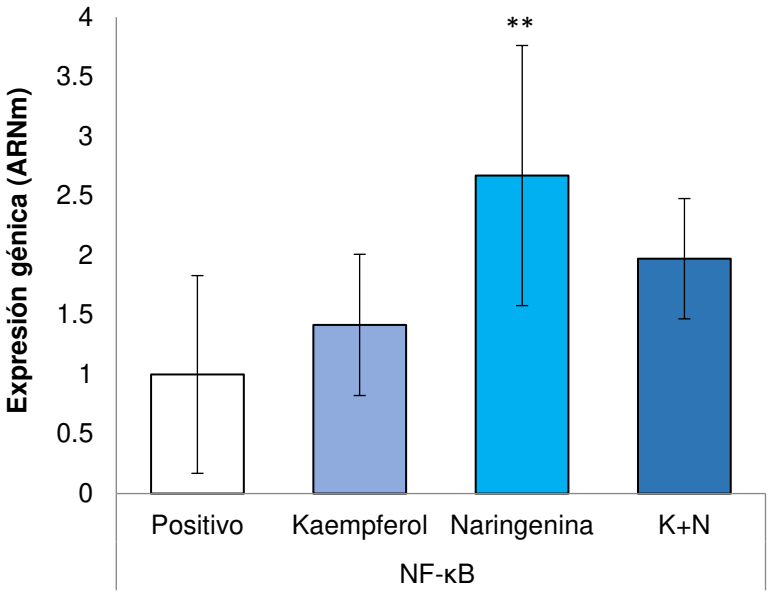


Figura 25. Expresión génica de NF-κB en células 3T3-L1 tratadas con naringenina y kaempferol durante el proceso de diferenciación.

*El nivel de expresión se calculó mediante cuantificación relativa con respecto al control positivo. Los resultados se expresan como Fold change y los datos corresponden a la media ± DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y prueba de Dunnett para analizar las diferencias entre los tratamientos y el control positivo (normalizado a 1) (n = 6/grupo). (** p < 0.01).*

XI. DISCUSIÓN

Actualmente la Organización Mundial de la Salud, reconoce a la obesidad como uno de los grandes retos de salud pública al estar estrechamente vinculada al desarrollo de diversas enfermedades metabólicas como diabetes mellitus, hipertensión arterial, aterosclerosis y dislipidemias (E. González, 2012).

La obesidad es definida como un acúmulo excesivo de grasa corporal en el tejido adiposo, que emana del desequilibrio energético debido a una ingesta calórica excesiva en relación al gasto energético (Wang et al., 2014). Además, es considerada una enfermedad multifactorial y multigénica, lo que la convierte en una patología compleja difícil de abordar y tratar (Serra-majem et al., 2013).

Esta situación emergente desde hace décadas ha abierto el campo a diversas líneas de investigación con el objetivo de identificar soluciones que frenen esta creciente epidemia mundial. Recientemente, los compuestos bioactivos presentes en los alimentos, particularmente los flavonoides han sido objeto de estudio por sus diferentes efectos benéficos para la salud. Estudios epidemiológicos han evidenciado una relación positiva entre la ingesta de alimentos ricos en flavonoides y un menor riesgo a desarrollar enfermedades crónico degenerativas, incluyendo la obesidad (Meydani & Hasan, 2010; Calderón-Montaño et al., 2011).

Investigaciones *in vitro* e *in vivo* han elucidado los posibles mecanismos por los cuales los flavonoides ejercen efectos antiobesidad; entre los que destaca la reducción de la absorción intestinal de lípidos, aumento del gasto energético, supresión del apetito e incremento del metabolismo lipídico (De La Garza et al., 2015; De La Garza, 2014; Moseti, Regassa, & Kim, 2016).

Sin embargo, el incremento en el tejido adiposo característico de la obesidad involucra principalmente dos procesos metabólicos y celulares; un incremento en la cantidad de lípidos acumulados al interior de los adipocitos y la formación de nuevas células adiposas (adipogénesis). Por lo tanto, un compuesto

de origen natural capaz de interferir en estos dos mecanismos, podría mejorar los enfoques preventivos y terapéuticos de la obesidad (Heber, 2010).

Numerosos estudios sobre los procesos de adipogénesis y el metabolismo lipídico, se llevan a cabo sobre la línea celular 3T3-L1, al ser considerado un modelo *in vitro* óptimo y ampliamente utilizado para el estudio de la diferenciación celular de los adipocitos.

Un aspecto importante a considerar es la estructura química en la que los flavonoides ejercen sus efectos a nivel del tejido adiposo.

Particularmente, el kaempferol y la naringenina se encuentran en los alimentos mayoritariamente glucosilados unidos a azúcares como glucosa, ramnosa, galactosa y rutinosa, sin embargo también pueden estar en forma libre como agliconas (Calderón-Montaño et al., 2011). Su absorción inicia en el intestino delgado en donde las agliconas pasan mediante difusión pasiva por las células epiteliales; en cambio una porción de los flavonoides que se encuentran en forma de glucósidos son sometidos a hidrolisis por la enzima lactasa floridizin hidrolasa (LPH) presente en el intestino delgado para que puedan ser absorbidos en forma de agliconas, otra porción son transportados al interior de las células epiteliales mediante el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1), por último una pequeña porción de compuestos que no son absorbidos en el intestino delgado llegan al colon, donde son hidrolizados de glucósidos a agliconas por la microflora del mismo (Hollman, 2004). Las agliconas absorbidas en el intestino delgado y colon, son transportados en plasma a los distintos tejidos y órganos, donde ejercen los diversos efectos benéficos descritos con anterioridad.

Por lo anterior, los datos científicos generados a partir de estudios *in vitro*, utilizan flavonoides en forma de agliconas libres. En ese sentido, debido a que el presente estudio busca elucidar los efectos antiobesidad de los flavonoides naringenina y kaempferol en la línea celular 3T3-L1, dichos flavonoides fueron utilizados en su forma aglicona.

11.1 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inhibición de la adipogénesis

La diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos maduros (adipogénesis) es un hecho muy ligado al desarrollo de la obesidad. Numerosas investigaciones se han enfocado en el efecto de extractos naturales o compuestos bioactivos aislados que interfieran con este proceso y puedan ser utilizados en el tratamiento y prevención de la obesidad.

