

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“ACEITE DE LINAZA COMO FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS SOBRE EXPRESIÓN DEL GEN *PPAR α* Y
PERFIL LIPÍDICO EN RATAS OBESAS”**

Presentada por:

LIZBETH LESLIE HIDALGO TUFÍÑO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

LIMA-PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“ACEITE DE LINAZA COMO FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS SOBRE EXPRESIÓN DEL GEN *PPAR α* Y
PERFIL LIPÍDICO EN RATAS OBESAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

LIZBETH LESLIE HIDALGO TUFÍÑO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Víctor Hidalgo Lozano
PRESIDENTE

Dr.Sc. María Villanueva Espinoza
PATROCINADOR

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
CO-PATROCINADOR

Ph.D. Carlos Vílchez Perales
MIEMBRO

MSc.DSP Haydee Cárdenas de Jurado
MIEMBRO

DEDICATORIA

- A mi abuela y madre, por su apoyo incondicional.
- A mi hermana Lucero y a mi primo Daniel, por lo que representan para mí.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. María Elena Villanueva Espinoza por su apoyo durante todo este proceso.
- A mi jurado de tesis y profesores: V. Hidalgo, C. Vélchez, H. Cárdenas y G. Gutiérrez, por su disposición y apreciaciones hacia la investigación.
- A mis amigas Carmen Astuvilca y Meliza Villar, por su apoyo durante la investigación.
- Al señor Mauro Ayala, por estar siempre pendiente de todo lo que necesité durante la fase experimental en el bioterio de la UNALM.
- Al CONCYTEC-FONDECYT por la oportunidad de realizar la maestría y la colaboración en la investigación.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
	2.1 La obesidad.....	2
	2.2 Factores de transcripción	3
	2.3 Definición de Lípidos	5
	2.4 Los ácidos grasos y fuentes de AGPI n-3	5
	2.5 Regulación del metabolismo AGPI y receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPARs).....	7
	2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cuantificación del ARN	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
	3.1 Ubicación	11
	3.2 Animales y dietas.....	11
	3.3 Medidas morfológicas.....	13
	3.4 Perfil de lipídico sanguíneo	13
	3.5 Manejo de la eutanasia y extracción de tejidos.....	13
	3.6 Expresión del gen <i>PPARα</i> en el hígado	14
	3.7 Análisis estadístico	15
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
	4.1 Peso corporal y perfil lipídico sanguíneo de las ratas.....	17
	4.2 Perfil lipídico sanguíneo de las ratas	19
	4.3 Expresión relativa del gen <i>PPARα</i>	21
V.	CONCLUSIONES	25
VI.	RECOMENDACIONES	26
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
VIII.	ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición nutricional del alimento basal.....	12
Cuadro 2: Composición de ácidos grasos (%) de aceite de linaza	12
Cuadro 3: Iniciador utilizado en la PCR a tiempo real cuantitativa	15
Cuadro 4: Peso y perfil lipídico sanguíneo en ratas después 30 días	17
Cuadro 5: Consumo de alimento y peso en ratas después de 59 días.....	18
Cuadro 6: Perfil lipídico en ratas después de 59 días.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Expresión relativa del gen <i>PPARα</i> en ratas después de 59 días.....	21
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Informe de ensayo de aceite de linaza	40
Anexo 2. Extracción de ARN desde tejido.....	42
Anexo 3. Limpieza del ARN	44
Anexo 4. Retrotranscripción para síntesis de ADNc.....	45
Anexo 5. PCR en tiempo real	47

RESUMEN

El consumo de aceite de linaza que es fuente de ácidos grasos poliinsaturados n-3 se ha asociado con la mejora de perfil lipídico y expresión génica de factores de transcripción en modelos animales; sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la relación de ácidos grasos dietarios, receptores nucleares y regulación de expresión génica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el aceite de linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados sobre expresión del gen *PPAR α* y el perfil lipídico en ratas obesas. Se utilizaron 24 ratas machos Holtzman, los primeros 30 días las ratas fueron inducidas a obesidad con una dieta obesogénica, finalizada esta primera etapa, se midió el perfil lipídico e índice de Lee para la verificación de que se había alcanzado la obesidad. Luego las ratas se asignaron aleatoriamente a los tratamientos, que consistieron en una dieta control obesogénica y la dieta obesogénica suplementada con aceite de linaza, finalizada esta segunda etapa (59 días), se midió el perfil lipídico y los niveles de expresión relativa del gen *PPAR α* en el hígado de las ratas obesas. Se obtuvo un incremento en la concentración de c-HDL y una disminución de los niveles de triglicéridos en relación al control pero sin registrarse diferencias significativas entre tratamientos. De igual manera se incrementó la expresión del gen *PPAR α* en comparación con el control pero sin registrarse diferencia significativa entre tratamientos. Se concluye que la suplementación con aceite de linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados a ratas inducidas a obesidad, tuvo una tendencia a incrementar los niveles de expresión relativa del gen *PPAR α* , así como mejorar el perfil lipídico, aumentando la concentración de c-HDL y disminuyendo la concentración de triglicéridos.

Palabras clave: aceite de linaza, *PPAR α* .

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the flaxseed oil as the source of the polyunsaturated fatty acids on the expression of the *PPAR α* gene and the lipid profile in obese rats. Twenty four male Holtzman rats were used. The first 30 days, rats were induced to obesity with an obesogenic diet. After this first stage, the lipid profile and the Lee index were measured to verify that rats were obese. On the second stage (59 days), rats were randomly assigned to the treatments, which consisted of an obesogenic control diet and the obesogenic diet supplemented with flaxseed oil. After this second stage, the lipid profile and the relative expression levels of the *PPAR α* gene in the liver were measured in obese rats. There was an increase in the concentration of c-HDL, a decrease in triglyceride levels and an increase in the expression of the *PPAR α* gene in the rats fed the diet supplemented with flaxseed oil compared to the control but without significant differences between treatments.

Keywords: flaxseed oil, *PPAR α*

I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es un serio problema que atraviesa la sociedad actual en el Perú, el 57.9 por ciento de personas mayores de 15 años tienen sobrepeso de las cuales el 21 por ciento padece de obesidad y entre los niños menores de 5 años, el 7.9 por ciento tiene sobrepeso y el 1.6 por ciento padece de obesidad; siendo la obesidad un cuadro de inflamación crónica, los individuos son vulnerables a padecer diversas patologías derivadas como diabetes, hiperlipemia, problemas cardiacos entre otros. Ante este problema diversos estudios indican que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 (AGPI n-3), al ser precursores de compuestos antiinflamatorios provocan una mejora del perfil lipídico, que podrían incidir en reducción de la obesidad, además de modular la expresión génica de diversas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico. Los principales mecanismos de modulación del metabolismo lipídico son vía estimulación e inhibición de la transcripción del ADN por medio de la regulación de factores de transcripción como el receptor proliferador peroxisomial activado alfa ($PPAR\alpha$) involucrado en la expresión génica de enzimas lipolíticas. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la relación de ácidos grasos dietarios, receptores nucleares y regulación de expresión génica. El aceite de linaza contiene una mezcla de ácidos grasos y sobretodo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) como ácido alfa-linolénico (ALA) y ácido linoléico (AL), relacionados con efectos benéficos en la salud humana tales como protección contra las enfermedades cardiovasculares, reducción de colesterol en sangre, entre otros.

En base a los antecedentes señalados se planteó como objetivo evaluar el aceite de linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados sobre expresión del gen $PPAR\alpha$ y el perfil lipídico en ratas obesas. De esta manera se busca tener evidencias más claras de la acción de los ácidos grasos poliinsaturados en las vías de señalización y expresión genética en relación al metabolismo de ácidos grasos y revalorar el consumo de aceite de linaza como alimento funcional.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica prevalente en el mundo occidental, se caracteriza por un exceso de tejido adiposo que desencadena un aumento de peso corporal con respecto a lo que le correspondería según sexo, edad y talla. La obesidad es un serio problema que atraviesa la sociedad actual en el Perú, el 21 por ciento de personas mayores de 15 años padece de obesidad (INS/CENAN, 2017) y entre los niños menores de 5 años, el 1.6 por ciento padece de obesidad (INS/CENAN/DEVAN, 2017). La causa principal de la obesidad es la ingesta crónica de energía excesiva a partir de alimentos ricos en calorías acompañada de un menor gasto de energía (Simopoulos, 2016). La acumulación excesiva de tejido adiposo da como resultado una capacidad de almacenamiento insuficiente de tejido adiposo para lípidos, así como la atrofia del tejido, y, por lo tanto, daño lipotóxico e inflamación de bajo grado (Herrero et al., 2010). La evidencia emergente sugiere que los sistemas inmunes y metabólicos están interconectados cobrando fuerza el concepto de inmunometabolismo, para explicar los procesos a nivel de tejido adiposo, así como la función integradora del tejido adiposo en el control del estado inflamatorio sistémico y del metabolismo (Kohlgruber et al., 2016; Mathis, 2013; Mathis y Shoelson, 2011). La acumulación de lípidos en los adipocitos, inicia un estado de estrés celular y la activación de vías de señalización inflamatorias, lo que conduce a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias por los adipocitos, incluyendo al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), leptina, resistina y otros factores inductores del estado de inflamación crónica sistémica (Shoelson et al., 2006; Kuda et al., 2017). La inflamación también está estrechamente relacionada con la patogénesis de la aterosclerosis, lo que sugiere que la inflamación podría ser un denominador común que relaciona la obesidad con muchas de sus secuelas patológicas (Shoelson et al., 2006).

La obesidad puede provocar la aparición del síndrome metabólico y a su vez asociarse a trastornos crónicos como diabetes y enfermedad cardiovascular (Alberti et al., 2009; Morgen y Sorensen, 2014). El síndrome metabólico es un conjunto de condiciones

patológicas que incluyen presión arterial elevada, hiperglucemia, perímetro abdominal elevado, hipertrigliceridemia y niveles bajos de HDL (Perona, 2017). La inflamación del tejido adiposo de bajo grado, caracterizada por altos niveles de citoquinas proinflamatorias, ácidos grasos y macrófagos, podría resolverse mediante mediadores lipídicos derivados de ácidos grasos omega-3 como resolvinas y protectinas, que estimulan la resolución de la inflamación; así como los ácidos grasos esterificados a ácidos grasos hidroxilados (FAHFA) derivados de los ácidos grasos omega-3, que se ha informado que disminuyen la acumulación de macrófagos en tejido adiposo y la expresión de adipoquinas proinflamatorias, y promueven la repolarización de los macrófagos e inhiben la activación del inflamasoma NLRP3 en ratones obesos (Claria et al., 2012; Hellmann et al., 2011; Titos y Claria, 2013; Titos et al., 2011; Yan et al., 2013).

2.2 Factores de transcripción

Los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPARs) son factores transcripcionales que se expresan principalmente en el tejido muscular esquelético, el hígado y el tejido adiposo marrón y regulan los niveles de expresión de varios genes. Los PPARs están implicados en la regulación de la diferenciación celular, el desarrollo y el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos (Reynes et al., 2017; Rakhshandehroo et al., 2010).

