



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

SEDE SUR

Departamento de Farmacobiología

**“Efecto del ejercicio sobre el patrón de metilación del gen Lep en un
modelo de obesidad con dieta alta en grasa”**

Tesis que presenta

Biól. Viridiana García Luna

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de tesis

Dra. Guadalupe Bravo

Dra. Fengyang Huang

Ciudad de México

Agosto 2019

Este trabajo se realizó en el laboratorio 3 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Unidad Coapa, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Bravo y en el laboratorio de Investigación en Farmacología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, bajo la dirección de la Dra. Fengyang Huang. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para estudiantes de Maestría. Núm. De becario: 615732.

Dedicatoria

A mis padres Rocío Luna y Jorge García, por siempre apoyarme en cada decisión y alentarme a cumplir mis metas.

A mis hermanas por escucharme y estar a mi lado en los momentos más felices y en los complicados.

Agradecimientos académicos

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Coapa, Departamento de Farmacobiología por permitirme realizar mis estudios de maestría y brindarme nuevo y valioso conocimiento para mi formación, y por el apoyo otorgado para asistir al congreso ObesityWeek 2018.

Al Hospital Infantil de México “Federico Gómez” donde se me permitió realizar gran parte del desarrollo experimental de mi trabajo de tesis.

A mis directoras de tesis, la Dra. Guadalupe Bravo y la Dra Fengyang Huang por aceptarme y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, comentarios, consejos y apoyo durante el proceso de maestría.

A mis sinodales, la Dra. Luisa Rocha, por sus consejos y observaciones durante cada avance y enriquecer mi trabajo de tesis, y al Dr. Bladimir Roque, por sus asesorías durante mi trabajo experimental y sus aportaciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Agradecimientos personales

A mis compañeros y amigos del laboratorio 3: Armando, Heriberto y Valentín, y del HIM: Mara, Lalo, Daniel, Fernando y Karlita. En especial al Maestro en Ciencias David Arias por su apoyo en los momentos difíciles y siempre hacer más agradable el trabajo y al I.B.Q. Patrick Mailloux por su apoyo en el desarrollo del proyecto.

Índice

Índice de figuras.....	7
Índice de cuadros.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	2
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Obesidad.....	11
1.1.1 Diagnóstico.....	13
1.1.2 Prevalencia	15
1.2 Tejido Adiposo	16
1.3 Leptina, adiponectina e insulina y sus alteraciones durante la obesidad	23
1.3.1 Leptina	23
1.3.2 Adiponectina	30
1.3.3 Insulina.....	32
1.4 Etiología de la obesidad	34
1.4.1 Factores ambientales y genéticos	34
1.5 Epigenética.....	36
1.5.1 La epigenética como factor en el desarrollo de obesidad	40
1.5.2 Metilación del DNA.....	41
1.6 Metilación del gen Lep	44
1.7 Ejercicio	45
1.7.1 Clasificación de ejercicio	46
1.7.2 Ejercicio y TAB.....	48
1.7.3 Obesidad y ejercicio.....	49
1.7.4 Ejercicio y metilación del DNA	51
1.7.5 Ejercicio y cambios en la metilación del DNA de genes del TA.	52
2. JUSTIFICACIÓN	53
3. HIPÓTESIS	53
4. OBJETIVO GENERAL	53
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53

6.	MATERIALES Y MÉTODO	54
6.1	Animales de experimentación	54
6.2	Régimen de ejercicio	55
6.3	Obtención de muestras	55
6.3.1	Determinación del perfil bioquímico	56
6.3.2	Cuantificación de leptina, insulina o adiponectina.....	58
6.3.3	Análisis de metilación del gen Lep	60
6.4	Análisis estadístico	69
7.	RESULTADOS.....	71
7.1	Peso corporal	71
7.2	Peso relativo (tejido adiposo retroperitoneal /Peso corporal) (TAR/PC)	72
7.3	Colesterol	73
7.4	Triglicéridos	74
7.5	Glucosa.....	75
7.6	Insulina.....	76
7.7	Índice HOMA-RI.....	77
7.8	Adiponectina.....	78
7.9	Leptina	79
7.10	Metilación del gen Lep.....	80
	Correlación.	82
8.	DISCUSIÓN.....	85
9.	CONCLUSIONES	93
10.	Perspectivas	93
	Referencias.....	96

Índice de Figuras

Figura 1.1. Tipos de Tejido adiposo	17
Figura 1.2. Diferencias en la colocalización de UCP1 y CO1	18
Figura 1.3 Tipos celulares en el TAB	22
Figura 1.4 Vía de señalización JAK/STAT mediada por leptina	26
Figura 1.5 Secreción de leptina mediada por la insulina	28
Figura 1.6. Mecanismos de acción de adiponectina	31
Figura 1.7 Homeostasis de glucosa.....	33
Figura 1.7 Principales mecanismos de regulación epigenética.	37
Figura 1.8 Acetilación y deacetilación de histonas.....	38
Figura 1.9 Interacción entre los mecanismos epigenéticos	39
Figura 1.10 Metilación del DNA	43
Figura 1.11 Liberación de miocinas mediada por el ejercicio	48
Figura 1.12 Efecto del ejercicio sobre la secreción de adipocinas	51
Figura 6.1 Gen <i>Lep Rattus norvegicus</i>	61
Figura 6.2 Sulfonación, desaminación y desulfonación de la citosina	64
Figura 6.3 PCR metilación específica (MSP).....	66
Figura 6.4 Resultados de electroforesis probables con la técnica de MSP	69
Figura 7.1 Peso corporal	71
Figura 7.2 Peso relativo TAR/PC	72
Figura 7.3 Cuantificación de colesterol total.....	73
Figura 7.4 Cuantificación de triglicéridos.....	74
Figura 7.5 Cuantificación de glucosa.....	75
Figura 7.6 Concentración de Insulina	77
Figura 7.7 Evaluación de la resistencia a la insulina	78
Figura 7.8 Concentración de Adiponectina.....	79

Figura 7.9 Concentración de Leptina.....	80
Figura 7.10 Metilación del gen Lep.....	82
Figura 7.11 Porcentaje de Metilación.	82
Figura 7.12 Cambio en concentración de leptina y su correlación con porcentaje de metilación	84
Figura 7.13 Cambio en el peso relativo y su correlación con la concentración de leptina ..	85
Figura 7.14 Cambio en el peso relativo y su correlación con la concentración de leptina ..	86

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1 Disfunción global ocasionada por el incremento de la masa grasa.	13
Cuadro 1.2 Clasificación de peso corporal de acuerdo con la OMS	14
Cuadro 1.3 Valores de CC e ICC.....	15
Cuadro 1.4 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en México.....	16
Cuadro 6.1 Grupos experimentales.....	55
Cuadro 6.2. Estructura del ejercicio aeróbico moderado.	56
Cuadro 6.3 Obención de Muestras.....	56
Cuadro 6.4 Secuencia de los primer metilados (M) y no metilados (U).....	62
Cuadro 6.5 Tiempo y temperatura para la conversión con bisulfito.....	65
Cuadro 6.6 Volumen y concentración utilizados para MSP del gen Lep	67
Cuadro 6.7 Condiciones de la MSP para el gen Lep	68

Resumen

La obesidad es una enfermedad de origen multifactorial que se caracteriza por un incremento en la masa grasa que es perjudicial para la salud. Dentro de la etiología de este padecimiento están los factores ambientales, genéticos y epigenéticos; estos últimos se refieren a cambios en la expresión de genes sin que haya cambios en la secuencia de DNA. La metilación del DNA se encuentra asociada con la represión y silenciamiento del gen cuando la región promotora del gen está metilada y con la expresión cuando no está metilada. El gen de leptina (Lep) presenta un porcentaje de metilación menor en el tejido adiposo con respecto a otros tejidos que no lo expresan, como es el cerebro, el hígado y el riñón. Se sabe que en la obesidad el RNAm y la concentración de leptina aumentan, pero aún no está completamente claro cómo es afectado el patrón de metilación en esta condición. Por otro lado, no se ha reportado si el ejercicio puede cambiar el patrón de metilación del gen Lep, asociado a la disminución en la liberación de la leptina. Por esto, el objetivo de este trabajo es investigar si después de un mes de ejercicio aeróbico, el patrón de metilación del gen Lep incrementa en un modelo animal de obesidad con dieta alta en grasa. Para esto se utilizaron ratas Wistar macho de 20 semanas de edad, las cuales fueron divididas en cuatro grupos: control-sedentario (C-S), control- ejercicio (C-E), obeso- sedentario (Ob-S) y obeso- ejercicio (Ob-E). Los grupos obesos recibieron una dieta alta en grasa durante tres meses, y los controles consumieron dieta estándar. A los dos meses, después de iniciar la dieta, los grupos de ejercicio (C-E y Ob-E), realizaron actividad física aeróbica en una caminadora. Se obtuvieron muestras sanguíneas para evaluar los cambios en el perfil bioquímico y concentración de leptina, insulina y adiponectina en suero al final del mes de ejercicio. Al término de los tres meses, los animales fueron sacrificados; se obtuvo el tejido adiposo retroperitoneal y el cerebro para la evaluación del patrón de metilación del gen Lep, utilizando al cerebro como órgano control. El incremento de peso corporal, el peso relativo (TAR/PC) y alteraciones ocasionadas por la obesidad, como el incremento de triglicéridos, leptina, insulina y adiponectina después del ejercicio disminuyeron de forma significativa, pero con respecto al patrón de metilación los resultados son controversiales. Esto nos lleva a sugerir otro método y ampliar la región de análisis de metilación.

Abstract

Obesity is a multifactorial disease, which is characterized by an increase in fat mass, that it's detrimental to health. Within the etiology of this ailment there are environmental, genetic and epigenetic factors; the latter it's refer to changes in gene expression without changes in DNA sequence. DNA methylation is one of the most studied mechanisms. Generally, when the promoter region is methylated it's associated with silencing and gene repression, while, if this region is unmethylated it's associated with gene expression. The leptin gene has a lower methylation pattern in adipose tissue with respect to other tissues that do not express it, like brain, liver and kidney. It is known that leptin mRNA expression and leptin in serum are increased during obesity, but it's not clear if the methylation pattern is affected in this condition. On the other hand, it is not known if exercise can change the methylation pattern in Lep gen associated to the reduction of leptin release. So, the aim of this work is to know if the methylation pattern of Lep gene increase after a month of aerobic exercise in an obesity model. For this, Wistar male rats of 20 weeks of age were divided into four groups: sedentary- control (C-S), exercise- control (C-E), sedentary- obese (Ob-S) and exercise- obese (Ob-E). The obese groups received a high-fat diet for three months, and the controls consumed standard diet, during the last month of diet the exercise groups performed aerobic physical activity on a treadmill. Different blood samples were obtained to evaluate the changes in biochemical profile and the concentration of leptin, insulin and adiponectin in serum. Finally, the animals were killed and the retroperitoneal adipose tissue and the brain were obtained to the evaluation of the methylation pattern of the Lep gene. A month of aerobic exercise was enough to decrease body weight and reverse some of the alterations caused by obesity, such as the increase in triglycerides, leptin, insulin and adiponectin in serum. However, the methylation pattern didn't have significant differences between the groups. This leads us to suggest another method and increase the methylation analysis region.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad

La obesidad es un problema de salud pública a nivel mundial; con alteraciones sociales y psicológicas, que ha incrementado tanto en la población adulta como en la infantil en los últimos años. Además, es uno de los factores determinantes en el desarrollo de enfermedades crónicas no contagiosas con un alto índice de mortalidad en países desarrollados y en desarrollo (Ardengui, *et al*, 2015).