Son diversos los compuestos de origen vegetal que han demostrado inhibir la diferenciación de los adipocitos en la línea celular 3T3-L1. Por ejemplo, el galato de epigalocatequina (EGCG) es un compuesto bioactivo presente en el té verde reconocido por sus diferentes beneficios a la salud y actualmente promovido como auxiliar en el tratamiento de la obesidad debido a que posee diferentes efectos potenciales, como la inhibición de la adipogénesis, aumento de la lipolisis, termogénesis y β oxidación (Wang et al., 2014; Moseti et al., 2016). Por su parte, el resveratrol, es un compuesto estilbenoide, ampliamente estudiado por sus diferentes efectos antiobesidad promovidos por diversos mecanismos de acción, como la inhibición de la diferenciación adipocitaria, incremento de la apoptosis y disminución de la lipogénesis (Kang, Ha, Kim, & Kim, 2012; Hsu & Yen, 2006; Moseti, Regassa, & Kim, 2016). Otro ejemplo, es la orixolina, un flavonoide presente en el árbol *oroxylum indicum* originario de la India, tiene la capacidad de regular el ciclo celular de los adipocitos promoviendo la apoptosis y disminuyendo la adipogénesis (Singh & Kakkar, 2014).

Particularmente en el caso del kaempferol, investigaciones previas han demostrado su efecto anti-adipogénico en la línea celular 3T3-L1, sin embargo, dentro de las evidencias científicas anteriores, se han utilizado diferentes concentraciones del compuesto para el tratamiento de las células, dichas concentraciones varían desde 40 hasta 100 µM, además de diferentes tiempos de tratamiento que van desde 7 hasta 21 días (Lee et al., 2015; Yeon-Joo et al., 2015; Park et al., 2012).

Por tal motivo, se llevó a cabo la estandarización de las concentraciones a utilizar para el tratamiento de la línea celular en base a la DL50.

De modo que, la presente investigación llevada a cabo en la línea celular 3T3-L1, demuestra que el kaempferol a concentraciones de 60 µM posee un efecto antiadipogénico, atenuando la conversión de pre-adipocitos a adipocitos maduros. Además, se evaluó la expresión génica, con el objetivo de evidenciar los mecanismos moleculares implicados en dicho efecto, y se observó que el kaempferol disminuyó de manera significativa la expresión del gen C/EBPα, el cual codifica un importante factor de transcripción que interviene en la diferenciación de los adipocitos (Feng et al., 2016). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión génica para el gen PPAR-γ. Investigaciones previas señalan a PPAR-γ y C/EBPα como los principales factores reguladores de la adipogénesis debido a que tienen un papel de crucial importancia para la correcta expresión de la mayoría de los genes específicos del adipocito, por lo que las células con una expresión disminuida de cualquiera de los dos factores, tienen una capacidad de diferenciación limitada. En este sentido, uno de los mecanismos moleculares por los que el kaempferol puede estar implicado en la inhibición de la diferenciación adipocitaria puede ser por medio de la disminución de los niveles de ARNm del gen C/EBPα.

Así mismo, Lee y cols. (2015) encontraron que el tratamiento de la línea celular 3T3-L1 con 40 µM de kaempferol durante 7 días, inhibe la diferenciación celular y disminuye la expresión de los genes C/EBPα, PPAR-γ y SREBP-1c (Lee et al., 2015). Por su parte, Park y cols. (2012) analizaron el perfil de expresión génica de las células 3T3-L1 tratadas con 40 µM de kaempferol durante 10 días, haciendo uso de microarreglos y sus resultados refieren los efectos antiadipogénicos a la supresión en la expresión del gen PPAR-γ (Park et al., 2012). A pesar de que estos estudios muestran distintas condiciones en relación a concentración del compuesto y días de tratamiento, reportan un efecto sobre la

diferenciación de adipocitos en la misma línea celular, que puede ser debido a la modulación de genes clave implicados en el proceso de adipogénesis.

Por otro lado, en el caso de la naringenina, investigaciones llevadas a cabo previamente han investigado su efecto anti-adipogénico en la línea celular 3T3-L1, utilizando concentraciones que varían desde 50 hasta 100 µM, además de diferentes tiempos de tratamiento que van desde 7 hasta 21 días.

En el presente estudio, el tratamiento de la línea celular con 120 µM de naringenina durante 21 días, no mostró efecto en el porcentaje de acumulación lipídica de las células tratadas respecto al control positivo, así mismo, no se encontraron diferencias significativas expresión génica de PPAR-γ y C/EBPα.

Harmon & Harp, encontraron resultados semejantes en cuanto al efecto de la naringenina sobre la inhibición de la adipogénesis, en este estudio se trató a las células con 100 µM de naringenina a partir del día 3 (después de inducida la diferenciación) hasta el día 9 del ensayo y los autores no reportaron cambios en la acumulación de triglicéridos en las células tratadas respecto al control positivo, de igual manera no encontraron cambios en la expresión génica de PPAR-γ y STAT3 (Harmon & Harp, 2001).

Lo anterior difiere de lo reportado por Richard y cols. (2013), en donde encontraron que las células 3T3-L1 tratadas con 50 µg/mL (183 µM) de naringenina durante 7 días, mantienen morfología típica de fibroblasto, es decir; inhibe la diferenciación celular, además de encontrar disminuida la expresión de los genes PPAR-γ y STAT5A (Richard et al., 2013).

Las diferencias entre las investigaciones pueden ser atribuidas a diferentes factores, como las condiciones en las que se llevan a cabo cada uno de los ensayos, la concentración de naringenina utilizada, el tiempo de tratamiento, entre otros. Al respecto Eseberri y cols. (2015), señala que el efecto anti-adipogénico de la naringenina se puede observar únicamente en altas dosis de tratamiento (> 150 µM).

Particularmente para nuestro ensayo, podríamos decir que la concentración de naringenina utilizada indujo una disminución de la respuesta al tratamiento o que la constante exposición de las células originó la adaptación de las mismas, por lo que no generó ningún cambio evidente sobre el proceso de diferenciación. Sin embargo, para corroborar todo lo anterior se requiere de investigaciones futuras que profundicen en el tema.

Con la finalidad de encontrar un posible efecto sinérgico, basado en adición de la combinación de naringenina y kaempferol (60 y 30 µM respectivamente), se realizó un experimento para analizar los mecanismos implicados en el proceso de inhibición adipocitaria por medio de los flavonoides utilizados anteriormente.