Se han identificado 3 tipos de PPARs: PPAR α , PPAR δ y PPAR γ , los cuales todos ellos son regulados por ácidos grasos y sus derivados. PPAR α está localizado en los tejidos oxidativos como el hígado, músculo esquelético, músculo cardiaco y tejido adiposo marrón. PPAR δ está localizado en el tracto gastrointestinal, músculo esquelético y riñón y finalmente el PPAR γ es hallado principalmente en tejido adiposo marrón y blanco. Similar a otros receptores nucleares, los PPARs tienen una estructura conservada que incluye tres dominios funcionales, primer dominio de inhibición independiente del ligando de la transcripción del gen diana donde los PPARs se unen a los elementos de respuesta en ausencia de su ligando y reclutan complejos correpresores para la regulación transcripcional. Segundo dominio de activación dependiente de ligando de la transcripción del gen diana donde los PPARs se unen a los elementos de respuesta en presencia de su ligando y reclutan complejos coactivadores para la activación transcripcional. Tercer dominio de inhibición dependiente de ligando de factores de transcripción donde los PPARs pueden inhibir otros factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), por interacción directa o superando los complejos de coactivador que se requieren para su activación (Choi y Bothwell, 2012; Chan et al., 2010;

Zieleniak et al., 2008). Las mutaciones de aminoácidos individuales dentro de estos dominios funcionales producen defectos graves en la función de PPAR que afectan el metabolismo lipídico y la resistencia a la insulina (Agostini et al., 2006; Hegele et al., 2002). Los PPARs se unen a receptores nucleares como el receptor X-retinoide (RXR) y formando heterodímeros PPAR-RXR estimulan la expresión de un subconjunto de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos, diferenciación celular o proliferación celular (Evans et al., 2004). Según Nielsen et al. (2006) los PPARs tienen características distintas de transactivación y preferencia para distintos subconjuntos de genes diana. Se ha demostrado que la transactivación dependiente del ligando implica el reclutamiento de complejos de coactivador que participan en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción (McKenna y O'Malley, 2002). Asimismo Grygiel-Górniak (2014) indicó que PPAR α influye especialmente en el metabolismo de ácidos grasos y su activación reduce los niveles de lípidos mientras que PPAR γ participa esencialmente en la regulación de la adipogénesis, el equilibrio energético y la biosíntesis de lípidos. Cada uno de los PPARs activa o suprime diferentes genes con solapamiento parcial de su actividad. En el caso del PPAR α son los genes asociados a la β -oxidación (acil-coA, tiolasa), a proteína de transporte de ácidos grasos (FATP), a lipoproteínas lipasa y a apolipoproteína A-I y A-II. Por su parte el PPAR δ actúa sobre los genes involucrados en la absorción de lípidos, metabolismo y eflujo (represión por PPARs). Por último, PPAR γ actúa sobre los genes que están vinculados con la proteína de unión a ácidos grasos (AP2) y proteína de transporte de ácidos grasos (FATP).

Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) son miembros de la familia de factores de transcripción y regulan el metabolismo de lípidos y síntesis de colesterol a nivel de la expresión génica. A diferencia de otros miembros de la familia, SREBPs son sintetizados como precursores unidos al retículo endoplasmático y al envoltorio nuclear y son liberados de la membrana en el núcleo como proteínas maduras mediante proceso de escisión (Sekiya et al., 2003). Hasta la fecha, hay 3 isoformas de SREBPs, -1a, -1c, y -2 que se han identificado. SREBP-2 juega un rol importante en la regulación de la síntesis de colesterol, SREBP-1c controla la transcripción y expresión de enzimas lipogénicas tales como ácido graso sintasa (FAS) y esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1) (Shimano, 2001). Es destacado que SREBP-1c regula no solo la tasa sintética de triglicéridos sino también la cantidad de su almacenamiento en el hígado (Shimano et al., 1997; Yahagi et al., 2002). Por otro lado, Yahagi et al. (1999) y Mater et al. (1999) demostraron que los efectos supresores de AGPI en enzimas lipogénicas están mediados por su reducción de la

proteína SREBP-1 maduro en el hígado. Además, Yoshikawa et al. (2002) y Xu et al. (2001) indicaron que el mecanismo principal por el cual los AGPI suprimen SREBP-1 es presumiblemente por clivaje de la proteína precursora así como por la reducción tanto de la velocidad de transcripción como de la estabilidad del ARNm. Curiosamente, los AGPI disminuyen selectivamente la SREBP-1, sin afectar a la SREBP-2.

2.3 Definición de Lípidos

Los lípidos junto a las proteínas y carbohidratos, son macronutrientes en la nutrición humana y representan la principal fuente de energía para el organismo (Valenzuela et al., 2002). Además los lípidos son fundamentales en la formación de estructuras celulares como las membranas a partir de la síntesis de fosfolípidos; suministran ácidos grasos necesarios para la síntesis de eicosanoides e intervienen en la síntesis de otros derivados bioactivos como hormonas, y actúan como vehículo de vitaminas liposolubles (Tchoukalova et al., 2010). Definidos químicamente los lípidos son moléculas hidrófobas que pueden originarse completamente o parcialmente a través de condensaciones de tioésteres o de unidades de isopreno (Fahy et al., 2005).

Los lípidos son compuestos especiales en el régimen alimenticio, tanto para el abastecimiento de energía (beta-oxidación de ácidos grasos) así como para el suministro de ácidos grasos esenciales, como ALA (ácido alfa-linolénico, 18:3n-3) y LA (ácido linoléico, 18:2n-6) (Christie y Han, 2010). Tienen diversas actividades biológicas como la regulación de la estructura y función de la membrana, regulación de la producción de mediadores lipídicos bioactivos y regulación de las vías de señalización intracelular. A través de estas actividades los ácidos grasos influyen en el bienestar y riesgo de desarrollar enfermedades (Calder, 2015).

2.4 Los ácidos grasos y fuentes de AGPI n-3

Los ácidos grasos contienen una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo terminal y se clasifican de acuerdo al grado de saturación (Wang et al., 2013; Mennitti et al., 2015). Según la clasificación por grado de saturación son saturados (sin doble enlace) o insaturados (con al menos un doble enlace entre carbono-carbono) (Mennitti et al., 2015). Los ácidos grasos insaturados se dividen en dos subgrupos, monoinsaturados (con un doble enlace simple) y poliinsaturados (con 2 o más dobles enlaces). Dependiendo de la ubicación del primer doble enlace, los ácidos grasos poliinsaturados se clasifican como n-6 (omega-6) o n-3 (omega-3).

El tipo predominante de AGPI n-6 es ácido linoléico (LA) que tiene 18 carbonos y dos dobles enlaces. El tipo principal de AGPI n-3 es el ácido alfa-linolénico (ALA) que tiene 18 carbonos y tres enlaces dobles (Temple, 2018). Los ácidos LA y ALA son nutrientes esenciales y precursores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), que contienen 20 o más átomos de carbono de las series n-6 y n-3 (Calder y Grimble, 2002).

Los ácidos grasos omega-3 (n-3) son esenciales para el ser humano debido a que no podemos biosintetizar en el organismo, por lo que debe ser aportado a través de la dieta. El primer exponente de los ácidos grasos omega-3 es el ácido linoléico (ALA), que mediante un proceso enzimático se puede transformar en el ácido eicopentaenoico (EPA) y luego en el ácido docosahexaenoico (DHA) (Knoch et al., 2009). Los ácidos EPA y DHA pueden ser aportados por la dieta (preformados), hallándose en pescado, mariscos, algas o a partir de su precursor de origen vegetal. El ácido ALA tiene baja disponibilidad a partir de la dieta, siendo muy limitado su consumo en algunas poblaciones (Valenzuela et al., 2011).

Una amplia gama de productos vegetales contiene ácido linoléico (ALA), que incluye semillas, nueces, verduras, legumbres, cereales y frutas. Entre ellos, se sabe que varios tipos de aceites de semillas, como el aceite de linaza y el aceite de nuez, contiene el ácido ALA (Kuroe et al., 2016). La semilla de linaza contiene de 34.1 a 40.7 por ciento de grasas y 18.9 a 27.0 por ciento de proteínas (Colovic et al., 2016). Según Morris (2007) la semilla de linaza contiene un promedio de 41 por ciento de grasas, 20 por ciento de proteínas, 29 por ciento de carbohidratos totales, principalmente como fibra (28 por ciento) con algunos azúcares y almidones (1 por ciento), 7,7 por ciento de humedad y 3,4 por ciento de ceniza. Asimismo en otro estudio se reportó que la semilla de linaza contiene potasio entre un rango de 502 a 732 mg/100g, fitato 104 mg/100g, taninos 96 a 695 mg/100g, magnesio 277 a 339 mg/100g, azufre 170 a 200 mg/100g, hierro 6 a 10 mg/100g y zinc 4 a 5 mg/100g (Deme et al., 2017). Asimismo, Jiménez et al. (2013) analizaron la composición química de semillas de chía, linaza y rosa moqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3, encontrando que los aceites de las tres semillas analizadas se distinguieron por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, predominando la presencia de los ácidos grasos esenciales (linoléico y linolénico), pudiendo estos aceites ser utilizados como fuentes potenciales en ácidos grasos omega-3. En los aceites de semilla de chía y linaza se identificó primordialmente el ácido ALA con 51.8 por ciento y 55.3 por ciento respectivamente.

2.5 Regulación del metabolismo AGPI y receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPARs)

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y sus derivados metabólicos actúan como ligandos de receptores nucleares produciéndose una gran variedad de respuestas celulares. Los receptores actúan asociados a cofactores, los que pueden activar o reprimir la expresión del gen regulado por el receptor (Sanhueza y Valenzuela, 2006). La interacción del receptor PPAR-ligando se produce principalmente por interacciones cuya estabilidad está dada por fuerzas del tipo van der Waals (Xu et al., 1999). Por otro lado, Hernando y Mach (2015) indican que los AGPI tienen una capacidad para modificar la metilación de los promotores de genes adipogénicos y consecuentemente su expresión de manera reversible, lo que sugiere que las alteraciones epigenéticas pueden ser uno de los puntos más frágiles en el desarrollo de la obesidad, debido a que podemos inactivar o activar genes epigenéticamente empleando los nutrientes adecuados.

Se ha encontrado que el consumo de AGPI, en general, induce la activación de PPAR α y varios genes relacionados con la oxidación y la termogénesis de los lípidos, lo que resulta en un aumento de la tasa de oxidación de los ácidos grasos y un riesgo reducido de adipogénesis (Reynes et al., 2017; Reilly y Thompson, 2000). Por otro lado, los AGPI n-6 y n-3 inducen efectos diferentes sobre el metabolismo y deposición de las grasas; Se sugiere los AGPI n-6 promueven la deposición de grasa, mientras que los AGPI n-3 pueden inducir el efecto inverso (Mejia et al., 2014; Larter et al., 2008). Además, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 tienen características que permiten una unión óptima a los PPARs, que incluyen una cabeza polar (el grupo carboxilo) y una cola hidrófoba, y debido a que son altamente insaturados pueden oxidarse fácilmente al activar PPAR (Grygiel-Górniak, 2014). La unión de n-3 AGPI-CL activa el receptor farnesoide X (FXR), lo que reduce los niveles de triglicéridos al aumentar el aclaramiento hepático a través de la modulación de la actividad de la lipoproteína lipasa, la inducción de PPAR α y la inhibición de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c). De manera importante, la activación de gen *PPAR α* aumenta la oxidación de ácidos grasos, la actividad de la lipoproteína lipasa, el transporte de ácidos grasos y mejora la diferenciación de los adipocitos, todo lo cual contribuye a disminuir la concentración de triglicéridos (Saravanan et al., 2010). En los roedores, los AGPI dietéticos inducen la expresión de los genes diana de PPAR α en el hígado estimulando en consecuencia la β -oxidación de los ácidos grasos y

reducción de la concentración de triacilgliceroles (Sugden et al., 2002; Georiadi y Kersten, 2012; Singer et al., 2008; Castellanos y Rodríguez, 2015).