De acuerdo con la Sociedad Americana de Médicos Bariátricos la obesidad está definida como una enfermedad neuroconductual, crónica, reincidente, en la que un aumento en la grasa corporal promueve la disfunción del tejido adiposo (TA), resultando en alteraciones adversas tanto metabólicas, biomecánicas y psicosociales. (Bays y Scinta, 2015).

Este incremento en el volumen del TA ocasiona cambios a nivel anatómico, inmunológico, histológico y endocrinológico (Cuadro 1.1). Dentro de estas alteraciones asociadas con la obesidad, se encuentra el desbalance en la secreción de las adipocinas pro y anti-inflamatorias, inflamación crónica, disfunción del TA, entre otras; alterando de forma sistémica el metabolismo energético y llevando a diferentes comorbilidades como, resistencia a la insulina (RI), osteoartritis, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial (HA), enfermedades cardiovasculares (ECV) y cáncer (Ouchi, *et al*. 2011; Qasim, *et al*. 2017).

Anatómicos
<ul style="list-style-type: none"> • Hiperplasia: aumento del número de adipocitos regulado por proteínas intracelulares como la proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroles (SREBP1 del inglés <i>Sterol regulatory element binding protein 1</i>), el receptor y activado por proliferador de peroxisoma (PPAR y del inglés <i>peroxisome-proliferator-activated receptor</i> γ) y las proteínas de unión al enhancer-CCAAT (C/EBPs del inglés <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>). • Adipogénesis en el tejido adiposo subcutáneo: el almacenamiento inadecuado del exceso de energía puede ocasionar; mayor flujo de ácidos grasos libres (AGL) al torrente sanguíneo, aumento en el tamaño del adipocito (hipertrofia), acumulación de tejido adiposo visceral, subcutáneo abdominal, pericárdico y perivascular. • Lipotoxicidad: hígado, páncreas, músculo, corazón y riñón.
Inmunológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de factores pro-inflamatorios y disminución de los anti-inflamatorios
Histológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Hipoxia: incremento del tejido adiposo más allá del suministro vascular, angiogénesis inadecuada y deterioro en el flujo sanguíneo. • Elevación de la tasa de apoptosis de adipocitos. • Aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) • Anormalidades de la matriz extracelular y disfunción de la mitocondria y retículo endoplásmico (RE) • Cambios en la red neural e inervaciones del tejido adiposo.
Endocrinológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Disfunción en los procesos involucrados en la angiogénesis, adipogénesis, disolución y reformación de la matriz extracelular, lipogénesis, producción del factor de crecimiento, metabolismo de glucosa, lípidos y esteroides, producción de factores asociados con el sistema renina-angiotensina, de enzimas y hormonas, hemostasia, respuesta inmune y receptores asociados al TA.

Cuadro 1.1 Disfunción ocasionada por el incremento de la masa grasa. Tomado y modificado de (Bays y Scinta, 2015).

Debido a las alteraciones ocasionadas por la obesidad, es de gran importancia tener métodos de diagnóstico que permitan evaluar el avance de esta enfermedad, así como para el registro de su prevalencia.

1.1.1 Diagnóstico

Existen diferentes métodos de diagnóstico que se basan en el análisis indirecto de la composición corporal como la tomografía axial computarizada, la absorciometría dual de rayos X, la bioimpedancia y la resonancia magnética nuclear (Costa, *et al*, 2015). Sin embargo, debido a su alto costo, en la clínica se utilizan métodos antropométricos (IMC, CC, ICC) para determinar el grado de obesidad y el riesgo a desarrollar alguna alteración relacionada con ésta.

1.1.1.1 Índice de Masa Corporal (IMC)

El IMC es la medición cuantitativa indirecta de grasa corporal más utilizada para diagnosticar obesidad. Se toma en cuenta el peso corporal en kilogramos (Kg) de los individuos y su estatura en metros cuadrados (m^2) (Cuadro 1.2), (Sharma y Kushner, 2009). Este método fue desarrollado por Adolphe Quetelet en el siglo XIX y se utiliza para correlacionar el riesgo a desarrollar problemas de salud con el peso corporal a nivel poblacional; sin embargo, debido a que únicamente toma en cuenta el peso y la estatura del individuo, puede llegar a sobreestimar o subestimar los valores de adiposidad. Entre los parámetros que no toma en cuenta y son importantes porque se asocian a cambios en los niveles de adiposidad son: edad, actividad física y género (WHO, 2018). Así mismo, se recomienda evaluar otros factores de riesgo asociados a la obesidad como incremento en la presión arterial (PA), la inactividad física y la circunferencia de cintura (CC).

Estatus de peso

$$IMC = \frac{Kg}{m^2}$$

<i>Bajo peso</i>	<18.5
<i>Normopeso</i>	18.5-24.9
<i>Sobrepeso</i>	≥25
<i>Preobeso</i>	25-29
<i>Obeso clase I</i>	30-34.9
<i>Obeso clase II</i>	35-39.9
<i>Obeso clase III</i>	≥40

Cuadro 1.2 Clasificación del IMC. Tomado de Sharma y Kushner, 2009

1.1.1.2 *Circunferencia de Cintura (CC) e Índice Cintura Cadera (ICC)*

Las medidas de **CC** y el **ICC** surgieron para evaluar la grasa visceral y corporal, ya que el incremento de ésta se encuentra altamente asociado con el riesgo a desarrollar alguna de las comorbilidades, como la dislipidemia, y RI. Se ha determinado que una CC ≥ a 102 cm en hombres y ≥ a 88 cm en mujeres (Cuadro 1.3), tiene cinco veces mayor probabilidad de presentar alguna comorbilidad. Aunque no hay un método universal para la medición de la CC, se recomienda que sea en el borde superior de la cresta iliaca y por debajo de la última costilla inferior. Con respecto a la medición ICC se adiciona la medida de la circunferencia de cadera que se realiza en la zona más amplia de ésta; dividiendo el valor de la cintura entre el de la cadera (Cuadro 1.3) (Mackinney, 2013; Perona, *et al*, 2017).

Riesgo	CC	ICC
Hombres	≥ 102 cm	>.94
Mujeres	≥ 88 cm	>.85

Cuadro 1.3 Valores de CC e ICC que indican mayor riesgo a desarrollar comorbilidades asociadas a la obesidad.

A pesar de que estas medidas antropométricas correlacionan con el incremento de adiposidad, el riesgo a presentar una cormobilidad y alteraciones en el perfil bioquímico hace necesario determinar el estado metabólico de los individuos, por lo que se sugiere valorar: presión arterial, glucosa en ayuno, cuantificación de lípidos en suero, enzimas secretadas por el hígado, entre otros, (Sharma y Kushner, 2009) y de esta forma precisar el grado de afectación por el aumento de la masa grasa.

1.1.2 Prevalencia

En el mundo, el sobrepeso y obesidad se han convertido en un grave problema de salud. De acuerdo con un análisis de prevalencia de estas dos condiciones realizado por la OMS en 2018, se calculó que 1.9 billones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso y de éstos, más de 650 millones padecían obesidad, lo que representa el 39% y 14% de la población, respectivamente. En la población infantil de 5 a 19 años el porcentaje de obesidad y sobrepeso incrementó del 4% en 1975 al 18% en 2016, lo que refleja que, en ese año, 124 millones de niños y adolescentes padecían alguna de las dos alteraciones y en cuanto a los infantes menores de 5 años, se estimó que 41 millones tenían sobrepeso u obesidad. (WHO, 2018). En algunos países como Estados Unidos de América se ha incrementado la prevalencia de obesidad mórbida. Lo cual reduce la expectativa de vida de 6 a 14 años (Qasim, *et al.* 2017). Según este incremento en los últimos años y el pronóstico si las tendencias actuales continúan, más del 58% de la población mundial tendrá sobrepeso u obesidad (Ardenghi, *et al*, 2018).

Con respecto a México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2016) siete de cada 10 adultos mayores a 20 años, 4 de cada 10 adolescentes de entre 12 y 19 años y 3 de cada 10 niños de entre 5 y 11 años

padecen sobrepeso u obesidad. (Cuadro 1.4). Lo que representa que nuestro país ocupa el segundo lugar en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil.

	SOBREPESO (%)	OBESIDAD (%)
NIÑOS	17.9	15.3
ADOLESCENTES	22.4	13.9
ADULTOS	39.2	33.3

Cuadro 1.4 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en México, donde se muestra el porcentaje de sobrepeso y obesidad en niños, adolescentes y adultos (ENSANUT, 2016).

Para la evaluación del estado metabólico de la obesidad se han estudiado diversas moléculas secretadas por el TA u otros tejidos, que se modifican por acumulo excesivo de grasa.

1.2 Tejido Adiposo

El TA almacena energía en forma de triglicéridos, actúa como órgano endocrino y se clasifica en tres tipos: tejido adiposo marrón (TAM), beige (TABe) y blanco (TAB), que se diferencian en su función, histología, morfología, localización y origen (Figura 1.1).

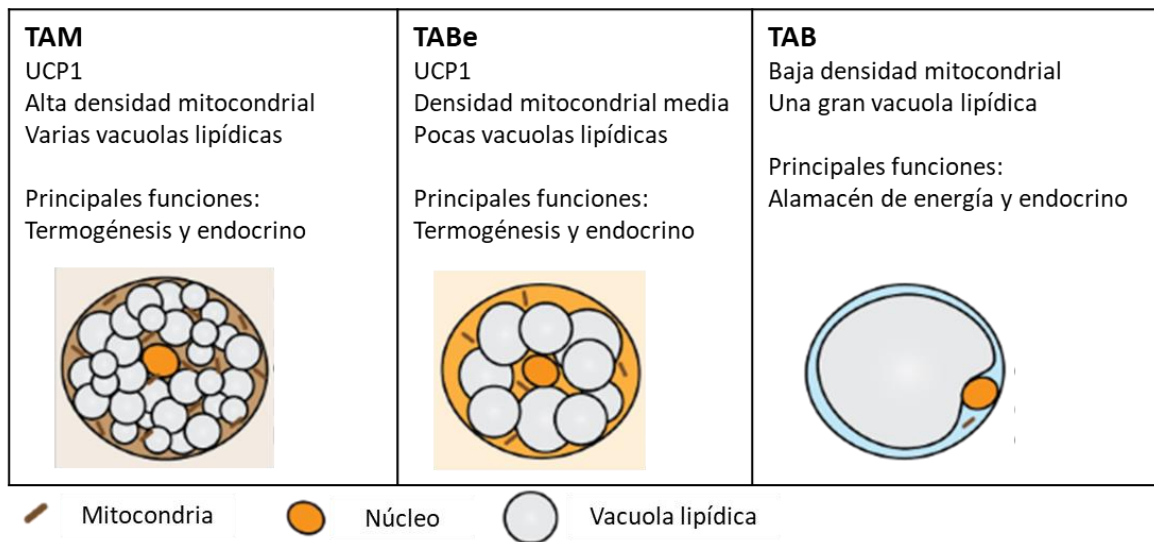


Figura 1.1. Tipos de Tejido adiposo. TAM (tejido adiposo marrón), TABe (tejido adiposo beige) y TAB (tejido adiposo blanco).