Yang y cols (2008) investigaron el efecto de la combinación de resveratrol y quercetina sobre la adipogénesis en células 3T3-L1 y encontraron que el tratamiento con resveratrol y quercetina (25 µM para cada compuesto) suprimen de manera individual la acumulación lipídica en un 9%, sin embargo la combinación de los dos compuestos en la misma dosis disminuyen la acumulación lipídica en un 69%, dicho estudio concluye que el tratamiento con la combinación de ambos compuestos aumenta su potencial antiadipogénico (Yang et al., 2008).

Por el contrario, en nuestro estudio la combinación de naringenina y kaempferol aumentaron, aunque no de manera significativa, la diferenciación de los preadipocitos en un 18%. Este mecanismo antagónico de los compuestos pudo comprobarse al encontrar un aumento en la expresión del gen PPAR-γ.

Este resultado puede indicar que ambos flavonoides estuviesen compitiendo en el mecanismo de inhibición de la diferenciación de las células 3T3-L1 previamente encontrado de forma aislada.

Gao y cols (2013) estudiaron el efecto anti-diabético de la combinación de ascarbosa con extracto de té verde, polifenoles del té verde y EGCG aislado en un modelo *in vitro*. Los autores reportaron un efecto sinérgico sobre la inhibición

de la α-amilasa y α-glucosidasa a bajas concentraciones de los compuestos y un efecto antagonista cuando se emplearon altas dosis de tratamiento (cabe resaltar que los autores no reportan cuáles fueron las dosis empleadas), por lo que concluyen que el efecto de la combinación de ascarbosa con extracto de té verde, polifenoles del té verde y EGCG aislado requiere de futuras investigaciones en modelos animales con la finalidad de poner en evidencia las dosis de tratamiento que ejerzan con seguridad el efecto sinérgico deseado.

Particularmente para nuestro estudio, no es posible evidenciar un patrón que explique el comportamiento antagónico de la combinación de naringenina y kaempferol, debido a que no se emplearon diferentes dosis de tratamiento que nos permitan delimitar su acción; es decir, establecer a que dosis ejercen efectos anti-adipogénicos y a partir de que concentración se inicia el efecto antagónico. A manera de hipótesis, podemos sugerir que podrían formarse complejos intramoleculares entre ellos que atenúan su actividad anti-adipogénica en las condiciones empleadas para nuestro experimento.

Del mismo modo, aunque no se cuenta con estudios de modelos *in vivo* que utilicen la combinación exclusiva de naringenina y kaempferol, de la Garza y cols. (2013) utilizaron extractos de toronja y helicriso, los cuales poseen un abundante contenido de flavonoides, principalmente kaempferol y naringenina; y encontraron que la suplementación con dichos extractos reducen la ganancia de peso en un modelo de ratas Wistar inducidas a obesidad por medio de una dieta de cafetería (De La Garza et al., 2015). Un estudio similar se llevó a cabo por Karupiah & Ismail (2015) en donde en un modelo de ratas Sprague–Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa, se encontró que la suplementación con *Melastoma malabathricum*, previene la ganancia de peso inducida por la dieta (Karupiah & Ismail, 2015), siendo el kaempferol y la naringenina los principales compuestos bioactivos presentes en la planta (Arju, Amad, Hani, & Hmad, 2012). El efecto protector que ejerce frente a la dieta puede atribuirse a la presencia de dichos flavonoides.

Los resultados encontrados en nuestro estudio son difíciles de comparar a los efectos observados en modelos animales. Debido a que los ensayos *in vitro* en cultivos celulares son una herramienta útil en el estudio de los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares, ya que proporcionan información valiosa acerca de los mecanismos de acción de determinados compuestos. Sin embargo, en la extrapolación de los resultados a modelos *in vivo*, estos se ven modificados por el proceso de absorción y metabolismo de los flavonoides.

11.2 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre la inducción de la lipolisis

Como se ha descrito previamente, la acumulación de lípidos al interior de los adipocitos, es un mecanismo estrechamente vinculado con el desarrollo y progresión de la obesidad, razón por la cual la inducción de la hidrolisis de los triglicéridos acumulados en su interior (lipolisis) es un efecto prometedor que podría ser utilizado como tratamiento de dicha enfermedad.

En la presente investigación se encontró que el kaempferol, además de inhibir la diferenciación de las células 3T3-L1, reduce el contenido lipídico intracelular en adipocitos maduros mediante el aumento de la lipolisis. Este mecanismo fue corroborado tras el análisis de expresión génica, encontrando aumentados los niveles de ARNm de los genes PNPLA2 y LIPE, los cuales codifican las enzimas ATGL y HSL respectivamente, permitiendo con ello la disminución del contenido lipídico de las células mediante el estímulo de la lipolisis.

Efectos fisiológicos semejantes sobre la actividad de diferentes extractos o compuestos bioactivos aislados se han investigado previamente. Un ejemplo es la quercetina, un flavonoide que ha sido ampliamente estudiado por sus efectos antiobesidad. Según lo reportado por Eseberri y cols. (2015), el tratamiento con 10 µM de quercetina durante 24 hrs tiene la capacidad de reducir el contenido intracelular de triglicéridos en adipocitos maduros, mediante la disminución de la expresión de los genes FASN y LIPE, los cuales están ampliamente involucrados

en el metabolismo lipídico; sin embargo, en este estudio no se observaron cambios de expresión para el gen ATGL (Eseberri et al., 2015). En ese sentido, podemos referir que el efecto lipolítico de la quercetina posee un mecanismo molecular de acción distinto a lo encontrado en el presente estudio para el kaempferol.

Así mismo, Hsu y cols en el 2010 encontraron que el garcinol, un flavonoide aislado de la *Garcinia Indica*, reduce el contenido intracelular de triglicéridos disminuyendo la expresión de FASN e incrementando los niveles de expresión del gen ATGL en células 3T3-L1 (Hsu y col., 2012).

Por su parte, un estudio llevado a cabo por Park y cols. (2012) encontraron que las células 3T3-L1 tratadas con 40 µM de kaempferol, aumentaron la expresión de genes involucrados en la lipolisis, como el gen LSR (por sus siglas en inglés Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor), dichos resultados se asemejan a lo evidenciado en la presente investigación (Park et al., 2012).

Harmon & Harp, también reportan resultados semejantes a los nuestros en cuanto al efecto de la naringenina sobre la inducción de la lipolisis, en este estudio se trató a las células con 100 µM de naringenina a diferentes tiempos y los autores no reportaron efectos significativos sobre la acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros (Harmon & Harp, 2001).