Los metabolitos bioactivos derivados de los AGPI n-3 como resolvinas, maresinas y ácidos grasos esterificados a ácidos grasos hidroxilados (FAHFA) (Chiang y Serhan, 2017; Claria et al., 2013; Galano et al., 2015; Kuda, 2017; Kuda et al., 2016), ejercen principalmente efectos antiinflamatorios. En consecuencia, los efectos beneficiosos de los AGPI n-3 en los trastornos metabólicos asociados a la obesidad podrían explicarse en gran medida por la mejoría de la inflamación de bajo grado en varios tejidos, incluidos el tejido adiposo blanco e hígado, mientras se normalizan sus propiedades metabólicas. Al mismo tiempo, el aumento de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 conduce a cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular afectando a la célula y a la función del tejido a través de alteraciones en las propiedades de las membranas, alterando la ruta de señalización de la célula y modificando la expresión génica (Calder, 2009; Adkins y Kelley, 2010; Dimri et al., 2010; Ghafoorunissa et al., 2005).

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cuantificación del ARN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis (Díaz et al., 2013) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Los elementos importantes en la reacción son el molde ADN o ADNc, la enzima, los oligonucleótidos iniciadores o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en las tres etapas principales de la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos donde se realiza la PCR son los termocicladores que están diseñados para mantener un sistema homogéneo de temperatura y tiempo para que no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para verificar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR llamados amplicones son analizados en geles de agarosa. Cabe mencionar que los *primers* son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Son dos secuencias diferentes de *primers* que se utilizan en PCR, una denominada *forward* o sentido y otra *reverse* o antisentido; ambas deben hibridar la cadena de ADN para que así puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección

5' → 3' (Tamay de Dios et al., 2013). La Taq polimerasa es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq) y lleva a cabo la replicación del ADN (Mas et al., 2001).

La PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real (*real time PCR*) tiene como objetivo detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el empleo de marcadores fluorescentes en la reacción (Tamay de Dios et al., 2013). Los marcadores fluorescentes para controlar la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR pueden ser moléculas de intercalación de ADN bicatenario, como la tinción con gel de ácido nucleico SYBR Green I. El agente de intercalación de ADN SYBR Green I, conduce a la detección de productos de amplificación específicos y no específicos (Wang et al., 2006; Navarro et al., 2015). La medición de la cinética de la reacción en las primeras fases de la PCR proporciona una clara ventaja sobre la detección de PCR tradicional (Biosystems, 2008). En la PCR en tiempo real es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra inicial, mientras en la PCR convencional no es posible (Tamay de Dios et al., 2013).

Una ejecución básica de PCR en tiempo real se puede dividir en tres fases. La primera fase es la exponencial donde la duplicación exacta del producto se acumula en cada ciclo (suponiendo un 100% de eficiencia de reacción). La reacción es muy específica y precisa. La segunda fase es lineal (alta variabilidad) donde los componentes de la reacción se están consumiendo, la reacción se está desacelerando y los productos comienzan a degradarse. Por último, la tercera fase es Plateau o estacionaria donde el producto obtenido permanecerá constante aunque se aumente el número de ciclos (Biosystems, 2008).

La PCR de transcripción inversa o RT-PCR es una técnica para analizar la expresión de ARN mensajero (ARNm) derivada de diversas fuentes. El ARNm se transcribe a la inversa en ADN complementario (ADNc), utilizando la transcriptasa inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (Neidler, 2017). Hay dos tipos de cuantificación en RT-PCR en tiempo real, cuantificación absoluta y cuantificación relativa.

La cuantificación absoluta está basada en una curva de calibración interna o externa. Mientras en la cuantificación relativa, los cambios en la expresión génica de la muestra se miden en base a un estándar externo o una muestra de referencia, también conocido como calibrador. Cuando se utiliza un calibrador, los resultados se expresan como una relación objetivo / referencia. Existen numerosos modelos matemáticos disponibles para calcular la

expresión media del gen normalizado a partir de ensayos de cuantificación relativa. El método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia relativa de pliegues entre una muestra experimental y una muestra calibradora (Biosystems, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

La fase experimental del trabajo se realizó en las instalaciones del Bioterio del laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA), Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria la Molina. La evaluación de la expresión del gen *PPAR α* se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la misma Facultad. El experimento duró 89 días.

3.2 Animales y dietas

Se utilizaron 24 ratas machos adultas Holtzman con una edad media de 53.38 ± 0.31 días y 233.92 ± 1.19 gramos de peso, adquiridas al bioterio del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina. Las ratas se alojaron en jaulas individuales y se adaptaron durante 5 días. El experimento se llevó a cabo en dos etapas.

En una primera etapa, los animales recibieron una dieta obesogénica (DO) por 30 días. La dieta obesogénica constó de un 85 por ciento del alimento basal brindado por la planta de alimentos de la UNALM (Cuadro 1) y un 15 por ciento de manteca vegetal, este porcentaje se estimó en función a lo reportado por Harrold et al. (2000), que indujo a la obesidad en ratas con dietas conteniendo grasa al 13 por ciento de la energía total en una dieta de alta energía (Harrold et al., 2000).

En la segunda etapa de 59 días, los animales de experimentación se asignaron al azar a cada tratamiento (12 ratas por tratamiento). El primer grupo recibió la dieta obesogénica (DO) (control) y el segundo grupo recibió la dieta obesogénica modificada, que constó de una reducción del porcentaje de manteca y reemplazo por aceite de linaza (DL) con una dosis de 0.4 ml/kg peso, vía oral con jeringas hipodérmicas de 1ml sin agujas. La dosis de linaza se determinó sobre la base del trabajo de Singh et al. (2008).

Durante todo el experimento se registró diariamente tanto el alimento proporcionado como el residuo de alimento, el consumo se calculó por diferencia de peso.

Asimismo, se registró el peso de las ratas semanalmente, antes de proporcionar los alimentos.

Cuadro 1: Composición nutricional del alimento basal

Nutriente	Porcentaje
Prot. Dig.	17.00
Fibra	4.00
Grasa	6.00
E.M. (Mcal/Kg)	2.90
Lisina Dig.	0.92
Met + CisDig.	0.98
Fósforo Disp.	0.37
Ca	0.63

FUENTE: Dieta proporcionada por el Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos. UNALM.

El aceite de oliva se obtuvo del comercio local (ARSENNA SAC, lote 1112416). La dosis del aceite se proporcionó utilizando jeringas hipodérmicas de 1ml de capacidad sin agujas y estas fueron descartadas una vez utilizadas. Los ácidos grasos del aceite de linaza se determinaron de acuerdo con el método estándar de ISO (2014) (Cuadro 2).

Cuadro 2: Composición de ácidos grasos (%) de aceite de linaza

Aceite grasos	Porcentaje
Ácidos grasos Poliinsaturados	70.89
Ácido Linolénico (omega 3) C18:3n3	56.85
Ácido Linoléico (omega 6) C18:2n6c	13.73
Gamma Linolénico (omega 6) C18:3n6	0.20
Ácido Araquidónico (omega 6) C20:4n6	0.11
Ácidos grasos Monoinsaturados	17.98
Ácidos grasos saturados	9.12
Ácidos grasos no identificados	2.01

FUENTE: Elaborado a partir del informe de ensayo N°128165 de aceite de linaza (Anexo1).

3.3 Medidas morfológicas

Se registró el peso de cada rata y se midieron las longitudes hocico-ano. El peso y la longitud hocico-ano fueron utilizados para obtener el índice de Lee, parámetro antropométrico que es un predictor de obesidad (Bernardis, 1970) y marcador de obesidad (Contini et al., 2012). El índice de Lee (Bernardis y Patterson, 1968), se calculó por la siguiente formula

$$\frac{\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)}}}{\text{longitud hocico-ano (cm)}} \text{ dónde:}$$

- Valor menor a 0.3 = normal
- Valor mayor a 0.3 = obesidad

Al término de la primera etapa (30 días) se evaluaron las medidas del índice de Lee de las 24 ratas y el resultado fue superior a 0.3; en consecuencia, todas las ratas estaban obesas.

3.4 Perfil de lipídico sanguíneo

Para evaluar el perfil lipídico de las 24 ratas se empleó el kit Mission Cholesterol Meter[®], al inicio y al final de cada etapa. Se realizó un piquete en la cola de la rata que estaba en ayuna y en seguida con un capilar se recolectó una gota de sangre, la cual se colocó en el dispositivo de control y posteriormente fueron leídos al pasar unos 20 segundos aproximadamente, al final se registraron los resultados. El kit determinó 3 pruebas en 1:

- ✓ Determinación de colesterol total
- ✓ Determinación de c-HDL
- ✓ Determinación de triglicéridos

3.5 Manejo de la eutanasia y extracción de tejidos

Al concluir la segunda etapa, se procedió a realizar el protocolo de la eutanasia a las ratas. Para ello, las ratas se mantuvieron en ayuno nocturno por 12 horas, luego los animales fueron sacrificados por una sobredosis de pentobarbital, previo anestesiamiento utilizando una dosis de ketamina/ xilacina (40-90 mg/kg y 10-15 mg/kg) por vía intraperitoneal (IP), se realizó dicho procedimiento con una aguja hipodérmica de 25 G. Cuando las ratas ya no mostraron signos vitales se procedió a retirar los órganos requeridos para el estudio, en este caso se extrajeron 6 muestras de hígados por tratamiento, los cuales fueron colocados en viales criogénicos con ARN later, 1.5 ml de solución para 100 mg de tejido, y se dejaron a 4°C

durante una noche con la finalidad que la solución de ARN later[®] sea absorbida por el tejido; al día siguiente se decantó el sobrenadante y se conservó el tejido a -20°C hasta efectuarse los análisis respectivos. El estudio cumplió con las normas éticas para la investigación establecidas por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la FMV-UNMSM.

3.6 Expresión del gen *PPAR α* en el hígado

La extracción de ácido ribonucleico (ARN) total se realizó en las muestras de hígado conservadas a -20°C. La extracción del ARN total se realizó mediante el método de Chomczynsky con TRIzol[™]Reagent (Thermo Fisher, 2016a). Este método se centra en el uso de tiocianato de guanidina, un desnaturalizante de proteínas que propicia el aislamiento intacto de ARN (Sánchez, 2010). El protocolo de extracción del ARN total se describe en el Anexo 2. Posterior a la extracción del ARN se realizó un primer control de calidad interno, cuantificando el ARN total obtenido en el paso anterior por medio del equipo NanoDrop[™]One/One^C obteniendo una concentración de ARN 1000 ng/ μ l y se verificó la calidad de ARN sucio a través electroforesis. La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda (260 nm y 280 nm). La relación entre la lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (DO260/ DO280) permite estimar la pureza del ARN (Nolan et al., 2006); extracciones puras tienen una relación DO260/ DO280 de aproximadamente de 2.0, ya que una contaminación significativa con fenol o proteínas implicaría que el valor del cociente DO260/ DO280 sea menor al esperado (Sánchez, 2010).