El TAM se encuentra ampliamente distribuido en mamíferos, su principal función es la termorregulación del cuerpo a través de transformar lípidos y glucosa en calor. En el caso de los humanos este tejido disminuye con la edad y queda restringido a ciertas regiones: cervical, supraclavicular, axilar, paravertebral, en el mediastino y la región superior abdominal. (Saely, *et al*, 2010). Virtanen y cols. en 2009 determinaron que en la región supraclavicular de sujetos adultos sanos expuestos al frío había depósitos de TAM al encontrar los marcadores moleculares como la proteína desacoplante 1 (UCP1 del inglés *Uncoupling Protein 1*), DIO2, PGC1 α , PRDM16, y ADRB3, así como la colocalización de UCP1 en la membrana mitocondrial de los adipocitos del TAM y no en el TAB. (Figura 1.2)

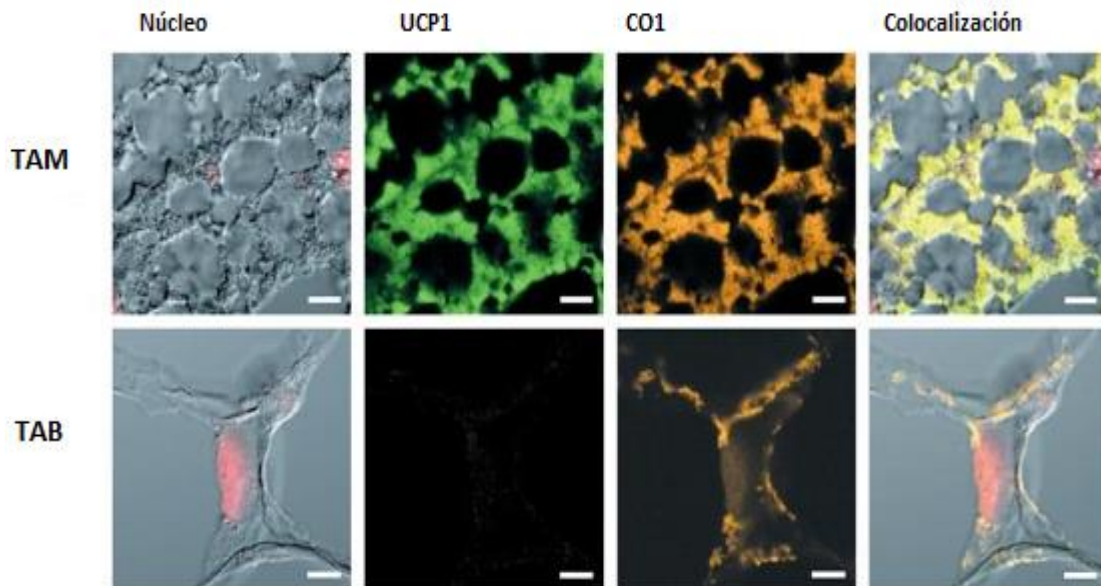


Figura 1.2. Diferencias en la colocalización de UCP1 y CO1 (Citocromo Oxidasa 1) en la mitocondria del TAM y TAB. Tomado de Virtanen, *et al.*, 2009.

En los adipocitos del TAM los triglicéridos son almacenados en pequeñas vacuolas poligonales de tamaño variable, posee múltiples mitocondrias que le confieren una mayor demanda de O_2 y se encuentra muy vascularizado; la vascularización y el alto contenido de citocromo C en las mitocondrias le confieren el color marrón característico. Las mitocondrias en los eucariontes almacenan energía como un gradiente de protones a través del interior de la membrana mitocondrial; cuando los protones fluyen a través del gradiente de concentración la energía es utilizada para sintetizar adenosin trifosfato (ATP del inglés *adenosine triphosphate*) por medio de la enzima ATP sintasa; mientras que, cuando los protones viajan de regreso sin producir ATP, la energía almacenada se libera en forma de calor, esto se lleva a cabo en el interior de la membrana por UCP1. Que es un marcador molecular del TAM y disipa el gradiente de protones generado por la cadena del transporte de

electrones (Saely, *et al*, 2010; Kajimura, *et al*, 2015). El TAM se encuentra innervado densamente por el sistema nervioso simpático (SNS) el cual, responde a la exposición al frío liberando noradrenalina (NA) y al unirse a sus receptores adrenérgicos β_3 desencadena la activación de la adenilato ciclasa, la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la activación de la cinasa dependiente de AMPc, esto activa y fosforila a la lipasa sensible a hormonas (LSH). Liberando ácidos grasos, que se unen a UCP1 y de esta forma se activa la termogénesis (Palou, *et al*, 1998; Kajimura, *et al*, 2015). Así mismo el TAM es un tejido capaz de liberar diversos factores que actúan de forma paracrina, autocrina y endocrina, a estas moléculas se les denomina batocinas; entre las que podemos encontrar, al factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés *Nerve Growth Factor*) y el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2 del inglés *Fibroblast Growth Factor 2*), los cuales podrían incrementar la innervación del TAM y el número de preadipocitos, mejorando de esta forma la capacidad termogénica y las condiciones fisiológicas. Además, la activación termogénica producida por frío induce la expresión de óxido nítrico sintasa (NOS del inglés *Nitric Oxide Sintasa*) en los adipocitos que podría contribuir con el mejoramiento del flujo sanguíneo, lo cual, es esencial para la adaptación trófica. (Villarroya, *et al*, 2016). Es importante destacar que varias de las proteínas de importancia en el TAM se expresan de la misma forma en el TABe.

El TABe es un tipo celular con características morfológicas y funcionales similares al TAM que se encuentra en depósitos del TAB. Sin embargo, no se conoce con certeza su origen celular, ya que no existen marcadores moleculares exclusivos de los preadipocitos marrones ni blancos, por lo que solo existen teorías, entre las que se encuentran: 1) derivan de la maduración de células precursoras de adipocitos marrones dentro del TAB, 2) se diferencian a partir de preadipocitos blancos, 3) por transdiferenciación de adipocitos blancos, y 4) derivan de células precursoras de músculo liso. Por otro lado, se sabe que diferentes estímulos pueden inducir la

formación de este tejido, entre los que se encuentran, el frío prolongado, agonistas del receptor adrenérgico β_3 , ejercicio, entre otros (Rosenwald 2013; Kajimura, *et al*, 2015; Stanford, *et al*, 2015).

Aunque se sabe que el ejercicio puede ser un inductor del TABe su mecanismo es desconocido, existen diversas hipótesis, una de éstas menciona que la disminución en el tamaño celular y el contenido de lípidos disminuye el aislamiento del cuerpo, requiriendo incrementar la producción de calor (Nedergaard, *et al*, 2014), otra hace referencia al aumento de la inervación simpática en el TAB subcutáneo producida por el ejercicio. Otros estudios han identificado miocinas liberadas del músculo esquelético como las responsables de la diferenciación a TABe, tales como irisina, miostatina, hormona similar a la meteorina y ácido b-aminoisobutírico (Boström, *et al*, 2012; Rao, *et al*, 2014; Stanford, *et al*, 2015). Por otro lado, uno de los estímulos más estudiados es el frío. Se ha determinado que existen factores moleculares que comparten el TAM y el TABe, como UCP1, COX7a1 y Cidea, sin embargo, éstas sólo están activadas durante una exposición a frío prolongado en el TABe, mientras que en TAM siempre están expresados, además, de acuerdo con Rosenwald y colaboradores en 2013, en un estudio realizado en ratones C57BL/6 determinaron que el TABe se puede transdiferenciar después de un periodo de adaptación al calor, en este caso, en comparación al TAM de la región interescapular, el TABe de la región inguinal dejó de expresar los marcadores de TAM y expresaba moléculas características de TAB, y ante una reexposición al frío los depósitos de TAB en la región inguinal readquieren la morfología y función de TAM; lo que indica la alta plasticidad de este tejido a transdiferenciarse de acuerdo con las condiciones ambientales. Sin embargo, la mayoría de los estudios para evaluar al TABe son realizados en TAB inguinal, debido a que en comparación con el TAB epididimal, es altamente propenso a transdiferenciarse a TABe (Kajimura, *et al*, 2015).

La expresión de UCP1 en TAB se ha asociado con la disminución de la obesidad en ratones obesos que fueron tratados con agonistas β 3 adrenérgico. Además, animales que fueron transplantados con TABe y marrón en depósitos de TAB tienen como resultado una mejora metabólica en la obesidad, que está dada por su capacidad termogénica y las moléculas secretadas por estos tejidos, por lo que se ha propuesto un mayor estudio de estas moléculas como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad (Kajimura, *et al*, 2015; Villarroya, *et al*, 2016).

Por su parte, el TAB está compuesto por diferentes tipos celulares: adipocitos (fracción visceral) y preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y leucocitos (fracción estromal); siendo los adipocitos el tipo celular principal, que corresponden del 80 al 90% del tejido (Figura 1.3) (Wozniak, *et al*, 2008; Balistreri, *et al*, 2010). Los adipocitos tienen morfología unilocular en donde una vacuola de aproximadamente del 90% del volumen celular es la encargada de almacenar los lípidos, el número de mitocondrias es variable y a diferencia de los adipocitos del TAM, éstas son alargadas y delgadas (Figura 1.1) (Saely, *et al*, 2010). Su principal función es almacenar energía en forma de lípidos controlando su movilización y distribución en el cuerpo, así como sintetizar moléculas activas llamadas adipocinas, éstas intervienen en procesos de inflamación, metabolismo energético (lípidos y glucosa), regulación de la presión arterial, crecimiento, división celular, sistema inmunológico, y apoptosis (Juge-Aubry, 2005; Achari y Jain, 2017). Dentro de las adipocinas se incluyen hormonas como leptina, adiponectina, visfatina, apelina, vaspina, hepcidina, quemerina, omentina, citosinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α del inglés *tumor necrosis factor alpha*), interleucinas y quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocito 1 (MCP-1 del inglés *monocyte chemoattractant protein-1*), y el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1 del inglés *Plasminogen activator inhibitor-1*) (Wozniak, *et al*, 2008).

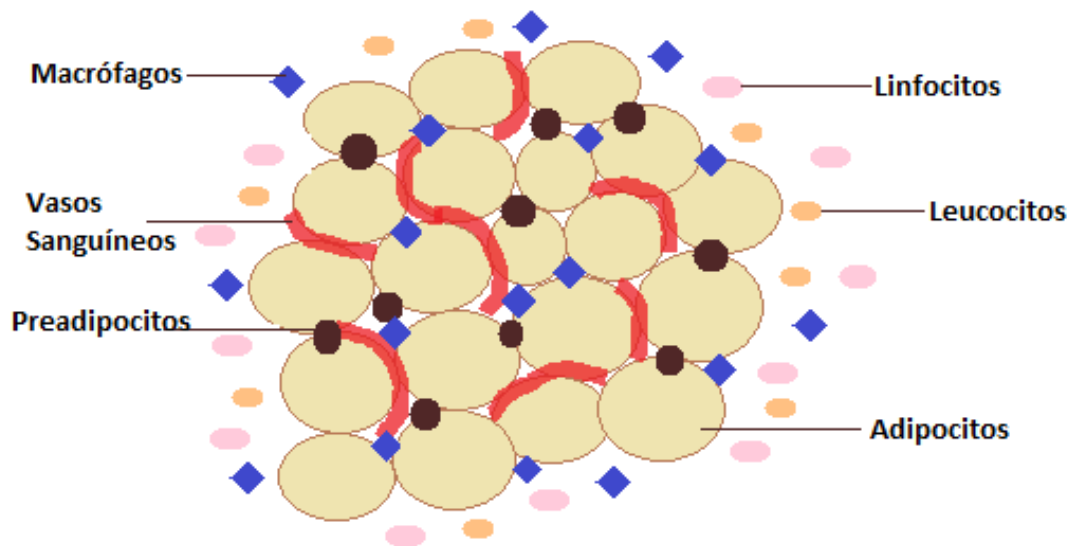


Figura 1.3 Tipos celulares en el TAB (tejido adiposo blanco). Modificada de Tsiloulis y Watt, 2015.