En cuanto al efecto de la combinación de naringenina y kaempferol (60 y 30 µM respectivamente) sobre el metabolismo lipídico, se encontró una reducción de 14.77% en la acumulación lipídica respecto al control positivo, por su parte, de manera individual el kaempferol suprime la acumulación lipídica en un 38.86% y la naringenina en un 15.98%, es decir, el uso de la combinación de los dos flavonoides en las dosis y tiempos empleados en el presente estudio, no incrementa el efecto observado de manera individual.

Rayalam y cols (2007) investigaron el efecto de la combinación de 25 mmol/L de resveratrol y quercetina sobre el metabolismo lipídico en células 3T3-L1, sus resultados demuestran que ninguno de los dos compuestos posee la capacidad

individual de inducir lipolisis, sin embargo al ser utilizados en combinación este efecto se ve incrementado un 25.5 % (Rayalam et al., 2007)

Si bien los flavonoides kaempferol y naringenina no han sido estudiados de manera aislada sobre modelos animales, si se cuenta con estudios previos en dónde han sido utilizados diferentes extractos ricos en polifenoles principalmente naringenina y kaempferol. En ese sentido, según lo reportado por Antunes y cols (2016), el extracto de *Jacaranda decurrens* indujo la reducción de la masa corporal total y de los depósitos de tejido adiposo, además de disminuir los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en un modelo *in vivo* de ratas obesas alimentadas con dieta hipercalórica (Antunes et al., 2016).

11.3 Efecto de la naringenina y el kaempferol sobre marcadores de inflamación

Con el aumento del tejido adiposo característico en la obesidad se presentan alteraciones en la respuesta inmunitaria, debido al aumento en la síntesis de citoquinas pro inflamatorias. Cuando ocurre hiperplasia en las células adiposas, estas envían señales para promover la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo iniciando así, un proceso inflamatorio crónico de bajo grado (Lauterbach & Wunderlich, 2017).

Por lo tanto, extractos naturales o compuestos bioactivos específicos que sean capaces de disminuir el desarrollo de este estado inflamatorio, mediante la inhibición de las diferentes moléculas sintetizadas por los adipocitos, podría dar lugar al establecimiento de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad (García-Díaz, Ovalle-Marín, & Reyes-Farías, 2014).

En este sentido numerosos compuestos naturales han sido utilizados para combatir la inflamación ligada a obesidad. Por ejemplo, la curcumina es un compuesto polifenólico derivado de la cúrcuma, que posee efectos anti inflamatorios mediante la inhibición de la translocación de NF-κB hacia el núcleo, además de reducir la expresión génica de TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 en

adipocitos maduros (Gonzales & Orlando, 2010). El resveratrol, reduce los niveles de ARNm de COX-2, IL-1β e IL-6 inducidos por TNF-α, además de inhibir la activación de NF-κB en adipocitos (L. Kang, Heng, Yuan, Baolin, & Fang, 2010).

Investigaciones similares a la nuestra, muestran los efectos anti inflamatorios de la naringenina y el kaempferol sobre diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Según Hyoung Kim y cols (2015) el tratamiento con 50 y 100 µM de kaempferol inhibe la producción de óxido nítrico en la línea celular de macrófagos RAW264.7, además de disminuir la expresión de los genes COX-2, TNF-α, NF-κB y AP-1 (Kim et al., 2015). Otro estudio realizado por Yoshida y cols (2013) demuestra que la naringenina inhibe la expresión de TLR2, el cual es receptor que pertenece a la familia Toll (Toll-like receptor TLRs) implicados en la inflamación inducida por la obesidad en el tejido adiposo, además reprime la expresión de TNF-α y NF-κB en adipocitos y en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Yoshida et al., 2013).

Por lo tanto, según lo reportado en investigaciones previas, la naringenina y el kaempferol tienen la capacidad de disminuir el estado inflamatorio tanto en modelos animales como en cultivos celulares, por lo que los efectos esperados para nuestro estudio eran que dichos flavonoides disminuyeran la expresión de NF-*κ*B, al ser un regulador importante en el proceso inflamatorio. Sin embargo, nuestros resultados revelan que el tratamiento de la línea celular adipocitaria 3T3-L1 con naringenina, kaempferol y el grupo de N + K, aumentan la expresión de NF-κB.

Una de las posibles causas de los resultados obtenidos en la presente investigación pueden ser esclarecidos a través de lo reportado en investigaciones previas, en donde se demuestra que la familia de los receptores de peroxisoma activados por proliferadores (PPARs) pueden ejercer efectos antiinflamatorios en varios tipos celulares, como las células del músculo liso, células endoteliales y macrófagos (Ds & Ck, 2007). Entre dichos efectos antiinflamatorios cabe resaltar la capacidad que poseen de interferir en la señalización de NF-κB mediante

diferentes mecanismos de acción como la inhibición de la degradación de IκBα, reducción de la translación nuclear de RelA/p50 y disminución de la unión de RelA/p50 al ADN (Figura 26) (Yao, Zhang, & Chen, 2017).

Particularmente la activación de PPAR-γ disminuye los niveles de transcripción del gen NF-κB en la línea celular C2C12 (células del musculo esquelético) (Remels et al., 2009).