Posteriormente, el ARN purificado fue tratado con TURBO DNA-free[™] en un termobloque. El protocolo de limpieza de ARN se describe en el Anexo 3 (Thermo Fisher, 2012a). Este protocolo permite eliminar trazas de cantidades moderadas de ácido desoxiribonucleico (ADN) contaminante hasta 50 μ g de ADN/ml de ARN y posteriormente eliminar la desoxirribonucleasa (DNasa) y cationes divalentes de la muestra (Thermo Fisher, 2012b). Debido a que el ARN se convertiría en ADN por medio de la transcriptasa inversa y seguidamente se amplificarían los genes en estudio, cualquier ADN genómico presente también podría ser amplificado y por lo tanto alterar los resultados finales de reacción en cadena de la polimerasa con retro-transcripción (PCR-RT). Posterior a la limpieza del ARN se realizó un segundo control de calidad interno, cuantificando el ARN total obtenido en el paso anterior por medio del equipo NanoDrop[™]One/One^C obteniendo aproximadamente a una concentración de ARN 200 ng/ μ l y se realizó PCR para control de contaminación con DNA.

Seguidamente, se realizó la retrotranscripción para generar ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total, se utilizó High Capacity cDNA reverse transcription Kits (Anexo 4) utilizando *primers* y nucleótidos de desoxirribosa (dNTP's) (Biosystems, 2010), que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa para sintetizar una cadena complementaria de ADN (Cuadro 3).

Cuadro 3: Iniciador utilizado en la PCR a tiempo real cuantitativa

Gen	Sentido	Antisentido
<i>PPARα</i>	5'-AATCCACGAAGCCTACCTGA-3'	5'-GTCTTCTCAGCCATGCACAA-3'

El *primer* para el gen *PPARα* se seleccionó en base Long et al. (2015).

Previo a la PCR de expresión se realizó una estandarización donde se identificó la temperatura idónea, haciendo una gradiente de temperaturas y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con curvas para elegir el gen endógeno entre 18S ribosomal RNA y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPGH). La cuantificación del ADNc en el hígado se realizó mediante qPCR-RT utilizando como reactivo SYBR Green Master Mix, según las recomendaciones del fabricante (Anexo 5) (Thermo Fisher, 2016b).

Para la normalización de los genes se identificó como gen endógeno idóneo al 18S ribosomal RNA; el cálculo de la expresión relativa de los genes en estudio se realizó mediante el método Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Este método utiliza directamente la información de ciclo umbral (Ct), que es el ciclo en el que el nivel de fluorescencia alcanza una cierta cantidad (el umbral) generada a partir de un sistema qPCR para calcular la expresión génica relativa en muestras objetivo y de referencia, usando el gen de referencia como normalizador (Rao et al., 2013).

3.7 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentaron como media \pm SEM. La distribución normal de los datos se evaluó con la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza con la prueba de Levene. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann Whitney con un nivel de significancia

$p < 0.05$ para muestras independientes y prueba no paramétrica Wilcoxon con nivel de significancia $p < 0.05$ para muestras relacionadas. También se aplicó la prueba T student para muestras apareadas en caso de que siguieran distribución normal. Se aplicó la prueba T student para muestras independientes, lo que permitió evaluar los efectos de la suplementación con el aceite de linaza sobre la expresión del gen *PPAR α* . El nivel de significancia fue pre establecido en un valor $p < 0.05$. El análisis correspondiente se desarrolló utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 23 libre) y GraphPad Prism™ (version 7.0 libre).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Peso corporal y perfil lipídico sanguíneo de las ratas

Se puede observar que al terminar la primera etapa del experimento para inducir a obesidad con la dieta obesogénica, el peso de las ratas se incrementó significativamente con respecto al peso corporal inicial. Asimismo, se observó que la concentración de triglicéridos se incrementó significativamente con respecto a la concentración inicial, evidenciando estos resultados el efecto de la dieta obesogénica en las ratas (Cuadro 4).

Cuadro 4: Peso y perfil lipídico sanguíneo en ratas después 30 días

Parámetro	Antes	Después DO
Peso (g)	233.92±1.19 ^b	359.13±5.16 ^a
TRIG (mg/dl) *	50.04±0.97 ^b	132.63±6.83 ^a
HDL(mg/dl)	42.71±1.63 ^a	41.54±1.50 ^a

Los valores representan el promedio \pm SEM de 24 ratas antes y después de la dieta obesogénica (DO). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). *Se aplicó prueba no paramétrica Wilcoxon, significación estadística fue $p < 0.05$.

A continuación, en la segunda etapa donde se asignaron los tratamientos (Cuadro 5), se observó que el peso corporal final del grupo que recibió la dieta obesogénica suplementada con aceite de linaza incrementó significativamente con respecto al peso del grupo control que solo recibió la dieta obesogénica. Este incremento significativo en el peso del grupo que recibió la dieta obesogénica suplementada con aceite de linaza, guardaría cierta relación con un consumo ligeramente superior de alimento por parte del grupo que consumió aceite de linaza con respecto al grupo control (ver Cuadro 5), sin embargo, este incremento no fue significativamente diferente a lo consumido por el grupo control. Debido a los datos encontrados se podría afirmar que no habría un efecto de la suplementación del aceite de linaza en la reducción del peso en ratas obesas.

Cuadro 5: Consumo de alimento y peso en ratas después de 59 días.

Parámetro	DO	DL
Consumo de alimento promedio(g/d)	17.79±1.31 ^a	18.48±1.00 ^a
Peso corporal (g) después de (59d)	407.42±30.86 ^b	453.08±13.53 ^a

Los valores representan el promedio ± SEM de 12 ratas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La ganancia de peso de ratas suplementadas con aceite de linaza coincide con un estudio realizado en ratones por Sundaram et al. (2015) cuyos tratamientos incluyeron una dieta baja en grasa (aceite de maíz), dieta alta en grasa más aceite de maíz, dieta alta en grasa más aceite de pescado, dieta alta en grasa más aceite de linaza, dieta alta en grasa más aceite de soja y dieta alta en grasa más aceite de girasol donde se reportó que las dietas ricas en grasas, independientemente de los tipos de aceites, aumentaron significativamente el peso corporal en comparación con la dieta baja en grasas (Sundaram et al., 2015). En cambio, los resultados reportados por Viajaimohan et al. (2006) en ratas cuyos tratamientos incluyeron una dieta basal, dieta alta en grasa, dieta alta en grasa más aceite de linaza, la suplementación con aceite de linaza redujo significativamente la ganancia de peso corporal en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

Por otro lado, resultados similares reportaron Avellaneda et al. (2013) en ratas cuyos tratamientos fueron dietas con composición similar excepto la fuente de grasa, aceite de soya, grasa animal, aceite de linaza y aceite de sésamo, las dietas experimentales suplementadas con diferentes fuentes de grasa incrementaron el peso en comparación con el grupo control, incluso se reportó una ingesta superior de alimento en aquellas con las dietas experimentales suplementadas con diferentes fuentes de grasa en comparación con el grupo control. Según el autor antes mencionado, el incremento de peso en ratas que recibieron una dieta suplementada con diferentes fuentes de grasa estaría relacionado con una ingesta superior de alimento, lo que podría explicar la ganancia de peso encontrado en las ratas que recibieron la dieta obesogénica suplementada con el aceite de linaza en el presente trabajo.

4.2 Perfil lipídico sanguíneo de las ratas

Se aprecia en el cuadro 6 el perfil lipídico sanguíneo (c-HDL y triglicéridos) en la segunda etapa donde se asignaron los tratamientos, se observó que las concentraciones de c-HDL del grupo que recibió la dieta obesogénica suplementada con aceite de linaza se incrementó ligeramente con respecto del grupo control, pero estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. Asimismo, las concentraciones de niveles de triglicéridos del grupo que recibió la dieta obesogénica suplementada con aceite de linaza disminuyó ligeramente con respecto del grupo control, pero estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. Este ligero incremento numérico de concentraciones de c-HDL y disminución de niveles de triglicéridos encontrados en el grupo que recibió la suplementación con aceite de linaza, guardaría relación con la incorporación de la linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL n-3) y su efecto benéfico en la mejora del perfil lipídico (Viajaimohan et al., 2006).

Cuadro 6: Perfil lipídico en ratas después de 59 días.

Parámetro	DO	DL
c-HDL(mg/dl) después de (59d)	39.25±1.44 ^a	40.58±2.11 ^a
TRIG* (mg/dl) después de (59d)	71±4.88 ^a	62.17±4.18 ^a

Los valores representan el promedio \pm SEM de 12 ratas por tratamiento. Letras iguales indican no diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). *Se aplicó prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, significación estadística fue $p < 0.05$.

Por su parte el aceite de linaza como fuente de AGPI-CL n-3 activaría el receptor farnesoide X (FXR), lo que reduciría los niveles de triglicéridos a través de la modulación de la actividad de la lipoproteína lipasa en el hígado, la inducción de PPAR α (Saravanan et al., 2010) y la inhibición de SREBP-1c, proteína que regula la tasa sintética de triglicéridos (Shimano et al., 1997; Yahagi et al., 2002). La activación del gen PPAR α aumentaría la oxidación de ácidos grasos, la lipoproteína lipasa, el transporte de ácidos grasos y la mejora en la diferenciación de los adipocitos, todo lo cual contribuye a disminuir la concentración de triglicéridos (Saravanan et al., 2010). Los estudios señalan que los AGPI-CL n-3 actúan como ligandos, activando la señalización de factores de transcripción PPAR que regulan el equilibrio metabólico de la glucosa y los lípidos (Echevarria et al., 2016).

En la presente investigación, se observó el efecto de la suplementación con aceite de linaza sobre el incremento de las concentraciones de c-HDL y la disminución de los niveles de triglicéridos (aunque no estadísticamente significativas) en ratas inducidas a obesidad. Viajaimohan et al. (2006) reportó similares resultados en ratas cuyos tratamientos incluyeron una dieta basal, dieta alta en grasa, dieta alta en grasa más aceite de linaza y dieta con aceite de linaza donde en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa más aceite de linaza redujeron significativamente el colesterol plasmático y triglicéridos en comparación con ratas alimentadas con una dieta alta en grasa. Incluso, en el trabajo realizado por Viajaimohan et al. (2006), no encontraron diferencia significativa en la concentración de c-HDL en las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa más aceite de linaza y la dieta con aceite de linaza en comparación con la dieta basal.

Un estudio realizado en ratones se encontró que la suplementación dietética con aceite de linaza (rico en ALA) atenúa eficazmente la acumulación de lípidos hepáticos inducida por el etanol en ratones y que este efecto del aceite de linaza podría ser debido a un menor estrés en el retículo endoplasmático y a un metabolismo lipídico normalizado en el tejido adiposo (Wang et al., 2016).