El TAB se puede clasificar en dos tipos, de acuerdo a la región anatómica en donde se encuentran: tejido adiposo blanco visceral (TABv) y tejido adiposo blanco subcutáneo (TABs). La acumulación del primero se asocia con RI, riesgo a desarrollar DM2, dislipidemia y aterosclerosis; mientras que la acumulación del segundo se asocia a menor o nula disminución en la sensibilidad a la insulina sin riesgo a desarrollar DM2 (Gesta, *et al*, 2007; Stanford, *et al*, 2015). Esto puede deberse a las propiedades intrínsecas de los adipocitos del TABv, como: una tasa de recambio lipídico mayor a la del TABs, responde mejor al efecto lipolítico de las catecolaminas y en menor medida al anti-lipolítico de la insulina, y en sujetos con obesidad mórbida, disminuye la expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) (Montague, *et al*, 1998); a pesar de que se sabe que es el TABs donde se expresa y secreta principalmente la leptina. Diversos estudios han determinado que en el

estado de obesidad la expresión de Lep incrementa en mayor proporción en el TABv (Masuzaki, *et al*, 1995; Zheng, *et al*, 1995).

En una persona normopeso el TAB conforma alrededor del 20% del peso total en hombres y 28% en mujeres. En personas obesas esto puede incrementar a más del 80% del peso corporal. (Thompson, *et al*. 2012). En esta condición existe un desbalance en la secreción de adipocinas, aumentando las pro-inflamatorias y disminuyendo las anti-inflamatorias (Maury y Brichard, 2010;). Al alterarse el sistema de trabajo de las adipocinas, se plantea que este desbalance es la conexión entre el exceso de TAB y las comorbilidades de la obesidad. La hipertrofia ocasionada por el aumento de masa grasa en el adipocito lleva a hipoxia en algunas regiones, lo que inicia una respuesta inflamatoria. Estas alteraciones cambian el perfil de adipocinas reduciendo la expresión de adiponectina e incrementando la de leptina y de la proteína 4 de unión a retinol (RBP-4 *del inglés retinol binding protein-4*); así como de TNF- α e interleucina-6 (IL-6) por la infiltración de macrófagos al TAB, lo cual, se asocia a la RI, efectos aterogénicos, entre otros. El incremento de la síntesis y secreción de leptina induce la resistencia central y periférica de esta hormona, mientras que la disminución de adiponectina, y el incremento de RBP-4, PAI-1 y angiotensinogeno están involucrados en la hipertensión, RI y aterogénesis (Balistreri, *et al*, 2010; Leal y Mafra, 2013). Debido a la asociación entre la obesidad y sus comorbilidades por medio de las adipocinas, por ejemplo, es necesario el estudio de leptina, adiponectina e insulina.

1.3 Leptina, adiponectina e insulina y sus alteraciones durante la obesidad

1.3.1 Leptina

Es una hormona de 16 kDa, compuesta por 167 residuos de aminoácidos (aa), su gen fue identificado por primera vez por Friedman y cols. en 1994 mediante el método de clonación posicional en *mus musculus*, el cual se encuentra en el cromosoma 6; éste fue denominado *ob*. En un experimento realizado por Ingalls y cols. en 1950 determinaron que en su ausencia produce un fenotipo de obesidad severa y su producto fue denominado leptina que viene del griego *Leptos* cuyo significado es delgado (Martin *et al*, 2008; Giles, 2017). Se expresa principalmente en adipocitos y se encuentra en circulación en proporción a la cantidad de TAB; sin embargo, este último no es el único, aunque sí el principal. Existen otros factores que modulan el nivel de leptina circulante, como: hormonas metabólicas, género, nivel de desarrollo y requerimientos energéticos del cuerpo (Considine y Caro, 1997). El principal papel de la hormona es informar al sistema nervioso central (SNC), a través del hipotálamo, sobre la cantidad de energía almacenada en el TAB (Martin *et al*, 2008; Giles, 2017).

En el hipotálamo, de forma específica en el núcleo arcuato, la leptina se une a su receptor ObRb activando la vía de señalización JAK/STAT (del inglés *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*). La unión de la hormona a su receptor produce la activación de la cinasa JAK2 que se une al motivo rico de prolinas en la región citoplasmática del receptor, induciendo una serie de fosforilaciones que incluyen, la transfosforilación de JAK2 y la fosforilación de la tirosina 985 y 1138 en la región intracelular del receptor. La fosforilación de la tirosina 1138 resulta fundamental, ya que, es en este sitio donde STAT3 interactúa, esto produce su activación y a su vez se disocia de ObRb (Fuentes, T. *et al*, 2010). La activación de STAT3 induce su dimerización y translocación al núcleo en donde media cambios de expresión de varios genes; por un lado, reduce la expresión de 2 péptidos orexigénicos: neuropeptido Y (NPY) y péptido relacionado con agouti

(AGRP del inglés *agouti-related protein*) e induce la expresión de los péptidos anorexigénicos: transcrito relacionado a cocaína y anfetamina (CART del inglés *cocaine and amphetamine-related transcript*) y la hormona estimulante de melanocito- α (α -MSH del inglés *Melanocyte-Stimulating-Hormone*), que es derivado de la proopiomelanocortina (POMC del inglés *proopiomelanocortin*). La α -MSH es un agonista del receptor a melanocortina-4 (MC4-R), que al ser activado reduce el consumo de alimento, mientras que AGRP es su antagonista e induce al consumo (Crujeiras, *et al*, 2015). Por otro lado, STAT3 también induce la expresión del supresor de señalización por citosinas 3 (SOCS3 del inglés *Suppressor of cytokine signaling 3*), que se une a JAK2 por medio de su dominio central SH2 (del inglés Src Homology 2). La unión de JAK2 con esta molécula inhibe la transfosforilación de la cinasa y ObRb; llevando a la inhibición de la señalización de la leptina (Vázquez Vela ME, 2006; Crujeiras, *et al*, 2015), Figura 1.4.

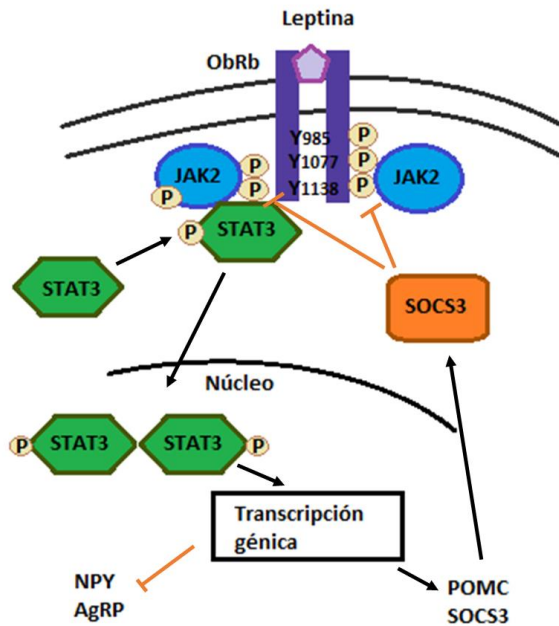


Figura 1.4 Vía de señalización JAK/STAT mediada por leptina. Modificada de Crujeiras, *et al*, 2015.

Se conocen seis isoformas del receptor de leptina que varían en su longitud, localización y función, éstas comparten el dominio extracelular de unión al ligando y transmembranaral, mientras que difieren en el dominio intracelular, los cuales, son: Ob-Ra, Rb, Rc, Rd y Re, de estos, el más estudiado es el Ob-Rb (conocido en humanos como Ob-RL), éste se expresa en el hipotálamo y es la única isoforma que activa la vía de señalización JAK/STAT. El Ob-Rb y otras isoformas pueden activar la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K del inglés *Phosphoinositide 3 Kinasa*) y vías del óxido nítrico (NO del inglés *Nitric Oxide*). En cuanto a Ob-Ra está altamente distribuido en tejidos periféricos y se cree que es el encargado de transportar a la leptina a través de la barrera hematoencefálica (BH) (Martin *et al*, 2008).

La leptina juega un papel importante en la regulación del metabolismo al incrementar el gasto de energía e inhibir la liberación de insulina y movilización de los AGL. Entre otras funciones está la regulación del crecimiento, estrés, respuesta inmunológica, en el sistema cardiovascular, angiogénesis, maduración del folículo y la nutrición maternal, por lo que ha sido denominada como una hormona pleiotrópica (Marques-Oliveira, *et al*, 2018) En músculo esquelético (ME), la leptina induce la oxidación de lípidos y en las células pancreáticas promueve la sensibilidad a la insulina; entre otros efectos fisiológicos de la leptina son: prevenir la lipogénesis ectópica, inducir la producción hepática de glucosa y mejorar la sensibilidad a insulina en ME e hígado (Martin *et al*, 2008; Jéquier, E., *et al*, 2002); mientras que en el TAB promueve la lipólisis (Juge-Aubry, 2005).

Una de las hormonas encargadas de la regulación de la expresión y liberación de leptina es la insulina; Saladin y cols. en 1995 determinaron que después de la ingesta de alimento la expresión del RNAm del gen Lep aumentaba de forma significativa, corroborando, que una sola administración de 1 IU de insulina en ratones en ayuno era capaz de incrementar la expresión de RNAm del gen Lep debido a su acción directamente en el adipocito; siendo independiente a su efecto hipoglucemiante. Sin embargo, el aumento en la secreción de leptina está asociado con el tiempo de exposición a la hiperinsulinemia (Ahren, *et al*, 1997), y de acuerdo con Casabiell y cols. (2000), el efecto de la insulina sobre la secreción de leptina, tiene una actividad dual, primero inhibiendo la liberación de leptina y después estimulando su secreción, siendo de gran importancia la concentración de glucosa en el medio, concluyendo que el efecto de la insulina sobre la secreción de leptina está mediado por la acción metabólica de la insulina, y no la insulina *per se*. Esto podría llevarse a cabo por la vía de señalización PI3K, Proteína cinasa B (Akt) y diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (Figura 1.5), mientras que su inhibición por medio de agonistas adrenérgicos y PPAR γ (Marques-Oliveira, *et al*, 2018).