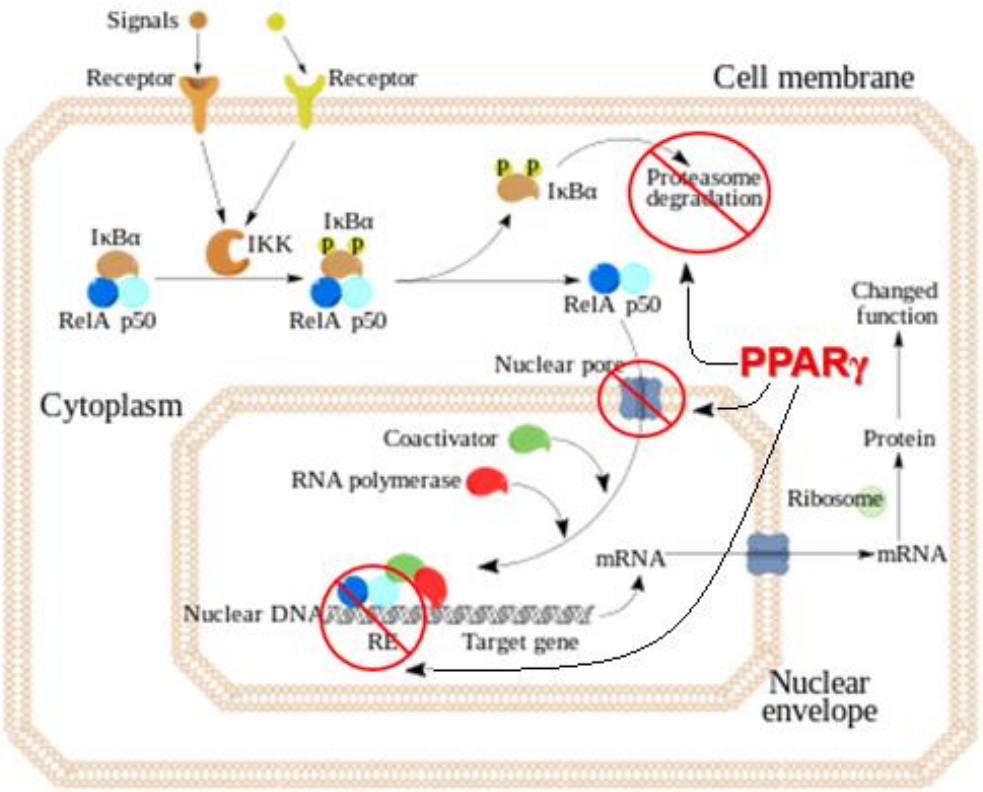


Figura 26. Mecanismos moleculares implicados en el efecto antiinflamatorio de PPAR-γ a nivel de proteosoma, poro nuclear y elementos de respuesta.

Dicho lo anterior pudiéramos decir que un posible mecanismo de acción que contribuye en el aumento de la expresión de NF-κB es la disminución en la expresión de PPAR-γ en las células tratadas con kaempferol y naringenina.

11.4 Futuras directrices

Los resultados obtenidos a partir de este proyecto constituyen el punto de partida a investigaciones futuras con el objetivo de desarrollar un ingrediente funcional cuya finalidad esté encaminada en la prevención y/o tratamiento de la obesidad mediante un abordaje basado en la nutrigenómica. Este proyecto de investigación brinda las pautas para el correcto entendimiento de la adipogénesis y el metabolismo lipídico. Sin embargo, se requiere considerar varios aspectos para futuros estudios, como continuar con la línea de investigación sobre modelos animales, con la finalidad de validar el efecto antiobesidad observado principalmente en las células tratadas con kaempferol. Además, sería necesario realizar estudios acerca de la biodisponibilidad de los flavonoides y determinar las concentraciones óptimas requeridas para que finalmente en un organismo humano logre su actividad funcional.

XII. CONCLUSIONES

1. El kaempferol (60 µM) inhibe la diferenciación adipocitaria y disminuye la expresión génica de C/EBPα en células 3T3-L1.

2. La combinación de flavonoides naringenina (60 µM) y kaempferol (30 µM) aumenta la expresión génica de PPAR-γ.

3. El kaempferol (60 µM) reduce el contenido lipídico intracelular en adipocitos maduros y aumenta la expresión de los genes LIPE y PNPLA2, lo que demuestra una posible capacidad inductora de lipolisis.

4. La naringenina (120 µM) reduce el contenido lipídico intracelular en adipocitos maduros y aumenta la expresión de PNPLA2, lo que demuestra una posible capacidad inductora de lipolisis.

Conclusión general:

Los flavonoides kaempferol y naringenina demostraron potencial efecto anti-obesidad mediante diferentes mecanismos de acción en un modelo celular. Por esta razón son candidatos para su posterior investigación en modelos animales de obesidad.

XIII. REFERENCIAS

Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *J Food Sci Technol*, *52*(5), 2522–2529. http://doi.org/10.1007/s13197-014-1396-5

Alam, A., Subhan, N., Rahman, M., Uddin, S., Reza, H., & Sarker, S. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, *5*(4), 404–17. http://doi.org/10.3945/an.113.005603

Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(5), 621–638.

Antunes, K. A., Baldivia, S., Casagrande, J. C., Janet, E., Argandoña, S., Vieira, C., … Souza, K. D. P. (2016). Antiobesity Effects of Hydroethanolic Extract of Jacaranda decurrens Leaves. *Hindawi Publishing Corporation*, *2016*, 1–8. http://doi.org/10.1155/2016/4353604

Arju, N. S., Amad, A. A. B. D. S., Hani, M. A. B. D. G., & Hmad, F. A. (2012). Detection and Quantification of Naringenin and Kaempferol in Melastoma decemfidum Extracts by GC – FID and GC – MS. *Acta Chromatographica*, *24*(2), 221–228. http://doi.org/10.1556/AChrom.24.2012.2.5

Atkinson, R. L. (2005). Etiologies of Obesity. *Nutrition and Health*, (3), 105–118.

Badimon, L., Oñate, B., & Vilahur, G. (2015). Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isqueémica coronaria. *Rev Esp Cardiol*, *68*(7), 599–611.

Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., & Rivera-Dommarco, J. A. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos

mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Publica de Mexico*, *55*(SUPPL.2), 151–160.

Baudrand, R., Arteaga, E., & Moreno, M. (2010). El tejido graso como modulador endocrino: Cambios hormonales asociados a la obesidad. *Revista Medica de Chile*, *138*(10), 1294–1301. http://doi.org/10.4067/S0034-98872010001100015

Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez, J., López-Roa, R., Alarcón-Aguilar, F., García-Macedo, R., & Cruz, M. (2010). Obesity as an inflammatory process. *Boletin Medico Del Hospital Infantil de México*, *67*, 03–12. Retrieved from http://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2010/hi102b.pdf

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim, P. M., & Noordaa, Van Der, J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Clinical Microbiology*, *28*(3), 495–503.

Bou, M., Montfort, J., Cam, A. Le, Rallière, C., Lebret, V., Gabillard, J., … Navarro, I. (2017). Gene expression profile during proliferation and differentiation of rainbow trout adipocyte precursor cells. *BMC Genomics*, *18*(347), 1–20. http://doi.org/10.1186/s12864-017-3728-0

Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, *25*(2), 169–193. http://doi.org/JME00927 [pii]

Calderón-Montaño, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *11*(4), 298–344. http://doi.org/10.2174/138955711795305335

Calva, A. P., González, I. Á., & Eduardo Madrigal Bujaidar, E. E. (2011). Revisión de los principales genes involucrados en el desarrollo de la obesidad. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *42*(4), 26–38.