En otro estudio realizado por Khan y Makki (2017) en ratas Wistar inducidas con hiperlipidemia se reportó que la dieta con aceite de linaza redujo significativamente los niveles de colesterol total, c-LDL y aumentó significativamente los de c-HDL en comparación con el grupo hipercolesterolémico. En el mismo estudio, la suplementación con aceite de linaza evidenció una disminución, aunque no significativa en las concentraciones de triglicéridos en comparación con el grupo hipercolesterolémico; sin embargo también hallaron que la dieta con aceite de pescado mostró una disminución estadísticamente significativa de los valores de colesterol total, c-LDL y un aumento de los niveles de c-HDL, y disminución de los niveles de triglicéridos estadísticamente no significativos en comparación con el grupo hipercolesterolémico (Khan y Makki, 2017).

Los datos registrados en el presente estudio que muestran un aumento de las concentraciones de c-HDL y una disminución de los niveles de triglicéridos aunque no estadísticamente significativa en ambos casos con la suplementación de aceite de linaza en ratas inducidas a obesidad coincidirían en parte con lo registrado por Khan y Makki (2017) donde a pesar de no ser significativa la reducción de los niveles de triglicéridos, se evidencia que la

suplementación con aceite de linaza como fuente ácidos grasos poliinsaturados induce alteraciones favorables en el perfil lipídico sérico de las ratas.

4.3 Expresión relativa del gen *PPAR α*

En la figura 1 se observa la expresión relativa del gen *PPAR α* , analizada en la matriz del hígado de ratas obesas a las que se suministró linaza y control obesogénica (n=6/tratamiento). La expresión del gen en la rata obesa fue utilizada en la comparación como nivel de expresión basal. Como gen de referencia se utilizó el 18S ribosomal RNA. El suministro de linaza resultó no significativo para el gen *PPAR α* , sin embargo, se evidencia una tendencia a que el tratamiento con aceite linaza incremente la expresión del gen *PPAR α* en el hígado. Este ligero incremento se debería a la presencia de AGPI n-3 en el aceite, que contiene 53% de ALA (Marques et al., 2011). Los ácidos grasos de cadena larga n-3 son ligandos óptimos de los PPAR (Grygiel-Górniak, 2014). De igual modo, la activación de gen *PPAR α* aumenta la oxidación de ácidos grasos, la lipoproteína lipasa, el transporte de ácidos grasos y mejora la diferenciación de los adipocitos, lo cual contribuye a disminuir la concentración de triglicéridos (Saravanan et al., 2010).

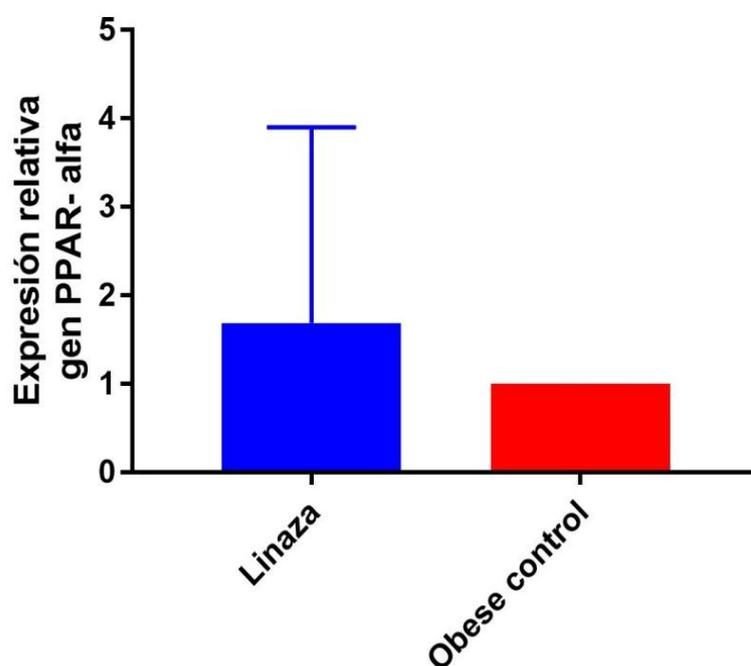


Figura 1: Expresión relativa del gen *PPAR α* en ratas después de 59 días.

En el presente estudio se evidencia una tendencia que el tratamiento con suplementación de aceite linaza disminuya la concentración de triglicéridos e incremente la expresión del gen

PPAR α , resultados que coinciden con lo reportado por Devarshi et al. (2013) en ratas inducidas a diabetes cuyos tratamientos incluyeron una dieta basal, dieta con aceite de linaza y dieta con aceite de pescado donde la dieta con aceite de linaza redujo la concentración de triglicéridos séricos, la expresión de TNF- α , IL-6 y aumentó la concentración c-HDL en ratas diabéticas. Incluso Devarshi et al. (2013) encontraron que la dieta con aceite de linaza regulaba significativamente el factor de transcripción *PPAR α* y la disminución de expresión *SREBP-1* en ratas diabéticas, que habría aumentado la β -oxidación de ácidos grasos y reducción de la lipogénesis, reduciendo de este modo los niveles de triglicéridos.

Se podría deducir a partir del trabajo realizado por Devarshi et al. (2013) que la suplementación con aceite de linaza fuente rico de ácido linolénico (ALA) lleva a un aumento en su metabolismo a sus derivados de AGPI-CL como EPA y DHA, lo que daría origen al aumento de EPA y DHA a nivel de la membrana celular conduciendo a una disminución de ácido araquidónico en los fosfolípidos de la membrana, asimismo desencadenando la disminución de la inflamación y reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias. Esto a su vez, ocasionaría un aumento en la expresión del gen *PPAR α* produciendo cambios en la lipogénesis.

El aceite de linaza como fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados n-3 además de mejorar el perfil lipídico a través de la inhibición de la lipogénesis y promoción de la β -oxidación con la activación del receptor *PPAR α* , también tendría un potencial inmunomodulador antiinflamatorio, que se evidenció en un estudio realizado por Bashir et al. (2015) donde usaron ratones C57BL/6 inducidos a obesidad reportaron que la dietas alta en grasa más aceite de linaza manifestó un potencial inmunomodulador antiinflamatorio; conforme se incrementaba la dosis de aceite de linaza, disminuía la concentración del TNF- α proinflamatorio, pudiendo así el aceite de linaza aliviar la condición de inflamación crónica relacionada con la obesidad. Asimismo, los resultados de Bashir et al. (2015) evidenció que los ratones con dieta alta en grasa más aceite de linaza disminuyeron significativamente los niveles de triglicéridos inducidos por la obesidad en comparación con los ratones sin el aceite de linaza, incluso Bashir et al. (2015) encontraron que el nivel de colesterol se redujo, aunque no significativamente en la dieta alta en grasa con aceite de linaza en todos los niveles de dosis.

En otro estudio realizado por Yu et al. (2017) en ratones C57BL/6J con resistencia a la insulina inducida por dietas ricas en grasa se evidenció una disminución de resistencia

sistémica a la insulina con dosis medias de aceite de linaza, en paralelo a la acumulación de ALA y sus derivados n-3 en el suero circulante que estarían asociados con una menor prevalencia de obesidad y resistencia a la insulina. Inclusive el autor mencionado antes encontró que una dosis media de aceite de linaza bloqueó la activación metabólica de los macrófagos de tejido adiposo (ATM), mejorando de esta manera la señalización de insulina en el tejido adiposo (Yu et al., 2017). No obstante según Rao y Lokesh (2016), el aceite de linaza no reduce la expresión de marcadores proinflamatorios como 5-lipooxigenasa (LOX-5) y NF-kB sino aumenta la expresión del gen *PPAR γ* .

De la misma manera en un estudio realizado por Ghadge et al. (2016) en ratas inducidas a diabetes cuyos tratamientos luego de la inducción incluyeron una dieta control, dieta con estreptozotocina (STZ), dieta con metformina, dieta con aceite de linaza y dieta con aceite de pescado; la dieta con aceite de linaza y la dieta con aceite de pescado mejoraron el perfil lipídico, reduciendo el colesterol sérico, los triglicéridos, y también redujeron la expresión del factor de transcripción SREBP-1, la expresión de la sintasa de ácido graso, la acil-coA sintasa de cadena larga y la transacilasa de la proteína transportadora de malonil-coA-acilo en ratas diabéticas. Igualmente, Ghadge et al. (2016) reportaron que la dieta con aceite de linaza y la dieta con aceite de pescado disminuyeron la citoquina aterogénica como NF-K β en ratas inducidas a diabetes.

La falta de significancia en el incremento de la expresión relativa del gen *PPAR α* en el tratamiento con aceite de linaza del presente trabajo concuerda con lo reportado por Campioli et al. (2012) en ratas cuyos tratamientos fueron dieta con aceite de oliva (control), dieta con aceite de linaza y dieta con aceite mixto (aceite de linaza y pescado) donde las ratas que recibieron la dieta con aceite de linaza no presentaron ningún cambio en la concentración de proteína hepática de *PPAR α* con respecto al control, sin embargo el tratamiento con aceite mixto aumentó significativamente la concentración hepática de *PPAR α* . A partir de este último estudio realizado por Campioli et al. (2012) se podría deducir que el aceite de linaza como fuente de ácido linolénico (ALA) tendría una baja conversión a DHA y EPA en comparación al aceite de pescado que es fuente directa de EPA y DHA haciendo que este último ocasione aumento significativo en la expresión del gen *PPAR α* a nivel hepático, pero se necesitarían más estudios para contrastar esta idea.

En el presente trabajo se evidenció que la suplementación con aceite de linaza en ratas obesas evidencia una tendencia a que el tratamiento con aceite linaza incrementa la expresión del

gen *PPAR α* . Asimismo mejoró la concentración de colesterol-HDL y disminuyó la concentración de triglicéridos de forma no significativa en comparación con el control, a pesar de esta mejora en el perfil lipídico sanguíneo, las ratas que recibieron la dieta suplementada con aceite de linaza aumentaron significativamente de peso a comparación con el control. Estos resultados son interesantes porque muestra cómo el aceite de linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados puede activar la expresión del gen *PPAR α* , que a su vez está involucrada con el catabolismo lipídico que explicaría la mejora del perfil lipídico en las ratas que recibieron este tratamiento, sin embargo esta intervención se estaría dando sin afectar el aumento de peso.

V. CONCLUSIONES

En consecuencia, a lo realizado en el presente trabajo de investigación y en función a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. La suplementación con aceite de linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados en ratas inducidas a obesidad, tuvo una tendencia a incrementar los niveles de expresión relativa de gen *PPAR α* .
2. La suplementación con aceite de linaza como fuente de ácidos grasos poliinsaturados en ratas inducidas a obesidad, ocasionó una tendencia a mejorar el perfil lípido, aumentando la concentración de niveles c-HDL y disminuyendo los niveles de triglicéridos.

VI. RECOMENDACIONES

Luego de realizado el presente trabajo de investigación, se recomienda:

1. Determinar los procesos de bioconversión de EPA y DHA a partir de ALA mediante la expresión génica de factores de transcripción SREBP-1, PPAR- α y marcadores inflamatorios en modelos animales inducidos a obesidad.
2. Evaluar la morfología de los adipocitos en modelos animales inducidos a obesidad y verificar sus modificaciones con los cambios de la dieta.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, Y., KELLEY, D. 2010. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem*, 21: 781-792.