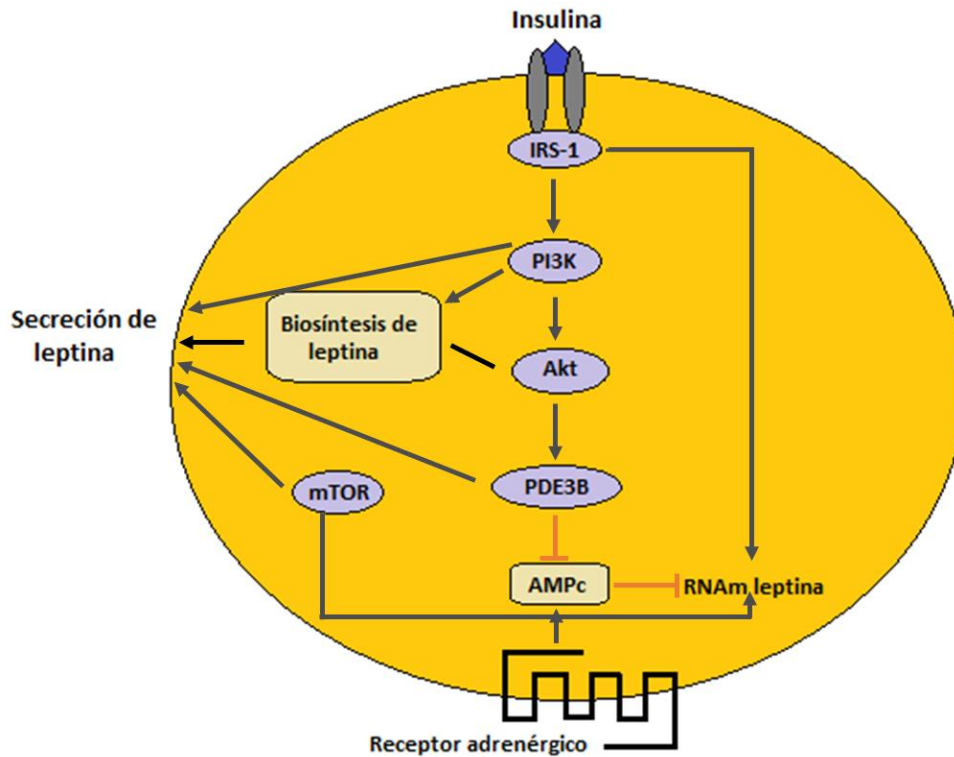


Figura 1.5 Secreción de leptina mediada por la insulina. Modificada de Marques-Oliveira, *et al.*, 2018.

El consumo de una dieta alta en grasas y la obesidad, pueden desencadenar resistencia a la leptina a nivel central y periférica, esto por una disminución en su actividad metabólica asociada a un incremento en su expresión y secreción. Se han planteado diferentes mecanismos, entre los que se encuentran (Martin *et al*, 2008; Crujeiras, *et al*, 2015):

- Mutaciones poligénicas que afecten a genes involucrados en el eje de señalización de la leptina, que podrían contribuir a la predisposición genética al desarrollo de resistencia a la leptina.

- Imposibilidad de la leptina para cruzar la BH, al saturar al ObRa, limitando su entrada al SNC y su unión a sus blancos neuronales.
- Por inhibición de la vía de señalización de la leptina, ya sea desensibilizando al ObRb o a través de otras proteínas involucradas en la señalización río abajo, como, SOCS-3.
- Estudios recientes han propuesto que existen factores de unión leptina que podrían afectar la biodisponibilidad de la hormona, entre las cuales se mencionan a la proteína C reactiva (PCR) y a la apolipoproteína J (APO-J).

La falta de respuesta a la leptina a nivel central afecta la regulación del consumo de alimento, a la absorción de nutrientes, al metabolismo y a la sensibilidad a insulina llevando a un desbalance en el equilibrio energético (Jéquier, E., *et al*, 2002; Juge-Aubry, 2005). Una alta concentración de leptina se asocia con un incremento de insulina y RI, independientemente del IMC. Esta adipocina también tiene un efecto presor a nivel hemodinámico, evita la acumulación ectópica de lípidos y está asociada a la subinflamación crónica al estar relacionada con la actividad de macrófagos, TNF- α , producción de ERO, la síntesis de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS del inglés *Endothelial Nitric Oxide Synthase*), expresión de MCP-1 y con la proliferación y migración de células endoteliales; como consecuencia aumentando la resistencia a la leptina. Éstas últimas alteraciones podrían estar implicadas en efectos deletéreos del sistema cardiovascular (Leal y Mafra, 2013; Martin, *et al*, 2008).

Por lo anterior, la leptina es una hormona importante no sólo en la regulación de consumo y gasto energético a nivel del SNC, sino también a nivel periférico en el metabolismo de lípidos y glucosa, a nivel cardiovascular y en el sistema inmunológico. Cambios en la expresión y secreción de esta hormona conllevan una

serie de alteraciones en el sistema endocrino del TA y otros tejidos importantes en el metabolismo.

1.3.2 Adiponectina

Es una adipocina sintetizada y liberada por el TAB de 30 kDa; su biosíntesis y expresión se encuentran altamente controlados por chaperonas moleculares en el retículo endoplásmico (RE) que incluye a la proteína 44 residente del retículo endoplásmico (ERp44 del inglés *Endoplasmic Reticulum resident protein 44*), a la oxido reductasa 1-La (Ero1-La del inglés *ER oxidoreductase 1-La*), y a la proteína similar a oxido reductasa de unión a disulfuro A (DsbA-L del inglés *disulfide-bond A oxidoreductase-like protein*) (Perrota, *et al*, 2019).

Se ha determinado que esta hormona tiene actividad antidiabética, anti-inflamatoria, antiaterogénica y cardioprotectora (Nigro E., *et al*, 2014; Leal y Mafrá, 2013). Se han identificado 2 receptores funcionales, que son responsables de su función: AdipoR1 y AdipoR2, siendo el primero el más abundante en el ME y el segundo en el hígado (Achari y Jain, 2017), además, se expresan en las células β pancreáticas, macrófagos, células endoteliales, células del músculo liso y dentro de placas ateroscleróticas (Perrota, *et al*, 2019). Para que se lleve a cabo la vía de señalización de esta hormona es necesaria la acción de una proteína adaptadora denominada APPL1, la cual, se une a los receptores una vez que la adiponectina es reconocida por estos. Por medio de APPL1 se activa al sustrato IRS-1, estos interactúan de forma directa funcionando como un mediador entre adiponectina e insulina, a través del receptor AdipoR1; también se activa la vía de AMPK, la cual es indispensable para la vasodilatación, citoprotección y en menor medida para la oxidación de ácidos grasos y gasto energético; mientras que, las vías de la MAPKp38 y Rab5 son las responsables de la translocación del transportador de

glucosa GLUT4/GLUT2 y de la entrada de glucosa al ME e hígado, en este último también inhibe la gluconeogénesis. En el caso del receptor AdipoR2, éste activa la oxidación de ácidos grasos libres (AGL) por el receptor α activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- α del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) (Nigro E., *et al*, 2014; Achari y Jain, 2017) (Figura 1.6).

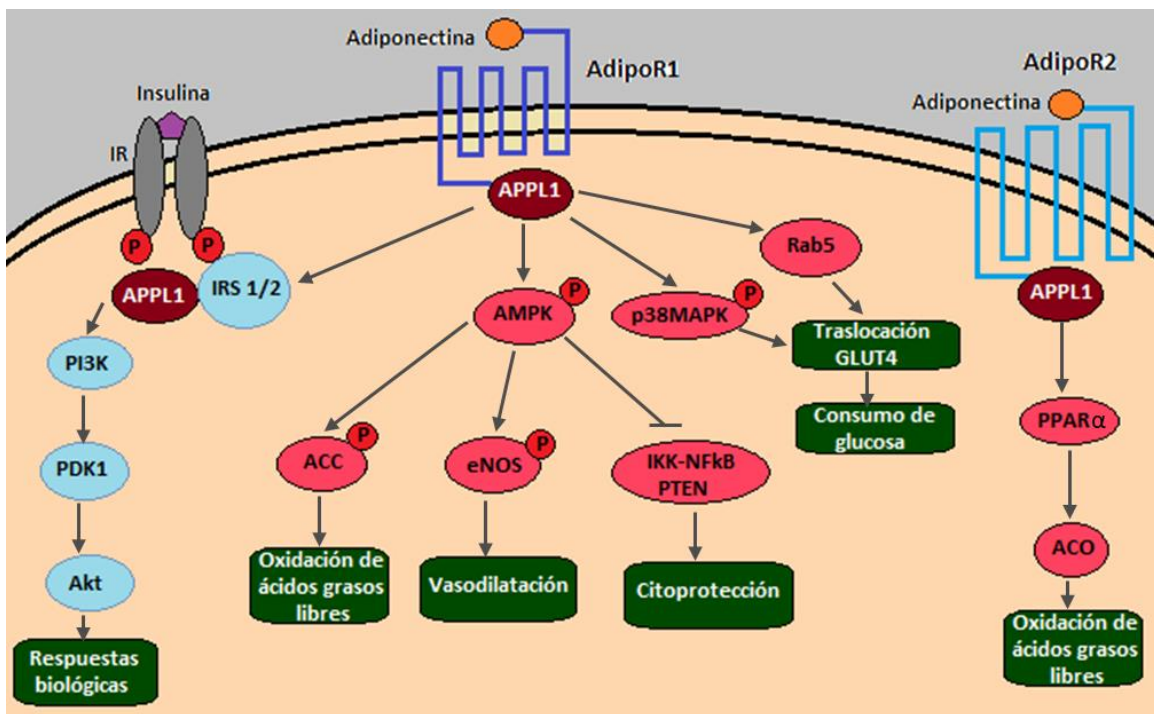


Figura 1.6. Mecanismos de acción de adiponectina. Modificada de Achari, y Jain, 2017.

En el endotelio y en los macrófagos la adiponectina suprime las ERO, inhibiendo la vía de señalización de NF- κ B, la regulación a la baja de TNF- α y estimulando la expresión de IL-10 (Nigro E., *et al*, 2014; Leal y Mafra, 2013; Perrota, *et al*, 2019). Además, esta adipocina inhibe la expresión de moléculas de adhesión en el

endotelio, la proliferación de células musculares, la diferenciación de monocitos a macrófagos y la formación de células espumosas (López-Jaramillo, *et al*, 2014). Por lo tanto, en un estado de obesidad, en el que la expresión y secreción de adiponectina se ven disminuidos, existe una alta probabilidad de desarrollar RI, ECV, HA, entre otras. Con base en esto, Combs y cols. en 2004 crearon un ratón transgénico, en el que se hizo una delección de la región repetida del dominio de colágeno del gen de adiponectina, con lo que se incrementó el nivel de ésta en la circulación; este aumento llevó a una mayor sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa en comparación con el grupo *wild type*. En el caso de una administración exógena de esta hormona se puede reducir la concentración en sangre de triglicéridos, glucosa y AGL (Fruebis, *et al*, 2001). Dentro de otras moléculas que se alteran y no son liberadas por el TA se encuentra la insulina.

1.3.3 Insulina

Es una hormona secretada por las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans, en respuesta a diferentes nutrientes, como la glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos y AGL (Fu, *et al.*, 2014). La liberación de insulina mantiene los niveles de glucosa normales facilitando la entrada de ésta a sus órganos blanco; regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y promueve la división y crecimiento celular a través de su efecto mitogénico (Jéquier, E., *et al*, 2002).