Cedikova, M., Kripnerová, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., … Kuncova, J. (2016). Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells International*, *2016*, 1–11. http://doi.org/10.1155/2016/6067349

Chalé, F., Ancona, D., & Campos, M. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutricion Hospitalaria*, *29*(1), 10–20. http://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990

Chatzigeorgiou, A., Kandaraki, E., Ag, P., & Koutsilieris, M. (2014). Peripheral targets in obesity treatment: a comprehensive update . *Obes Rev*, *15*(6), 487–503. http://doi.org/10.1111/obr.12163.

Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J., & Vidal, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab*, *20*(1), 16–24. http://doi.org/10.1016/j.tem.2008.09.002.Adipogenesis

Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminiscence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, *160*, 81–88.

Crowell, M. D., Decker, G. A., Levy, R., Jeffrey, R., & Talley, N. J. (2006). Gut-brain neuropeptides in the regulation of ingestive behaviors and obesity: CME. *American Journal of Gastroenterology*, *101*(12), 2848–2856. http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00832.x

Dave, S., Kaur, N. J., Nanduri, R., Dkhar, H. K., Kumar, A., & Gupta, P. (2012). Inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis by stem bromelain in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS ONE*, *7*(1), 1 – 12. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030831

De La Garza, A. L. (2014). *Anti-obesity and anti-diabetic properties of two natural extracts rich in flavonoids (Helichrysum and Grapefruit): Physiological and molecular mechanisms*.

De La Garza, A. L., Etxeberria, U., Haslberger, A., Aumueller, E., Martıínez, A., & Milagro, F. (2015). Helichrysum and Grapefruit Extracts Boost Weight Loss AU1c in Overweight Rats Reducing Inflammation. *Journal of Medicinal Food*, *0*(0), 1–9. http://doi.org/10.1089/jmf.2014.0088

De la Iglesia, R., Loria-Kohen, V., Zulet, M. A., Martinez, J. A., Reglero, G., & Molina, A. R. De. (2016). Dietary Strategies Implicated in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, *2016*(17), 1–21. http://doi.org/10.3390/ijms17111877

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases 1. *Therapeutics*, *18*(14), 1818– 1892. http://doi.org/10.1089/ars.2012.4581

Domínguez, V., Huitrón, G., & Mendoza, A. (2012). La reacción inflamatoria en la fisiopatogenia de la obesidad. *Ciencia Ergo Sum*, *19*(1), 75– 82.

Ds, S., & Ck, G. (2007). Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms . *Trends Immunol*, *28*(12), 2007.

Eseberri, I., Miranda, J., Lasa, A., Churruca, I., & Portillo, M. P. (2015). Doses of Quercetin in the Range of Serum Concentrations Exert Delipidating Effects in 3T3-L1 Preadipocytes by Acting on Different Stages of Adipogenesis , but Not in Mature Adipocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 11. http://doi.org/10.1155/2015/480943

Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*, *4*(4), 263–273. http://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001

Feng, S., Reuss, L., & Wang, Y. (2016). Potential of Natural Products in the Inhibition of Adipogenesis through Regulation of PPAR γ Expression and / or Its Transcriptional Activity. *Molecules*, *21*, 2–19. http://doi.org/10.3390/molecules21101278

Ferrante, A. W. (2007). Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. *Journal of Internal Medicine*, *262*(4), 408–414. http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01852.x

Gadkar, V. J., & Filion, M. (2008). New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr. Issues Mol. Biol.*, *16*, 1–6.

Gao, J., Xu, P., Wang, Y., Wang, Y., & Hochstetter, D. (2013). Combined Effects of Green Tea Extracts, Green Tea Polyphenols or Epigallocatechin Gallate with Acarbose on Inhibition against α-Amylase and α-Glucosidase in Vitro. *Molecules*, *2013*(18), 11614–11623. http://doi.org/10.3390/molecules180911614

García-Díaz, D. F., Ovalle-Marín, M., & Reyes-Farías, A. (2014). Compuestos bioactivos e inflamación ligada a obesidad. *Rev. Chil. Endocrinol. Diabetes*, *7*(1), 21–24.

Gonzales, A. M., & Orlando, R. A. (2010). Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, *5*(17), 1–13. http://doi.org/10.1186/1743-7075-5-17

González Castejón, M. (2013). *Efecto de extractos de taraxacum officinale sobre la adipogénesis y el metabolismo lipídico de células 3T3-L1*.

González, E. (2012). Obesidad : Análisis etiopatogénico y fisiopatológico. *Endocrinol Nutr*, *60*(1), 17–24.

González, M., Ambrosio, K., & Sánchez, S. (2006). Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético. *Medigraphic Artemesia*, *8*(3), 191–200. Retrieved from http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14280309

González-Jiménez, E., & Schmidt Río-Valle, J. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutricion Hospitalaria*, *27*(6), 1850–1859.

http://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6099

Green, H., & Kehinde, O. (1975). An establiseh preadipose cell line and it's differentation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, *5*(1), 19–27.

Green, H., & Kehinde, O. (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*, *7*(1), 1976.

Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, *78*(3), 783–809. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674695

Guo, L., Li, X., & Tang, Q. (2015). Transcriptional Regulation of Adipocyte Differentiation : A Central Role for CCAAT/ Enhancer-binding Protein (C/EBP). *Journal of Biological Chemistry*, *290*(2), 755–761. http://doi.org/10.1074/jbc.R114.619957

Guzmán, R., Del castillo, A., & García, M. (2010). Factores psicosociales asociados al paciente con obesidad. *Obesidad Un Enfoque Multidisciplinario*, 201–218. Retrieved from www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/4823/libro_de_obesidad.pdf

Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-κB activation along with their inhibitory effect on i. *Hindawi Publishing Corporation*, *2007*, 1–10. http://doi.org/10.1155/2007/45673

Harmon, A. W., & Harp, J. B. (2001). Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol*, *807*, 807–813.

Heber, D. (2010). An integrative view of obesity. *The American Journal of*

Clinical Nutrition, *91*, 280–283. http://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28473B.280S

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology*, *11*(9), 1026–1030.

Hinney, A., Vogel, C. I. G., & Hebebrand, J. (2010). From monogenic to polygenic obesity: Recent advances. *European Child and Adolescent Psychiatry*, *19*(3), 297–310. http://doi.org/10.1007/s00787-010-0096-6

Hollman, P. (2004). Absorption , Bioavailability , and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, *42*, 74–83.