AGOSTINI, M., SCHOENMAKERS, E., MITCHELL, C., SZATMARI, I., SAVAGE, D., SMITH, A., RAJANAYAGAM, O., SEMPLE, R., LUAN, J., BATH, L. 2006. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR gamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab*, 4: 303-311.

ALBERTI, K., ECKEL, R., GRUNDY, S., ZIMMET, P., CLEEMAN, J., DONATO, K., FRUCHART, JC., JAMES, W., LORIA, CM., SMITH, S. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, 120: 1640-1645.

AVELLANEDA, G., RODRIGUES, M., LEITE, M., FILIU, W., VIANA, L., TAÍS, NV., AIKO, HP. 2013. Sesame and flaxseed oil: nutritional quality and effects on serum lipids and glucose in rats. *Food Sci. Technol. Campinas*, 33(1): 209-217.

BASHIR, S., ALI, S., KHAN, F. 2015. Partial Reversal of Obesity-Induced Insulin Resistance Owing to Anti-Inflammatory Immunomodulatory Potential of Flaxseed Oil. *Immunological Investigations*, 44(5): 451-469.

BERNARDIS, LL. 1970. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. *Experientia*, 26: 789-790.

BERNARDIS, LL., PATTERSON, B. 1968. Correlation between Lee Index and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J. Endocrinol*, 40(4): 527-528.

BIOSYSTEMS, A. 2008. Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-Time quantitative PCR. [En línea] 09 de Marzo de 2018. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf

BIOSYSTEMS, A. 2010. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol. [En línea] 09 de Febrero de 2018. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>

CALDER, P. 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. *Biochimie*, 91: 791-795.

CALDER, P. 2015. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *J. Parenter Enteral Nutr*, 39(Suppl 1): 18-32.

CALDER, P., GRIMBLE, R. 2002. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr*, 56(Suppl.3): 14-19.

CAMPIOLI, E., RUSTICHELLI, C., AVALLONE, R. 2012. n-3 Dietary supplementation and lipid metabolism: Differences between vegetable- and fish-derived oils. *Journal of functional foods*(4): 207-212.

CASTELLANOS, T., RODRIGUEZ, D. 2015. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. *Rev. Chil. Nutr*, 42(1): 90-95.

CHAN, M., EVANS, K., MOORE, A., FONG, D. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): balance for survival in parasitic infections. *J. Biomed. Biotechnol*, 2010: 828-951.

CHIANG, N., SERHAN, C. 2017. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol. Aspect. Med*, 58: 114-129.

CHOI, J., BOTHWELL, A. 2012. El receptor nuclear PPARs como importantes reguladores de las funciones de las células T y las enfermedades autoinmunes. *Mol Cells*, 33: 217-222.

CHRISTIE, W., HAN, X. 2010. Lipid analysis isolation, separation, identification and lipidomic analysis (4th edn. ed.). Oily Press, Bridgewater.

CLARIA, J., DALLI, J., YACOUBIAN, S., GAO, F., SERHAN, C. 2012. Resolvin d1 and resolvin d2 govern local inflammatory tone in obese fat. *J. Immunol*, 189(5): 2597-2605.

CLARIA, J., NGUYEN, B., MADENCI, A., OZAKI, C., SERHAN, C. 2013. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, 304(12): 1141-1149.

COLOVIC, D., BERENJI, J., LEVART, A., LEVIC, J., SALOBIR, J., PEZO, L., COLOVIC, R. 2016. Nutritional characteristics of seeds of eighteen linseed cultivars from Serbia. *Zemdirbyte-Agriculture*, 103: 175-182.

CONTINI, M., MILLEN, N., MAHIEU, S. 2012. Antropometría, metabolismo y estado oxidativo en ratas hembras con obesidad inducida por glutamato monosódico oral. *Revista Fabicib*, (16): 48-60.

DEME, T., HAKI, G., RETTA, N., WOLDEGIORGIS, A., GELETA, M. 2017. Contenido Mineral y Antinutricional de Semillas de Niger (*Guizotia abyssinica* (Lf) Cass., Linaza (*Linum usitatissimum* L.) y Sesame (*Sesamum indicum* L.) Cultivadas en Etiopía. *Alimentos*, 6(4): 27-37.

DEVARSHI, P., JANGALE, N., GHULE, A., BODHANKAR, S., HARSULKAR, A. 2013. Beneficial effects of flaxseed oil and fish oil diet are through modulation of different hepatic genes involved in lipid metabolism in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Genes Nutr*(8): 329-342.

DÍAZ, C., GARROTE, H., AMOR, A., SUÁREZ, Y., GONZÁLEZ, R. 2013. Cuantificación del ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(3): 298-303.

DIMRI, M., BOMMI, P., SAHASRABUDDHE, A., KHANDEKAR, J., DIMRI, C. 2010. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(3): 489-495.

ECHEVERRÍA, F., ORTIZ, M., VALENZUELA, R., VIDELA, L. 2016. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 114: 28-34.

EVANS, R., BARISH, G., WANG, Y. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med*, 10: 355-361.

FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H., GLASS, C., MERRILL, A., MURPHY, R., RAETZ, C., RUSSELL, D., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., VANNIEUWENHZE, M., WHITE, S., WITZTUM, J., DENNIS, E. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res*, 46(5): 839-861.

GALANO, J., LEE, J., GLADINE, C., COMTE, B., LE GUENNEC, J., OGER, C., DURAND, T. 2015. Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of adrenic, docosahexaenoic, eicosapentaenoic and alpha-linolenic acids; bioactivities and potential use as biomarkers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1851(4): 446-455.

GEORGIADI, A., KERSTEN, S. 2012. Mechanisms of gene Regulation by Fatty Acids. *American Society for Nutrition Adv. Nutr*, 3: 127-134.

GHADGE, A., HARSULKAR, A., KARANDIKAR, M., PANDIT, V., KUVALEKAR, A. 2016. Comparative anti-inflammatory and lipidnormalizing effects of metformin and omega-3 fatty acids through modulation of transcription factors in diabetic rats. *Genes and Nutrition*(11): 10.

GHAFOORUNISSA, IBRAHIM, A., RAJKUMAR, L., ACHARYA, V. 2005. Dietary (n-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevent sucrose-induced insulin resistance in rats. *J. Nutr*, 135(11): 2634-2638.

GRYGIEL-GÓRNIAK. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications. *J. Nutr*, 13: 1-10.

HARROLD, J., WILLIAMS, G., WIDDOWSON, P. 2000. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *J. Neurochem*, 74: 1224-1228.

HEGELE, R., CAO, H., FRANKOWSKI, C., MATHEWS, S., LEFF, T. 2002. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*, 51: 3586-3590.

HELLMANN, J., TANG, Y., KOSURI, M., BHATNAGAR, A., SPITE, M. 2011. Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. *J. Faseb*, 25(7): 2399-2407.

HERNANDO, J., MACH, N. 2015. Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la prevención de la obesidad a través de modificaciones epigenéticas. *Endocrinol. Nutr*, 62(7): 297-362.

HERRERO, L., SHAPIRO, H., NAYER, A., LEE, J., SHOELSON, S. 2010. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 107(1): 240-245.

INS/CENAN. 2017. Informe Gerencial 2013-2017: Enfermedades no transmisibles y transmisibles. [En línea] 02 de Agosto de 2018. https://observateperu.ins.gob.pe/images/archivos/situacion-nutricional/2018/0_sobrepeso_y_obesidad_en_la_poblacion_peruana.pdf

INS/CENAN/DEVAN. 2017. Informe Gerencial 2009-2017: Estado Nutricional de niños menores de 5 años y Gestantes de los Establecimientos de Salud del Ministerio de Salud. [En línea] 02 de Agosto de 2018. https://observateperu.ins.gob.pe/images/archivos/situacion-nutricional/2018/3_1_tendencia_del_sobrepeso_y_obesidad_en_ninas_y_ninos_menores_de_cinco_anos.pdf

ISO. 2014. Patente n° Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters. ISO 12966-1:2014.

JIMÉNEZ, P., MASSON, S., QUITRAL, R. 2013. Composición química de semillas de chíá, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Rev. Chil. Nutr*, 40(2): 155-160.

KHAN, S., MAKKI, A. 2017. Dietary Changes with Omega-3 Fatty Acids Improves the Blood Lipid Profile of Wistar Albino Rats with Hypercholesterolaemia. *International Journal of Medical Research and Health Sciences*, 6(3): 34-40.

KNOCH, B., BARNETT, M., ROY, N., MCNABB, W. 2009. Study of the effects of dietary polyunsaturated fatty acids: Molecular mechanisms involved in intestinal inflammation. *Grasas Aceites*, 60: 8-21.

KOHLGRUBER, A., LAMARCHE, N., LYNCH, L. 2016. Adipose tissue at the nexus of systemic and cellular immunometabolism. *Semin. Immunol*, 28(5): 431-440.

KUDA, O. 2017. Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid. *Biochimie*, 136: 12-20.

KUDA, O., BREZINOVA, M., ROMBALDOVA, M., SLAVIKOVA, B., POSTA, M., BEIER, P., JANOVSKA, P., VELEBA, J., KOPECKY JR, J., KUDOVA, E., PELIKANNOVA, T., KOPECKY, J. 2016. Docosahexaenoic acid-derived Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids (FAHFAs) with anti-inflammatory properties. *Diabetes*, 65(9): 2580-2590.

KUDA, O., ROSSMEISL, M., KOPECKY, J. 2017. Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology. *Molecular Aspects of Medicine*(3): 1-14.

KUROE, M., KAMOGAWA, H., HOSOKAWA, M., MIYASHITAI, K. 2016. Dietary ALA from Spinach Enhances Liver n 3 Fatty Acid Content to Greater Extent than Linseed Oil in Mice Fed Equivalent Amounts of ALA. *Lipids*, 51: 39-48.

LARTER, C., YEH, M., CHENG, J., WILLIAMS, J., BROWN, S., DELA PENA, A., BELL-ANDERSON, K., FARRELL, G. 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by dietary fish oil attenuates steatosis, but does not prevent experimental steatohepatitis because of hepatic lipoperoxide accumulation. *J. Gastroenterol*, 23: 267-275.

LONG, L., LEI, L., LING, C., XIAOYU, L., YAPING, X., JIE, R., JIN, F., YAN, Q. 2015. Effect of oleoylethanolamide on diet-induced nonalcoholic fatty liver in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127: 244-250.

MARQUES, A., MARQUES, C., PROKOPP, T., BARCELLOS DE MOURA, G., DA GRACA KOLINSKI, M., RYCHECKI, L. 2011. Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) prepared by different methods on the biological response of rats. *Revista de Nutrição*, 24(1): 131-141.