El ME es el principal órgano con gasto energético en forma de glucosa que necesita de insulina para entrar a la célula; en el hígado esta hormona inhibe la glucogenólisis y la gluconeogénesis, reduciendo así el nivel de glucemia. En TA e hígado permite el almacenamiento de glucosa en forma de triglicéridos y glucógeno, respectivamente; sin embargo, una acumulación crónica de grasa produce una RI

selectiva, caracterizada por disminuir la captación de glucosa en el ME e inhibir la gluconeogénesis, pero no el almacenamiento en TA e hígado. Esto sugiere que una hiperinsulinemia sostenida reduce la expresión del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS-2), pero no el IRS-1, siendo el primero necesario para la captación de glucosa en ME e hígado y el segundo para el almacenamiento de glucosa (Watada y Tamura, 2017; Shojaee-Moradie *et al.*, 2007).

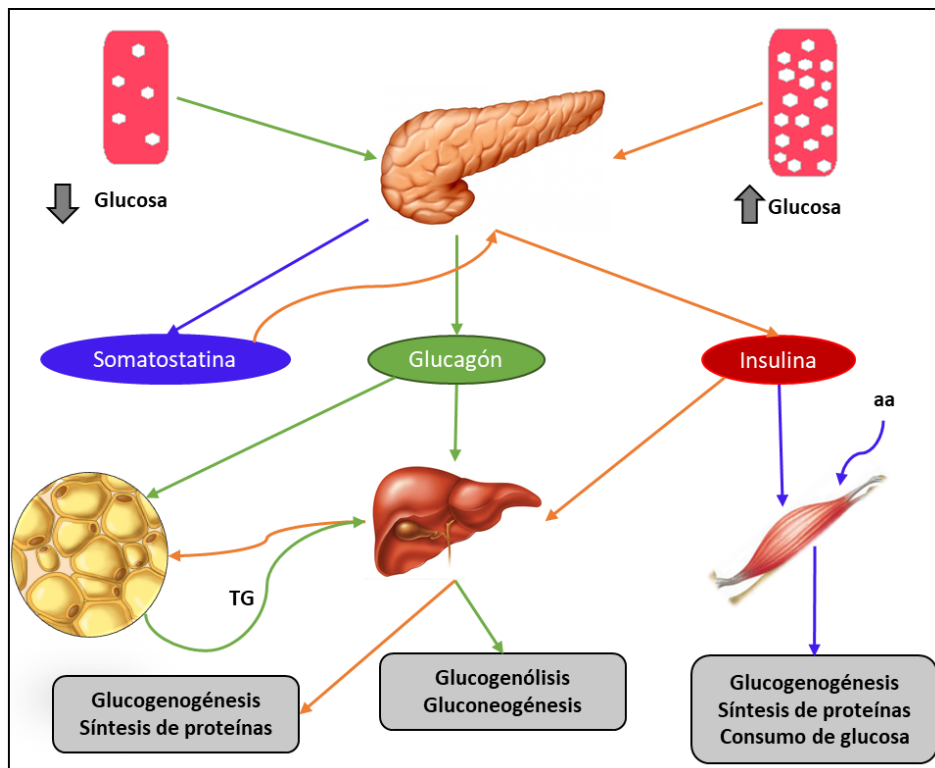


Figura 1.7 Homeostasis de glucosa. Modificada Fernández-Tresguerres, 2019.

Como se mencionó anteriormente la concentración de insulina y leptina son capaces de regularse. Kieffer y cols. en 1997, determinaron que en las células β y δ pancreáticas se expresa el receptor ObRb y en el caso de las células β , la leptina

es capaz de abrir los canales de K_{ATP} , disminuir el Ca^{+} intracelular y por consiguiente disminuir la liberación de insulina. Otro mecanismo posible mediante el que la leptina inhibe la secreción de insulina es al disminuir AMPc al activar a la fosfodiesterasa 3B (PDE3B del inglés *Phosphodiesterase 3B*) dependiente de PI3K (Zhao, *et al.*, 1998) y por consiguiente la inhibición de la incretina péptido similar al glucagón (GLP-1 del inglés *Glucagon Like Peptide-1*) (Ahrén y Havel, 1999). Esto destaca la alta relación entre la leptina y la insulina en la regulación metabólica y el desarrollo de las alteraciones en la obesidad.

1.4 Etiología de la obesidad

La obesidad tiene un origen multifactorial en el que intervienen factores genéticos, ambientales y epigenéticos; de forma individual, estos factores no pueden explicar todos los casos de obesidad (Bays y Scinta, 2015).

1.4.1 Factores ambientales y genéticos

Entre los factores ambientales se encuentra un desbalance entre el consumo y gasto energético que se resume en la adopción de una vida sedentaria y un mayor acceso a alimentos con alto contenido calórico (Burgio, *et al*, 2014); entre otras causas están el estrés psicológico, condiciones médicas y factores culturales (Qasim, 2017).

Estudios actuales han destacado a las dietas altas en carbohidratos (DAC) y grasas (DAG) como las principales causantes del incremento de la masa grasa, debido a que el exceso de energía se almacena en forma de triglicéridos en el TA llevando a una disfunción del mismo; sin embargo, bajo las mismas condiciones ambientales, que en este caso, se denominan obesogénicas, sólo un grupo de individuos

desarrolla esta condición y sus alteraciones (Bays y Scinta, 2015). Esto despierta el interés en el estudio de los factores genéticos, que se refieren a mutaciones en la secuencia de DNA de los genes con importancia en el metabolismo energético, como es el caso de los genes de POMC y MCR4, ya que la deficiencia de alguno de los dos en modelos animales causa hiperfagia y obesidad severa (Giles, 2017).

Dentro de los cambios genéticos que dan origen a la obesidad se encuentran: síndromes, mutaciones monogénicas y poligénicas, siendo la mutación de MCR4 la forma más común de obesidad monogénica causando el 5% de la obesidad en niños y más del 1% de la población en general. De forma global, se han identificado 63, 12 y 157 loci involucrados en síndromes, formas monogénicas y poligénicas de obesidad, respectivamente (Qasim, *et al.* 2017; Giles, 2017). Además de acuerdo con la Asociación de Estudios del Genoma (GWAS del inglés *Genome Wide Association Studies*) se ha determinado que existen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs *Single Nucleotide Polymorphisms*), asociados al incremento del IMC, ICC y % de grasa corporal; de los cuales, se han estudiado 32 loci, sin embargo, el efecto combinado de estos solo explican el 2% de la herencia del IMC y se sabe que los factores genéticos podrían explicar del 40 al 80% de la variación y heredabilidad del IMC (Vliet-Ostapchouk, *et al.*, 2012). Por lo antes mencionado, ha surgido el interés del estudio de la interacción entre los factores genéticos y ambientales, ya que estos últimos, pueden aumentar el riesgo en el individuo con predisposición a desarrollar obesidad, como es el caso de los genes IRX3 y FTO, que bajo una DAG se induce su sobreexpresión y asociación con el incremento del IMC (Nowacka-Woszek, *et al.* 2017).

A pesar de que existe una gran cantidad de variaciones genéticas que predisponen el desarrollo de obesidad, su frecuencia es muy baja, por lo que, surge un nuevo campo de análisis del origen de la obesidad: la epigenética.

1.5 Epigenética

La epigenética es el estudio de los mecanismos de regulación genética que son dependientes de la estructura de la cromatina (Zaina, *et al.*, 2010). Las marcas epigenéticas son moléculas de unión a las proteínas de la cromatina y a la secuencia de DNA que regulan la expresión génica (Qasim, *et al.* 2017).

La regulación epigenética es indispensable para el desarrollo y diferenciación celular de los organismos, ya que su desregulación puede ocasionar el desarrollo de enfermedades (Shen y Waterland, 2007).

De acuerdo con Youngson y Morris en 2012, los mecanismos epigenéticos se dividen en (Figura 1.7):

- Modificación de Histonas
- RNAs no codificantes
- Metilación del DNA

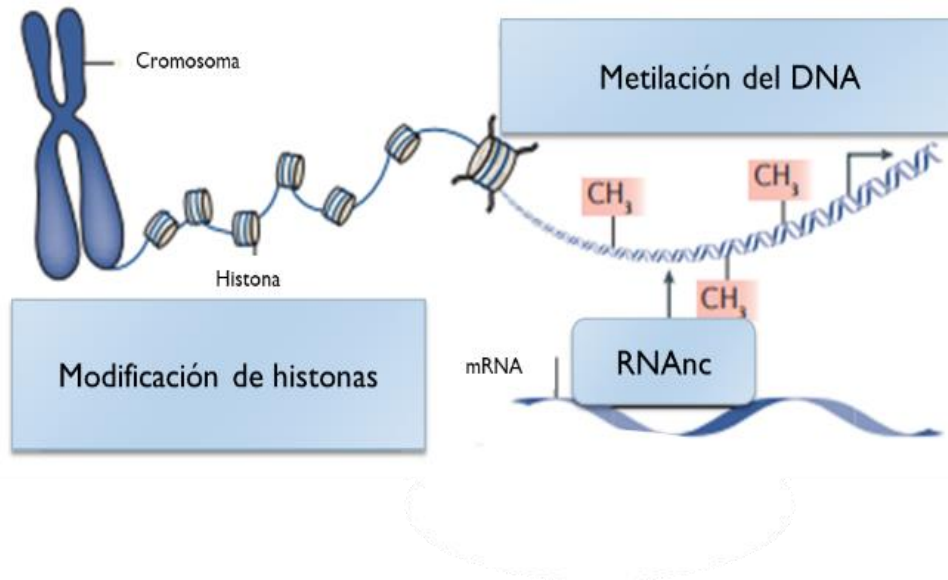


Figura 1.7 Principales mecanismos de regulación epigenética. Tomada y modificada de Barrès y Zierath, 2016

En el núcleo de los mamíferos, el DNA está asociado con proteínas denominadas histonas, las cuales forman un octámero, en el que intervienen las histonas: H2a, H2b, H3 y H4, en el que el DNA se enrolla, y en su conjunto, forman la unidad fundamental de la cromatina: el nucleosoma. La dinámica de la cromatina está regulada por una variedad de factores y eventos de señalización que forman la base del código de las histonas (McCleary-Wheeler, *et al.*, 2014), éstas experimentan una serie de modificaciones post- transcripcionales en el residuo N-terminal, entre las que se encuentran, acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. La adición de estas moléculas se les denomina modificadores de la cromatina, y a su vez, existen proteínas de unión específica, denominadas writers, readers y erasers, que de forma secundaria interfieren con la función de la cromatina (Abi Khalil, 2014). Además, debido a que las marcas de histonas están ampliamente conservadas en

los organismos, permite predecir si el gen se encuentra silenciado o expresado, de acuerdo al tipo, localización y combinación de las marcas, por ejemplo, la acetilación de histonas, que se lleva a cabo por las acetiltransferasas de histonas (HAT) resulta en la activación de los genes, por el contrario, las deacetilasas de histonas (HDAC) inducen el silenciamiento de los genes (Figura 1.8) (Youngson y Morris, 2012; Wolfgang, *et al*, 2013).