Hsu, C., & Yen, G. (2006). Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol. Nutr. Food Res*, *2006*(50), 1072–1079. http://doi.org/10.1002/mnfr.200600040

Hu, Y. J., Belaghzal, H., Hsiao, W. Y., Qi, J., Bradner, J. E., Guertin, D. A., … Imbalzano, A. N. (2015). Transcriptional and post-transcriptional control of adipocyte differentiation by Jumonji domain-containing protein 6. *Nucleic Acids Research*, *43*(16), 7790–7804. http://doi.org/10.1093/nar/gkv645

Hutley, L., Shurety, W., Newell, F., McGeary, R., Pelton, N., Grant, J., … Prins, J. (2004). Fibroblast Growth Factor 1. *Diabetes*, *53*(12), 3097–3106. http://doi.org/10.2337/diabetes.53.12.3097

Jung, U. J., & Myung-Sook, C. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 6184–223. http://doi.org/10.3390/ijms15046184

Kang, L., Heng, W., Yuan, A., Baolin, L., & Fang, H. (2010). Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in

adipocytes : Relative to inhibition of inflammatory responses . *Biochimie*, *7*(92), 789–96.

Kang, N. E., Ha, A. W., Kim, J. Y., & Kim, W. K. (2012). Resveratrol inhibits the protein expression of transcription factors related adipocyte differentiation and the activity of matrix metalloproteinase in mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes. *Nutrition Research and Practice*, *6*(6), 499–504.

Karupiah, S., & Ismail, Z. (2015). Anti-Obesity Effects of Melastoma malabathricum var Alba Linn in Rats Fed with a High-Fat Diet. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, *16*(3), 548–553. http://doi.org/10.1208/s12249-014-0245-1

Kim, S. H., Park, J. G., Lee, J., Yang, W. S., Park, G. W., Kim, H. G., … Cho, J. Y. (2015). The dietary flavonoid kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the src, syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. *Hindawi Publishing Corporation*, *2015*, 1–15. http://doi.org/10.1155/2015/904142

Kowalska, K. (2011). Natural compounds involved in adipose tissue mass control in in vitro studies. *Postepy Hig Med Dosw*, *2011*(65), 515–523.

Kozłowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids- Food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, *65*(2), 79–85. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272572

Krzysztoszek, J., Wierzejska, E., & Zielinska, A. (2015). Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. *Archives of Medical Science*, *11*(1), 24–33. http://doi.org/10.5114/aoms.2013.37343

Lafontan, M. (2012). Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, *2012*(302), 327 – 359. http://doi.org/10.1152/ajpcell.00168.2011

Lauterbach, M., & Wunderlich, T. (2017). Macrophage function in obesity-

induced inflammation and insulin resistance. *Eur J Physiol*, (469), 385–396. http://doi.org/10.1007/s00424-017-1955-5

Lee, B., Kwon, M., Choi, J. S., Oh Jeong, H., Hae Young, C., & Hyeung-Rak, K. (2015). Kaempferol Isolated from Nelumbo nucifera Inhibits Lipid Accumulation and Increases Fatty Acid Oxidation Signaling in Adipocytes. *Journal of Medicinal Food*, *18*(12), 1363–1370. http://doi.org/10.1089/jmf.2015.3457

Lee, C.-H., Olson, P., & Evans, R. M. (2003). Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology*, *144*(6), 2201–2207. http://doi.org/10.1210/en.2003-0288

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCt Method. *Methods*, *408*, 402–408. http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lomakina, G. Y., Modestova, Y. A., & Ugarova, N. N. (2015). Bioluminescence Assay for Cell Viability. *Biochemistry*, *80*(6), 701–713.

Manzur, F., Alvear, C., & Alayón, A. (2010). Adipocitos , obesidad visceral , inflamación y enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*, *17*(5), 207–213.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2003). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, *17*(6), 271–278.

Martínez-López, E., García-García, M., Campos-Pérez, W., & González-Becerra, K. (2013). Genómica nutricional: Conceptos y expectativas. *Revista de Endocrinología Y Nutrición*, *21*(1), 22–34.

Mayorga, M. (2009). Adipose tissue as an endocrine organ. Pathophysiological and therapeutic implications. *Revista Med*, *15*(2), 225–242.

McElroy, W. D. (1947). The energy source for bioluminescence in an isolated

system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *33*(11), 342. http://doi.org/10.1073/pnas.33.11.342

Meydani, M., & Hasan, S. T. (2010). Dietary Polyphenols and Obesity. *Nutrients*, *2*, 737–751. http://doi.org/10.3390/nu2070737

Miettinen, S., Sarkanen, J. R., & Ashammakhi, N. (2008). Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. In *Topics in Tissue Engineering* (Vol. 4, pp. 1–26).

Moehlecke, M., Canani, L. H., Oliveira, L., Silva, J., Roberto, M., Trindade, M., … Leitão, C. B. (2016). Determinants of body weight regulation in humans. *Arch Endocrinol Metab.*, *60*(2), 152–162. http://doi.org/10.1590/2359-3997000000129

Moreno, M. J., & Martínez, J. A. (2002). El tejido adiposo: Órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, *25*(SUPPL. 1), 29–39.

Moseti, D., Regassa, A., & Kim, W. (2016). Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(124), 1–24. http://doi.org/10.3390/ijms17010124

Mueller, E. (2014). Understanding the variegation of fat: Novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1842*(3), 352–357. http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.031

Ogasawara, J., Izawa, T., Sakurai, T., Sakurai, T., Shirato, K., Ishibashi, Y., … Kizaki, T. (2015). The Molecular Mechanism Underlying Continuous Exercise Training-Induced Adaptive Changes of Lipolysis in White Adipose Cells. *Journal of Obesity*, *2015*, 1–10. http://doi.org/10.1155/2015/473430

Otto, T. C., & Lane, M. D. (2005). Adipose development: from stem cell to

adipocyte. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(4), 229–242. http://doi.org/10.1080/10409230591008189

Palmisciano Bede, T., Pascoal, A. C., Hauaji Faco, L., de Salvo Castro, E., Mattoso, V., Furtado Dias, J., & Blondet de Azeredo, V. (2015). Effect of the intake of liquids rich in polyphenols on blood pressure and fat liver deposition in rats submitted to high-fat diet. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(6), 2539–2545. http://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8655

Palomer, X., Pérez, A., & Blanco-Vaca, F. (2005). Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Medicina Clínica*, *124*(10), 388–395. http://doi.org/10.1157/13072576

Pan, S.-Y., Zhou, S.-F., Gao, S.-H., Yu, Z.-L., Zhang, S.-F., Tang, M., … Ko, K.-M. (2013). New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1–25.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270–8. http://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498

Park, U., Jeong, J., Jang, J., Sung, M., Youn, H., Lee, S., … Um, S. (2012). Negative Regulation of Adipogenesis by Kaempferol , a Component of Rhizoma Polygonati falcatum in 3T3-L1 Cells. *Biol. Pharm. Bull*, *35*(9), 1525–1533.