- MAS, E., POZA, J., CIRIZA, J., ZARAGOZA, P., OSTA, R., RODELLAR, C.** 2001. Fundamento de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [En línea] 09 de Septiembre de 2017. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/139/128>
- MATER, M., THELEN, A., PAN, D., JUMP, D.** 1999. Sterol response elementbindingprotein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acidsuppression of hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem*, 274: 32725-32732.
- MATHIS, D.** 2013. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metabol*, 17(6): 851-859.
- MATHIS, D., SHOELSON, S.** 2011. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat. Rev. Immunol*, 11(2): 81.
- MCKENNA, N., O'MALLEY, B.** 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108: 465-474.
- MEJIA, C., DEL-RIO, B., DOMINGUEZ, A., CAMPOS, R., MARTINEZ, M., ROJAS, S., LARA, E., ABARCA, E., MILIAR, A.** 2014. The consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids diferentially modulates gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and hypoxia-inducible factor 1 alpha in subcutaneous adipose tissue of obese adolescents. *Endocrine*, 45: 98-105.
- MENNITTI, L., OLIVEIRA, J., MORAIS, C., ESTADELLA, D., OYAMA, L., OLLERDO NASCIMENTO, CM., PISANI, LP.** 2015. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J. Nutr. Biochem*, 26: 99-111.
- MORGEN, C., SORENSEN, T.** 2014. Obesity, global trends in the prevalence of overweight and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol*, 10: 513-524.
- MORRIS, DH.** 2007. Description and Composition of Flax (Chap. 1). In: *Flax—a health and nutrition primer* (4 ed.). Flax Council of Canada, 9-21.
- NAVARRO, E., SERRANO, G., CASTAÑO, M., SOLERA, J.** 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439: 231-250.

NEIDLER, S. 2017. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR and RT-qPCR?. [En línea] 10 de Octubre de 2018. http://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr/?utm_source=2017-03-31-TN&utm_medium=email&utm_campaign=TechNotes

NIELSEN, R., GRONTVED, L., STUNNENBERG, H., MANDRUP, S. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor subtype α and cell-type-specific activation of genomic target genes upon adenoviral transgene delivery. *Mol. Cell Biol*, 26: 5698-5714.

NOLAN, T., HANDS, R., STEPHEN, A. 2006. Bustin. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3): 1559-1582.

PERONA, J. 2017. Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochim. Biophys Acta*, 1859(9): 1690-1703.

RAKSHANDEHROO, M., KNOCH, B., MULLER, M., KERSTEN, S. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *PPAR Res*, 2010: 1-20.

RAO, X., HUANG, X., ZHOU, Z., LIN, X. 2013. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3): 71-85.

RAO, Y., LOKESH, B. 2016. Down regulation of NF κ B expression by n 3 fatty acid rich linseed oil is modulated by PPAR γ activation, eicosanoid cascade and secretion of cytokines by macrophages in rats fed partially hydrogenated vegetable fat. *Eur. J. Nutr*, 56(3): 1135-1147.

REILLY, J., THOMPSON, M. 2000. Dietary fatty acids up-regulate the expression of UCP2 in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 277: 541-545.

REYNES, B., PALOU, M., PALOU, A. 2017. Gene expression modulation of lipid and central energetic metabolism related genes by high-fat diet intake in the main homeostatic tissues. *Food Funct*, 8: 629-650.

SÁNCHEZ, J. 2010. Participación de la glándula mamaria en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga durante el embarazo y la lactancia: papel de las elongasas y desaturasas. Tesis para optar el grado de Mg Sc. México D.F: Instituto Politécnico Nacional.

SANHUEZA, C., VALENZUELA, B. 2006. Receptores nucleares y regulación de la expresión génica por ácidos grasos poliinsaturados: algo más que producción de energía y esencialidad. *Rev. Chil. Nutr*, 33(2): 150-161.

SARAVANAN, P., DAVIDSON, N., SCHMIDT, E., CALDER, P. 2010. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, 37(9740): 540-550.

SEKIYA, M., YAHAGI, N., MATSUZAKA, T., NAJIMA, Y., NAKAKUKI, M., NAGAI, R., ISHIBASHI, S., OSUGA, J., YAMADA, N., SHIMANO, H. 2003. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*, 38(6): 1529-1539.

SHIMANO, H. 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res*, 40: 439-452.

SHIMANO, H., HORTON, J., SHIMOMURA, I., HAMMER, R., BROWN, M., GOLDSTEIN, J. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest*, 99: 846-854.

SHOELSON, S., LEE, J., ALLISON, B. 2006. Goldfine. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 116: 1793-1801.

SIMOPOULOS, A. 2016. An increase in the ω -6/ ω -3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8 (3): 128.

SINGER, P., SHAPIRO, H., THEILLA, M., ANBAR, R., SINGER, J., COHEN, J. 2008. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med*, 34(9): 1580-1592.

SINGH, S., NAIR, V., JAIN, S., GUPTA, Y. 2008. Evaluation of anti-inflammatory activity of plant lipids containing α -linolenic acid. *Indian J. Exp. Biol*, 46: 453-456.

SUGDEN, M., BULMER, K., GIBBONS, G., KNIGHT, B., HOLNESS, M. 2002. Peroxisome-proliferator-activated receptor- α (PPAR α) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *J. Biochem.*, 364: 361-368.

SUNDARAM, S., BUKOWSKI, M., LIE, W., PICKLO, M., YAN, L. 2015. High Fat Diets Containing Different Amounts of n3 and n6 Polyunsaturated Fatty Acids Modulate Inflammatory Cytokine Production in Mice. *Lipids*, 51(5): 571-582.

TAMAY DE DIOS, L., IBARRA, C., VELASQUILLO, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. [En línea] 10 de Agosto de 2018. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

TCHOUKALOVA, Y., VOTRUBA, S., TCHKONIA, T., GIORGADZE, N., KIRKLAND, J., JENSEN, M. 2010. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 107(42): 18226-18231.

TEMPLE, N. 2018. Fat, Sugar, Whole Grains and Heart Disease: 50 Years of Confusion. *Nutrients*, 10(1): 39.

THERMO FISHER. 2012a. TURBO DNA-freeTMDNase treatment and Removal Reagents User Guide (Pub.N°1907M Rev.G). [En línea] 09 de Febrero de 2018. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1907>

THERMO FISHER. 2016a. Trizol Reagent User Guide-Pub. N° MAN0001271. [En línea] 09 de Febrero de 2018. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

THERMO FISHER. 2016b. PowerUp SYBR Green Master Mix User Guide, Pub. N°MAN0013511. [En línea] 09 de Febrero de 2018. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf

THERNO FISHER. 2012b. DNase Treatment and Removal Reagents.User Guide. Catalog NumberAM 1906. California. US. [En línea] 09 de Febrero de 2018. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1906>

TITOS, E., CLARIA, J. 2013. Omega-3-derived mediators counteract obesity-induced adipose tissue inflammation. *Prostag. Other Lipid Mediat*, 107: 77-84.

TITOS, E., RIUS, B., GONZALEZ, A., LOPEZ, C., MORAN, E., MARTINEZ, M., ARROYO, V., CLARIA, J. 2011. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid

bpromote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J. Immunol*, 187(10): 5408-5418.

VALENZUELA, A., SANHUEZA, J., NIETO, S. 2002. El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Rev. Chil. Nutr*, 29(2): 106-115.

VALENZUELA, R., TAPIA, G., GONZÁLEZ, M., VALENZUELA, A. 2011. Omega-3 fatty acids (EPA and DHA) and its application in diverse clinical situations. *Rev. Chil. Nutr*, 38: 356-367.

VIJAIMOHAN, K., JAINU, M., SABITHA, K., SUBRAMANIAM, S., ANANDHAN, C., SHYAMALA DEVI, CS. 2006. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Science*, 79: 448-454.

WANG, M., ZHANGI, X., FENG, K., HE, C., LI, P., HU, Y., SU, H., WAN, J. 2016. Dietary α -linolenic acid-rich flaxseed oil prevents against alcoholic hepatic steatosis via ameliorating lipid homeostasis at adipose tissue-liver axis in mice. *Sci. Rep*, 6: 26826.

WANG, T., LIU, M., PORTINCASA, P., WANG, D. 2013. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Investing*, 43: 1203-1223.

WANG, W., CHEN, K., XU, C. 2006. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. *Anal. Biochem*, 356(2): 303-305.

XU, E., LAMBERT, M., MONTANA, V., PARKS, D., BLANCHARD, S., BROWN, P., STERMBACH, D., LEHMAN, J., WISELY, G., WILSON, T., KMIEWER, S., MIBURN, M. 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxysome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell*, 3: 397-403.

XU, J., TERAN, M., PARK, J., NAKAMURA, M., CLARKE, S. 2001. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element- binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J. Biol. Chem*, 276: 9800-9807.

YAHAGI, N., SHIMANO, H., HASTY, A., AMEMIYA-KUDO, M., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., LIZUKA, Y., SHIONOIRI, F., OHASHI, K., OSUGA, J., HARADA, K., GOTODA, T., NAGAI, R., ISHIBASHI, S., YAMADA, N. 1999. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem*, 274: 35840-35844.

YAHAGI, N., SHIMANO, H., HASTY, A., MATSUZAKA, T., IDE, T., YOSHIKAWA, T., AMEMIYA-KUDO, M., TOMITA, S., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., LIZUKA, Y., OHASHI, K., OSUGA, J., HARADA, K., GOTODA, T., NAGAI, R., ISHIBASHI, S., YAMADA, N. 2002. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *J. Biol. Chem*, 277: 19353-19357.

YAN, Y., JIANG, W., SPINETTI, T., TARDIVEL, A., CASTILLO, R., BOURQUIN, C., GUARDA, G., TIAN, Z., TSCHOPP, J., ZHOU, R. 2013. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*, 38(6): 1154-1163.

YOSHIKAWA, T., SHIMANO, H., YAHAGI, N., IDE, T., AMEMIYA-KUDO, M., MATSUZAKA, T., NAKAKUKI, M., TOMITA, S., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., LIZUKA, Y., OHASHI, K., TAKAHASHI, A., SONE, H., OSUGA, J., GOTODA, T., ISHIBASHI, S., YAMADA, N. 2002. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem*, 277: 1705-1711.

YU, X., TANG, Y., LIU, P., XIAO, L., LIU, L., SHEN, R., DENG, Q., YAO, P. 2017. Flaxseed Oil Alleviates Chronic HFD-Induced Insulin Resistance through Remodeling Lipid Homeostasis in Obese Adipose Tissue. *J. Agric. Food Chem*, 65(44): 9635-9646.