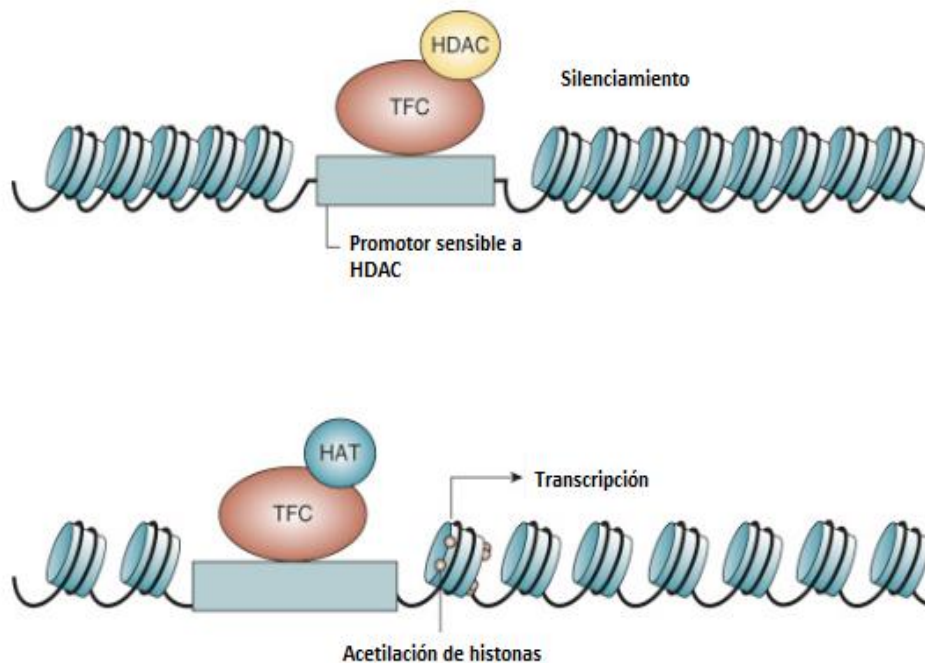


Figura 1.8 Acetilación y deacetilación de histonas. Tomado y modificado de Marks, *et al.*, 2001

Por su parte, los RNAnc (RNA no codificante) se encargan de modular la expresión génica interactuando con la cromatina y organizando los complejos proteicos en el cromosoma (Abi Khalil, 2014). Dentro de estos, se encuentran: miRNAs (microRNAs), piRNAs (PIWI-interacting RNAs), RNAs largos no codificantes, RNAs

pequeños de interferencia (siRNAs small interfering RNAs) y tiRNAs (transcription initiation RNAs), teniendo una mayor variedad de funciones, como en el caso de los siRNAs, que pueden intervenir en la defensa contra virus, silenciamiento de transposones y remodelación de la cromatina (Taft, et al., 2010).

Finalmente, con respecto a la metilación del DNA, se acepta, que está asociada al empaquetamiento de la cromatina y al silenciamiento de los genes, y de manera contraria, la desmetilación de éste con la apertura de la cromatina y activación de la transcripción de genes. Cabe destacar que estos mecanismos epigenéticos generales no se encuentran de forma aislada, sino que coexisten en un gran complejo, en donde una modificación epigenética estimula o reprime a otra (figura 1.9) (Youngson y Morris, 2012; Wolfgang, *et al*, 2013).

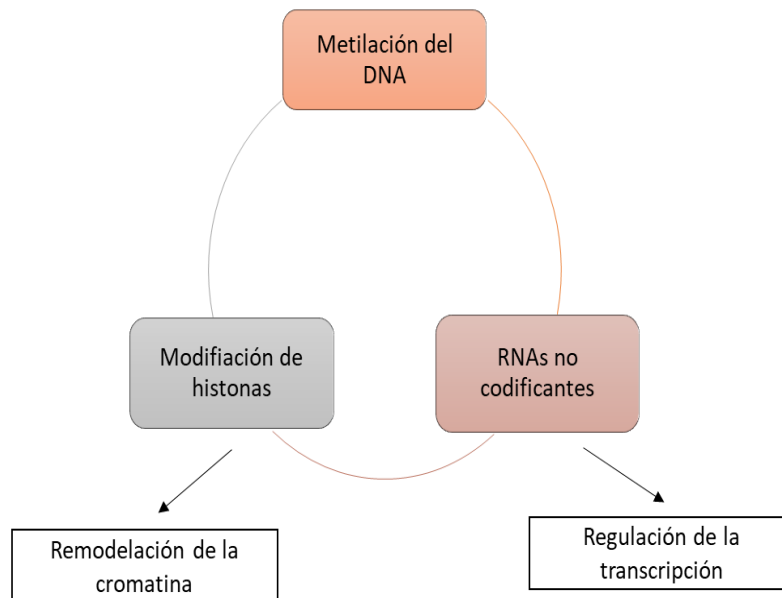


Figura 1.9 Interacción entre los mecanismos epigenéticos

Como se mencionó anteriormente, las marcas epigenéticas se establecen durante el desarrollo y diferenciación celular, se mantienen a lo largo de la vida, pero alteraciones en el ambiente durante la edad adulta pueden cambiar la modulación de la expresión génica y los rasgos fenotípicos (Rönn, *et al.* 2013). Uno de estos factores puede ser la alimentación, la cual puede estar enriquecida o tener deficiencia de proteínas, carbohidratos, grasas y vitaminas, y dependiendo del estado de desarrollo, puede afectar la fisiología, metabolismo energético, y el epigenoma. Este último es el conjunto de compuestos y proteínas que al unirse al DNA regulan la activación y desactivación de los genes, como el folato, la forma soluble de la vitamina B9, que tiene un papel importante en la síntesis, reparación y metilación del DNA (Vliet-Ostapchouk, *et al.*, 2012).

1.5.1 La epigenética como factor en el desarrollo de obesidad

Los factores epigenéticos representan tanto cambios transitorios como heredables inducidos por el ambiente y mutaciones en el genoma (Bays y Scinta, 2015).

Estudios recientes han comprobado que la epigenética es un componente clave en el control de la adipogénesis, consumo de alimento y homeostasis energética. Lo cual demuestra que estas modificaciones tienen un papel relevante en la nutrición y desarrollo de la obesidad, siendo un área de estudio para determinar los mecanismos moleculares que engloban a las enfermedades metabólicas (EM) (Crujeiras A.B, *et al.*, 2015).

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados. Con respecto a la obesidad, en un estudio realizado en el gen POMC se identificó que la hipermetilación de una isla CpG localizada en la frontera del intrón 2 y el exón 3, promovía el estado de obesidad en niños, ya que la hipermetilación interfiere con la unión del enhancer p300 reduciendo la expresión de POMC en comparación con

niños delgados. En otro estudio también se identificó que la metilación en regiones diferencialmente metiladas (RDM) está altamente asociado con el IMC, demostrando que la metilación del gen POMC induce una disminución en el tono melanocortinérgico. (Giles, 2017).

Entre otros estudios (Vliet-Ostapchouk, *et al*, 2012), determinó que una DAG puede influir en los cambios de metilación de algunos genes como el PPAR γ , MC4R y TRIM3. A pesar de los trabajos en los que se documentan cambios en las marcas epigenéticas, aún no está claro, si éstas preceden al desarrollo de obesidad o viceversa. Los SNP también pueden ocurrir en regiones con alguna marca epigenética, lo que induce cambios en la regulación de la expresión del gen o genes próximos y el subsecuente incremento de adiposidad, como es el caso del gen FTO, cuyo SNP se encuentra en su primer intrón, el cual, de acuerdo con Smemo y cols. (2014), afecta la expresión del gen IRX3 al interactuar directamente con su promotor.

La interacción entre ambiente, la variación genética y los mecanismos epigenéticos constituyen un reto y un extenso campo de estudio para la determinación del origen de la obesidad.

1.5.2 Metilación del DNA

La metilación del DNA se encuentra ampliamente distribuida en los mamíferos, esta modificación ocurre en las citosinas asociadas a una guanina por medio de un grupo fosfato y a su conjunto se le conoce como sitio CpG. En las células somáticas del humano las citosinas metiladas ocupan alrededor del 1% del total de las bases de DNA, por lo tanto, afecta del 70 al 80% de los dinucleótidos CpG (Bird, 2002).

La metilación de sitios CpG es muy frecuente en regiones repetidas y en el cuerpo del gen, mientras que en las islas CpG de los promotores de genes constitutivos es

muy baja. Las islas CpG son regiones de DNA de aproximadamente 200 pares de bases (pb) con alta densidad de sitios CpG. Diversos estudios del genoma sugieren que alrededor del 75% de la transcripción de genes está regulada por regiones ricas en CpG que se encuentran poco metiladas (Stöger R, 2006; Chen y Riggs, 2011; Crujeiras A.B, *et al*, 2015).

El patrón metilado o no metilado de un sitio CpG a lo largo de la hebra de DNA tiende a ser copiado, lo que indica que la información epigenética se hereda de generación en generación de una célula a otra. En los mamíferos el patrón de metilación se establece durante el desarrollo por medio de las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) de *nov*o y posteriormente se transmite a las células somáticas por medio de la DNMT de mantenimiento (Bird, 2002). Se conocen tres enzimas funcionales; la DNMT1 que mantiene la metilación durante la replicación y las DNMT3a y DNMT3b que metilan *de novo*. Éstas utilizan como sustrato a la S-adenosil metionina y el grupo metilo se adiciona en la posición 5 de la citosina (5mC) que está asociada a una guanina por medio de un fosfato (CpG) (Chen y Riggs, 2011) (Figura 1.10). Además, se sabe, que estas enzimas necesitan de un cofactor para su funcionamiento; DNMT3L, sin embargo, aún no se conoce por completo su participación (McCleary-Wheeler, *et al.*, 2014)

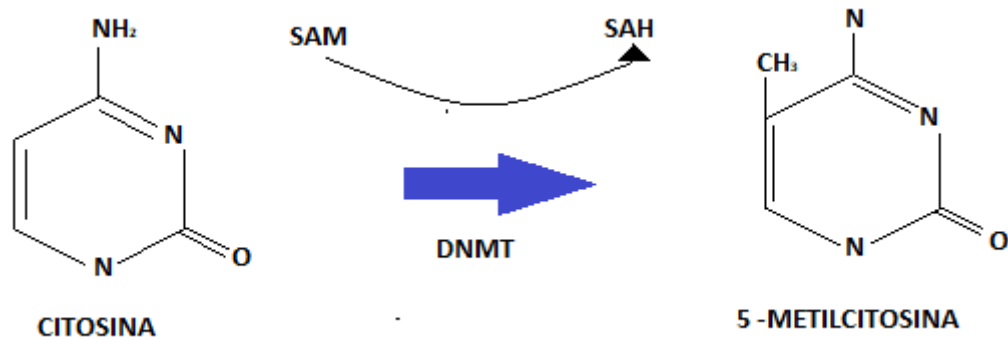


Figura 1.10 Metilación del DNA. SAM (S-adenosil metionina) SAH (S adenosil homocisteína) DNMT (DNA metiltransferasa).

Como se mencionó previamente, la metilación del DNA está asociada con la represión génica, y existen 4 modelos mediante los cuales, puede afectar la transcripción (Bird, 2002):

- I. Interferencia con los factores de transcripción.
- II. Reclutamiento de metilasas y deacetilasas de histonas que evitan la transcripción.
- III. Por medio de proteínas de unión a DNA metilado (MBD del inglés *Methyl-CpG Binding Domain*), resultando en un impedimento estérico.
- IV. Splicing alternativo, por medio de la metilación del cuerpo del gen.