Patel, K., Singh, G. K., & Patel, D. K. (2014). A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. http://doi.org/10.1007/s11655-014-1960-x

Patham, B., Mukherjee, D., & Zt, S. J. (2013). Contemporary review of drugs used to treat obesity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, *11*(4), 272–8.

Pavlidis, C., Patrinos, G. P., & Katsila, T. (2015). Nutrigenomics: A controversy.

Applied and Translational Genomics, *4*, 50–53. http://doi.org/10.1016/j.atg.2015.02.003

Peña Moreno, M. (2014). *Papel de la fosfolipasa A2 citosólica grupo IVA en la diferenciación adipocítica y en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta alta en grasa.*

Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Jacques, P. F., & Mccullough, M. L. (2015). Improving the estimation of flavonoid intake for study of health outcomes. *Emerging Science*, *73*(8), 553–576. http://doi.org/10.1093/nutrit/nuv008

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, *27*(1), 76–89. http://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418

Raimann, X. (2009). Obesity and obesity-associated complications. *Rev Med. Clin. Condes.*, *22*(1), 5. Retrieved from http://www.endocrinologia.org.mx/imagenes/archivos/obesidad y complicaciones.pdf

Ramirez-Zacarias, J. L., Castro-Muñozledo, F., & Kuri-Harcuch, W. (1992). Histochemistry. *Histochemistry*, *97*, 493–497.

Rayalam, S., Della-fera, M. A., Yang, J., Park, H. J., Ambati, S., & Baile, C. A. (2007). Resveratrol Potentiates Genistein's Antiadipogenic and Proapoptotic Effects. *The Journal of Nutrition*, *2*, 2668–2673.

Remels, A. H. V, Langen, R. C. J., Gosker, H. R., Russell, A. P., Spaapen, F., Voncken, J. W., … Schols, A. M. W. J. (2009). PPARγ inhibits NFkB dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *5*, 174–183. http://doi.org/10.1152/ajpendo.90632.2008.

Richard, A. J., Amini-Vaughan, Z., Ribnicky, D. M., & Stephens, J. M. (2013). Naringenin inhibits adipogenesis and reduces insulin sensitivity and

adiponectin expression in adipocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*. http://doi.org/10.1155/2013/549750

Rivera, G., Bocanegra, A., Acosta, R.-I., De la Garza, M., & Flores, G. (2007). Tratamiento de la obesidad; nuevas perspectivas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *38*(2), 48 – 56.

Rivera, J. Á. (2013). *Obesidad en México: recomendaciones para una política de Estado*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).

Rivera, L. (2009). *Efectos de polifenoles de la dieta en modelo experimental de síndrome metabólico de rata Zucker*. Universidad de Granada.

Rolls, B. (2014). The relationship between dietary energy density and energy intake. *Physiol Behav*, *97*(5), 609–615. http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.011.The

Rosado, E. L., Monteiro, J. B., Chaia, V., & Lago, M. F. (2006). Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona. *Nutrición Hospitalaria*, *21*(6), 686–693.

Rosen, E. D., & MacDougald, O. a. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(12), 885–96. http://doi.org/10.1038/nrm2066

Ruiz-Ojeda, F. J., Rupérez, A. I., Gomez-Llorente, C., Gil, A., & Aguilera, C. M. (2016). Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *2016*(17), 1–26. http://doi.org/10.3390/ijms17071040

Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L. A., & Hameed, S. (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Advances in Pharmacological Sciences*, *2015*, 1–10. http://doi.org/10.1155/2015/823539

San Román, B. (2011). *Búsqueda de extractos naturales para el tratamiento de la obesidad. PhD Proposal*. Universidad de Granada.

Sanhueza, J., & Valenzuela, A. (2012). Nutrigenomics: revealing molecular aspects. *Rev Chil Nutr*, *39*, 71–85.

Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., & Gastaldelli, A. (2015). The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis : A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*, *2015*(7), 9453–9474. http://doi.org/10.3390/nu7115475

Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*, 1–19.

SecretaríadeSalud. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016.

Serra-majem, L., Bautista-castaño, I., De, F., Ciberobn, N., Salud, I. De, Iii, C., & Madrid, I. (2013). Etiology of obesity: two “key issues” and other emerging factors. *Nutr Hosp*, *28*(5), 32–43.

Singh, J., & Kakkar, P. (2014). Phytomedicine Oroxylin A , a constituent of Oroxylum indicum inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 cells. *European Journal of Integrative Medicine*, *21*(12), 1733–1741. http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.014

Sook Sul, H. (2009). Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. *Mol Endocrinol*, *23*(11), 1717–1725. http://doi.org/10.1210/me.2009-0160

Strable, M., & Ntambi, J. (2011). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *45*(3), 199–214. http://doi.org/10.3109/10409231003667500.Genetic

Tamayo, D., & Restrepo, M. (2014). Aspectos psicológicos de la obesidad en adultos. *Revista de Psicología Universidad de Antioquia*, *6*(1), 91–112.

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, *2010*(2), 1231–1246. http://doi.org/10.3390/nu2121231

Vicente-Vicente, L., Prieto, M., & Morales, A. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Rev. Toxicol*, *30*, 171–181.

Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., … Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(1), 1–18. http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001

Yang, J. Y., Della-Fera, M. A., Rayalam, S., Ambati, S., Hartzell, D. L., Park, H. J., & Baile, C. A. (2008). Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sciences*, *82*(19-20), 1032–1039. http://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.03.003

Yao, F., Zhang, M., & Chen, L. (2017). Adipose Tissue-Specialized Immunologic Features Might Be the Potential Therapeutic Target of Prospective Medicines for Obesity. *Journal of Diabetes Research*, *2017*, 1–8. http://doi.org/10.1155/2017/4504612

Yeon-Joo, L., Hyeon-Son, C., Min-Jung, S., Hui-Jeon, J., Kui-Jin, K., & Boo-Yong, L. (2015). Kaempferol suppresses lipid accumulation by inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells and zebrafish. *Food Funct.*, *6*(8), 2824–2833. http://doi.org/10.1039/C5FO00481K

Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., & Kurokawa, M. (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J Nutr Biochem.*, *24*(7), 2013. http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.