ZIELENIAK, A., WOJCIK, M., WOZNIAK, L. 2008. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 56: 331-345.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Informe de ensayo de aceite de linaza

Informe de Ensayo N° 128165

DATOS DEL CLIENTE

Solicitante	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Domicilio legal	AV. LA MOLINA NRO. SN LA MOLINA LA MOLINA
Contacto	Srta.Lizbeth Hidalgo
Dirección de entrega	AV. LA MOLINA NRO. SN LA MOLINA LA MOLINA

DATOS DEL PRODUCTO

Producto	ACEITE DE LINAZA		
Ensayos realizados en	Av. La Marina 3035 San Miguel - Lima		
Fecha de recepción	2017.05.13	Fecha de inicio de análisis	2017.05.13
Referencia	COT 70198	Fecha de término de análisis	2017.05.19
Procedencia	Muestra proporcionada por el Cliente		
Custodia dirimencia	No aplica por ser muestra única		

DATOS DE LA MUESTRA: M - 185924

Identificación	Cantidad	Descripción / Presentación	Precinto	FV	FP
LOTE: 1112416	250ml aprox.	01 frasco de vidrio ambar, cerrado e identificado	--	2018.06.15	--

DATOS DEL SERVICIO

Identificación	Análisis	Unidad	Resultado
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Caproico C6:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Caprílico C8:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Capríco C10:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Undecanoico C11:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Laurico C12:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Tridecanoico C13:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Mirístico C14:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Miristoleico C14:1	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)-Ácido Pentadecanoico C15:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Pentadecenoico (Cis 10) C15:1	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Palmítico C16:0	%	4.94
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Palmítoleico C16:1	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)-Ácido Heptadecanoico C17:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)-Ácido Heptadecenoico C17:1	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Estearico C18:0	%	3.32
LOTE: 1112416	Petroseláidico C18:1n6t	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácido Eláidico C18:1n9t	%	<0.1
LOTE: 1112416	Vaccénico C18:1n11t	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Oleico (Omega 9) C18:1 n9c	%	17.84
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)-Ácido Octadecadienoico C18:2n6t	%	<0.1
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Linoleico (Omega 6) C:18:2n6c	%	13.73
LOTE: 1112416	Ácidos Grasos (Composición)- Ácido Araquídico C20:0	%	0.13

Informe de Ensayo N° 128165

Identificación	Análisis	Unidad	Resultado
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Gamma Linolenico (Omega 6) C18:3n6	%	0.2
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Eicosenoico (Cis 11) C20:1n9	%	0.14
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Linolenico (Omega 3) C18:3n3	%	56.85
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición) Acido Heneicosanoico C21:0	%	0.6
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Eicosadienoico C20:2	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Behenico C22:0	%	0.13
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Eicosatrienoico (Omega 6) C20:3	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Erucico C22:1	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Eicosatrienoico (Omega 3) C20:3	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Araquidónico C20:4	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Tricosanoico C23:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Docosadienoico C22:2	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Lignocérico C24:0	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Eicosapentanoico (Omega 3) C20:5 EPA	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Nervónico C24:1	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Acido Docosahexanoico (Omega 3) C22:6 DHA	%	<0.1
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Saturado	%	9.12
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Monoinsaturado	%	17.98
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)- Poliinsaturado	%	70.89
LOTE: 1112416	Acidos Grasos (Composición)-No identificados	%	2.01

Métodos

Acidos Grasos (Composición): ISO 12966-1:2014 Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids

El muestreo no es parte del alcance de la acreditación del laboratorio de ensayo de NSF INASSA SAC.

NSF INASSA S.A.C

Emma Aguinaga Maica
Gerente Senior de Laboratorios
C.I.P. N° 29217

Anexo 2. Extracción de ARN desde tejido

Preparación de la muestra y separación de las fases

1. Añadir 1mL de TRIzol por cada 50-100 mg de tejido
2. Homogenizar la muestra utilizando un homogeneizador de teflón o vidrio, utilizar pulsos de 30s y dejar descansar la muestra en hielo.
3. Posterior a la homogenización, centrifugar a 12000g por 5 minutos a 4°C.
4. Remover cualquier fase de ácidos grasos. Transferir el sobrenadante a nuevo tubo.
5. Incubar el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas.
6. Añadir 0.2 ml de cloroformo por cada 1ml utilizado de TRIzol, cerrar el tubo.
7. Agite vigorosamente con la mano durante 15 segundos.
8. Incubar por 2-3 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 12000g por 15 minutos a 4°C

La mezcla se separa en una fase orgánica de color rojo, una interfase, y una fase acuosa incolora. El RNA permanece en la fase acuosa.

10. Transferir la fase acuosa que contiene el ARN a un nuevo tubo
11. Transferir la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo nuevo inclinado a 45°C pipeteando la solución.

Precipitación de RNA

1. Añadir 0.5 ml de isopropanol (por cada 1 ml de TRIzol utilizado) a la fase acuosa.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Centrifugar 12000g por 10 minutos a 4°C.

El precipitado total de ARN forma un gránulo blanco similar al gel en el fondo del tubo.

4. Deseche el sobrenadante con una micropipeta

Lavado de RNA

1. Lavar el pellet con 1 ml de etanol 75%, por cada ml de TRIzol usado.

El RNA puede ser almacenado en etanol 75% hasta 1 año a -20°C o una semana a 4°C .

2. Mediante uso del vórtex, agitar la muestra y centrifugar a 7500g durante 5 minutos a 4°C .

3. Desechar el sobrenadante con una micropipeta.

4. Dejar secar el pellet de ARN durante 5-10 minutos.

Resuspensión RNA

1. Re suspender el pellet en agua libre de nucleasas (20-50 μl).

2. Incubar en baño seco a $55-60^{\circ}\text{C}$ por 10-15 min.

3. Guardar a -70°C .

Anexo 3. Limpieza del ARN

El tamaño de reacción recomendado es 10-100µl. Una reacción típica es 50µl. A continuación se muestra la tabla donde los reactivos se proporcionan para 50 tratamientos TURBO DNA-free™ (hasta 100µl cada uno):

Cantidad	Componente	Almacenamiento
120µl	TURBO DNase (2units/µl)	
600µl	10X TURBO DNase Buffer	-20°C
600µl	DNase Inactivation Reagent	
1.75ml	Nuclease-free wáter	Anytemperature †

†Almacene agua sin nucleasas a -20°C, 4°C o temperatura ambiente

Añadir reactivos de digestión de DNasa

1. Añadir 0.1 volumen 10×TURBO DNasa Buffer y 1 µl TURBO DNase al RNA, y mezclar suavemente. Usar 1 µl de TURBO™ DNasa (2U) para obtener hasta 10 µg de ARN en una reacción de 50 µl.

2. Incubar a 37 ° C durante 20-30 min.

3. Agregar a la resuspensión 5µl DNase Inactivation Reagent y mezcle bien antes de dispensarlo.

4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente, mezclando de vez en cuando. Mueva el tubo 2-3 veces durante el período de incubación para redispersar el DNase Inactivation Reagent.

Si la temperatura ambiente se enfría por debajo de 22-26 ° C, mueva los tubos a un bloque de calor u horno para controlar la temperatura. Los ambientes fríos pueden reducir la inactivación de la TURBO DNasa, dejando DNasa residual en la muestra de ARN.

5. Centrifugar a 2.000 × g durante 5 min y transferir el ARN a un tubo nuevo. Hacer un recorrido del tubo 2-3 veces durante el período de incubación para redispersar el DNase Inactivation Reagent.

Anexo 4. Retrotranscripción para síntesis de ADNc.

El siguiente procedimiento se basa en el protocolo de Applied Biosystems.

Preparación de 2X RT Master Mix

Para preparar la 2× RT master mix (por 20 µl de reacción): Usar hasta 2 µg de ARN total (50ng) por reacción de 20 µl.

1. Permitir que los componentes del kit se descongelen en el hielo
2. Con referencia a la tabla a continuación, calcular el volumen de componentes necesarios para preparar el número requerido de reacciones. Preparar el RT master mix en hielo.

Componentes	Volumen/Reacción (µl) Kit con inhibidor de RNasa
10X RT Buffer	2.0
25X dNTPMix (100mM)	0.8
10X RT Random Promers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
RNaseinhibitor	1.0
Nuclease-free H ₂ O	3.2
Total por reacción	10.0

Incluya reacciones adicionales en los cálculos para proporcionar un volumen excesivo de la pérdida que ocurre durante las transferencias de reactivos.

3. Coloque el 2× RT Master Mix en hielo y mezcle suavemente.

Preparar las reacciones de transcripción inversa de cDNA

1. Pipetear 10 µl de 2× RT Master Mix en cada pocillo de una placa de reacción de 96 pocillos o tubo individual.
2. Pipetear 10 µl de muestra de ARN en cada pocillo, pipeteando hacia arriba y hacia abajo dos veces para mezclar.
3. Sellar las placas o tubos.

4. Centrifugar brevemente la placa o los tubos para reducir el contenido y eliminar las burbujas de aire.

5. Coloque la placa o tubos en hielo hasta que esté listo para cargar el termociclador

Realizar la transcripción inversa

1. Programar las condiciones del termociclador. Estas condiciones están optimizadas para su uso con los kits de High Capacity cDNA reverse transcription.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

2. Ajustar el volumen de reacción a 20 µl.

3. Cargar las reacciones en el termociclador.

4. Comenzar la ejecución de transcripción inversa.

Almacenamiento de reacciones de transcripción inversa de cDNA

Puede almacenar placas o tubos RT de cDNA preparados utilizando los kits de High Capacity cDNA reverse transcription para almacenamiento a corto o largo plazo.

Duración de almacenamiento	Temperatura de almacenamiento (°C)
Corto plazo (hasta 24 horas antes del uso) ‡	2 a 6
A largo plazo	-15 a -25

‡ Para un almacenamiento prolongado a una temperatura de 2 a 6 ° C, agregue EDTA a una concentración final de 1 mM para quelar los cationes y evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

Si es necesario, centrifugue brevemente los platos o tubos de archivo antes de guardarlos para eliminar los contenidos y eliminar las burbujas de aire.

Anexo 5. PCR en tiempo real

Configure las reacciones de PCR

1. Preparar la cantidad adecuada de reacciones, más 10% de excedente.

Componentes	Volumen (10µl/well)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)	5µl
Forward and reverse primers ^[1]	Variable
DNA template + Nuclease- Free Water ^[2]	Variable
Total	10µl

^[1] Para un rendimiento óptimo en los modos rápido y estándar, usar 300-800nM para cada primer.

^[2] Use 1-10 ng cDNA o 10-100 ng DNA para cada reacción.

2. Mezcle bien los componentes, luego centrifugue brevemente para eliminar los contenidos y elimine las burbujas de aire.

3. Transfiera el volumen apropiado de cada reacción a cada pocillo de una placa óptica.

4. Selle la placa con una cubierta adhesiva óptica, luego centrifugue brevemente para eliminar los contenidos y elimine las burbujas de aire.

Configurar y ejecutar el instrumento de PCR en tiempo real

1. Coloque la placa de reacción en el instrumento de PCR en tiempo real.

2. Establezca las condiciones de ciclo térmico utilizando las condiciones de ciclo térmico de PCR predeterminada especificada en la siguiente tabla:

Modo de ciclo estándar (primer $T_m < 60^\circ\text{C}$)

Step	Temperatura	Duración	Ciclos
UDG activation	50°C	2 minutos	Hold
Dual-Lock™ DNA polymerase	95°C	2 minutos	Hold
Denature	95°C	15 segundos	
Anneal	55-60°C ^[1]	15 segundos	40
Extend	72°C	1 minuto	

[1]La temperatura de Anneal debe establecerse en el punto de fusión de los primers.

3. Configure el instrumento para realizar un paso de disociación predeterminado.

Condiciones de la curva de disociación (etapa de la curva de fusión)

Step	Ramprate	Temperatura	Tiempo
1	1.6°C/segundo	95°C	15 segundos
2	1.6°C/segundo	60°C	1 minuto
3 ^[1]	0.15°C/segundo	95°C	15 segundos

[1]Disociación

Use los siguientes ajustes para los instrumentos de Applied Biosystems™:

- Tipo de experimento: curva estándar
- Reactivo: reactivos SYBR™ Green
- Reportero: SYBR™
- Quencher: ninguno
- Tinte pasivo de referencia: ROX™
- Velocidad de rampa: Estándar o rápido (elija la misma secuencia que en el paso 2)
- Incremento de la rampa de la curva de fusión: continuo

4. Configure el volumen de reacción apropiado para el tipo de placa que se usa para su reacción de PCR.

5. Pulsar start para comenzar la corrida.