Sin embargo, también se sabe, que en algunos casos a la metilación del DNA le precede el silenciamiento mediado por otro de los mecanismos epigenéticos previamente mencionados, como es el caso de la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de transposones; en estos casos, la metilación funciona como la estabilidad del silenciamiento (Bird, 2002). Otro fenómeno genético de importancia

mediado por la metilación del DNA es la impronta génica, que es la expresión monoalélica de un gen basado en el origen parental, (Qasim, 2017).

1.6 Metilación del gen Lep

Bajo el análisis de diferentes investigadores, se ha determinado que la metilación del gen Lep está asociada a su expresión tejido-específico.

Stöger en 2006 realizó por primera vez un análisis del patrón de metilación *in vivo* en el promotor del gen LEP en el caso del humano y Lep en el ratón. Observando que, en ambos modelos, había diferencias de metilación entre alelos, por lo que se refirió a ellos como epialelos, sin embargo, no encontró que esto se debiera a que leptina fuera un gen improntado. Determinó, igualmente, que el patrón de metilación es diferente en ratón y humano, y que dependiendo del tejido u órgano analizado éste también presenta cambios (Stöger, 2006). No es hasta 2016 que, Zhang y cols. analizan el estado de metilación y expresión del gen Lep en ratones CD1 en diferentes tejidos, en donde encuentran que en tejidos donde la leptina no se expresa (corazón, hígado, bazo, riñón y pulmón) el porcentaje de metilación es mayor. Por otro lado, en el adipocito y fracción visceral, el bajo porcentaje de metilación fue asociado con la expresión de este gen en este tejido. Shen y cols. en 2014, determinaron que el patrón de metilación de Lep en ratones C57BL/6J incrementaba de forma significativa después de alimentarlos con una DAG, y a su vez, la expresión de éste se veía incrementada, por lo que se sugiere que, como mecanismo para disminuir la expresión, la célula metila al promotor, sin que esto sea suficiente. Sin embargo, en el estudio realizado por Milagro y cols. en 2009, se determinó que el incremento en el estado de metilación del sitio CpG -441 está

asociado con la disminución en concentración de leptina en suero, por lo cual, son necesarios más estudios.

Respecto al mecanismo de regulación de la leptina, se ha establecido que la metilación en la región del promotor de LEP constituye un determinante significativo para la expresión de ésta en los adultos. Marchi y cols. en 2011 lo determinaron al analizar los sitios CpG en la región promotora del gen LEP de mujeres con un IMC ≥ 40 Kg/m², observando que el estado de metilación cambiaba respecto al tejido y grupo celular, además, evaluaron que al disminuir el nivel de metilación de las líneas celulares de fibroblasto y HeLa se incrementaba de forma significativa la expresión de LEP, de modo que la metilación tiene un papel en el silenciamiento, mientras que la desmetilación, aumenta y reactiva la expresión de esta adipocina. Sin embargo, no se observan cambios en el perfil de metilación cuando se pierde peso corporal mediante una cirugía bariátrica; determinando que el perder peso no influye en el patrón de metilación en el gen de LEP.

A partir de que se ha establecido que factores como la nutrición aceleran la activación de enfermedades metabólicas alterando el epigenoma, se han realizado estudios para determinar cómo intervenciones en el estilo de vida, como el ejercicio, puedan mejorar el estado metabólico reprogramando las marcas epigenéticas (Crujeiras A.B, *et al*, 2015).

1.7 Ejercicio

La actividad física está definida como un movimiento o fuerza ejercida por el músculo esquelético que produce gasto energético. El ejercicio se describe como un subcomponente de la actividad física, el cual es planeado y estructurado,

también como una intervención capaz de inducir un balance de energía negativo y dependiendo de la ingesta de alimentos puede reducir la masa grasa por una mayor oxidación de lípidos y glucosa (Thompson, *et al.*, 2012; Ferraro, *et al.*, 2014). Además, el ejercicio representa una actividad multifactorial, capaz de afectar cada tejido y órgano en el cuerpo; en consecuencia, la falta de éste puede llevar al desarrollo de diversas enfermedades crónicas (Seo, *et al.*, 2014; Hawley, *et al.*, 2014).

1.7.1 Clasificación de ejercicio

Existen dos tipos de ejercicio: 1) aeróbico (correr, natación y ciclismo), y 2) de resistencia/anaeróbico (levantamiento de pesas). Éste último actúa principalmente aumentando la masa muscular y la fuerza, mientras que el primero, estimula la biogénesis mitocondrial, la expresión de genes de la respiración mitocondrial y la β oxidación (Ferraro, *et al.*, 2014). En la combinación de ambos ejercicios, se obtienen todos los beneficios. Por otra parte, además del tipo de ejercicio, existen otras variables importantes en la respuesta fisiológica de éste, como es la intensidad, la cual, se mide de acuerdo a la captación máxima de O_2 , denominado VO_{2max} , siendo baja <45%, intermedia 45-75% y alta >75%; otros parámetros importantes son el horario (día/noche) y duración (continuo/discontinuo) (Hawley, *et al.*, 2014; Seo, *et al.*, 2014). De acuerdo con las características del ejercicio será el sustrato utilizado, cuando se trata de un ejercicio intenso y corta duración el principal metabolito es la glucosa, mientras que si es moderado y prolongado disminuye la oxidación de carbohidratos e incrementa la de lípidos. La regulación del tipo de sustrato se encuentra asociada a cambios locales como el Ca^{2+} sarcoplásmico, el nivel de ATP intramuscular y sus subproductos (ADP, AMP, Pi), así como, factores sistémicos, en los que se encuentran, la concentración plasmática de hormonas (adrenalina, insulina y glucagón), (Hawley, *et al.*, 2014).

Debido a que el ME se distingue por tener un grado alto de plasticidad, en respuesta a ambientes estresantes, la contracción muscular dada por ejercicio físico conduce a una respuesta adaptativa para mejorar la eficiencia metabólica, capacidad oxidativa y la actividad contráctil por medio de modificaciones en la expresión génica y concentración de proteínas (Barrès R., *et al*, 2012). Aunque aún no se conoce por completo la vía de señalización que activa el ejercicio, se sabe que algunos de los factores de transcripción que induce son las células T activadas por el factor nuclear (NFAT, del inglés *Nuclear factor of activated T-cells*), el factor 2 de potenciador de miocito (MEF2 del inglés *myocyte enhancer factor-2*), miogenina y los PPARs. Estos inducen o reprimen genes que codifican las isoformas rápidas y lentas de varias proteínas contráctiles para enzimas metabólicas que modulan el tipo de fibra y la remodelación del ME. El estatus transcripcional de algunos genes podría también estar modulado por modificaciones epigenéticas inducidas por el ejercicio, como la metilación del DNA y modificación de histonas; llevando a una remodelación de la cromatina (Ferraro, *et al*, 2014).

Además, el ME es capaz de sintetizar y liberar moléculas con acción autocrina, paracrina y endocrina, las cuales se denominan, miocinas. Éstas le permiten un *crosstalk* con órganos como el páncreas, hígado, cerebro, TA y hueso, explicando, como el ejercicio produce un efecto en todo el cuerpo. La primera citocina que se determinó que era sintetizada y liberada por ME fue IL-6, la cual, se expresa de forma independiente a TNF, sugiriendo que esta interleucina en este tejido tiene un papel importante en el metabolismo, más que en una respuesta inflamatoria. Entre otras miocinas que participan, se encuentran: miostatina, IL-8, IL-15, decorina, factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21 del inglés *Fibroblast Growth Factor 21*), irisina, proteína similar a meteorina (Metrl del inglés *meteorin-like*), quimiocina derivada del queratinocito (KC del inglés *keratinocyte-derived chemocyne*), entre otras (Hawley, *et al.*, 2014; Pedersen y Febbraio 2012), (Figura 1.11).

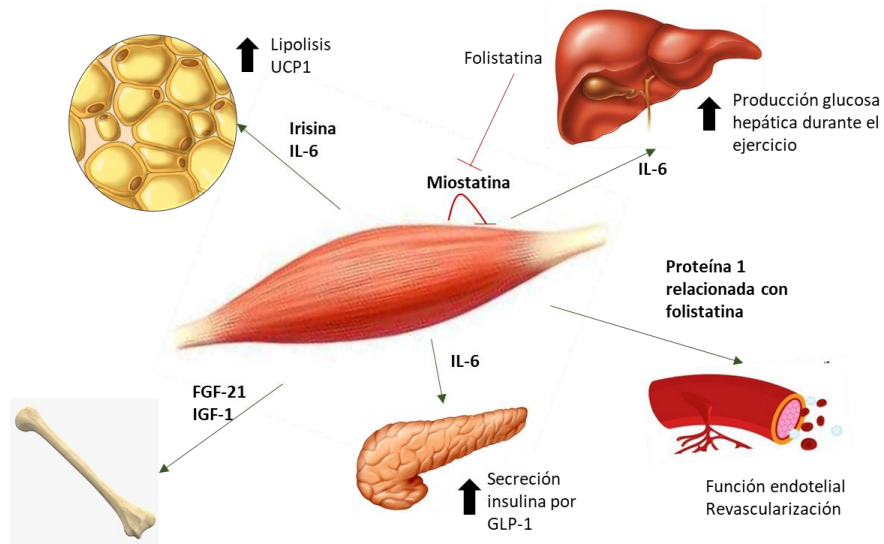


Figura 1.11 Liberación de miocinas mediada por el ejercicio. Modificada de Pedersen y Febbraio 2012.

Con la comunicación entre el ME y otros tejidos se producen beneficios con el ejercicio aeróbico mejorando la sintomatología asociada a la HA, enfermedad coronaria y a la disminución del riesgo a padecer ECV. Además, las dos clases de ejercicio pueden aumentar la densidad mineral ósea y mejorar la sensibilidad a la insulina. Siendo el ejercicio la primera recomendación para prevenir obesidad e intolerancia a la glucosa (Ferraro E., *et al.*, 2014; Eagan y Zierath, 2013).

1.7.2 Ejercicio y TAB

El TAB además de ser receptor de IL-6 e irisina por parte del músculo esquelético durante el ejercicio, aumenta la lipólisis y la termogénesis. (Pedersen y Febbraio 2012). Existen otras moléculas que incrementan con el ejercicio con acción en el TAB, como la adrenalina, que juega un papel importante en el metabolismo de lípidos, ya que, estimula a los adrenoreceptores β_3 , los cuales activan a la

lipoproteína lipasa (LPL), una de las enzimas que participan en la hidrólisis de triglicéridos. Además, favorece el flujo de AGL al inducir la vasodilatación e incrementar la sensibilidad de los adrenoreceptores sin incrementar la cantidad de estos. Destacando que la intensidad y duración del ejercicio son variables importantes para la liberación de la LPL (Zouhal, *et al.*, 2008). Sin embargo, la adrenalina, no es la única molécula importante en la lipólisis del TAB, de acuerdo con varios investigadores (Thompson y cols. en 2012; Tsiloulis y Watt 2015). El bloqueo selectivo de los receptores β adrenérgicos disminuye, pero no abole la lipólisis durante media hora de ejercicio moderado; por lo que se plantea que existen otros mecanismos que regulan la lipólisis. Una de las moléculas propuestas es el péptido natriurético atrial (PNA), la baja concentración de insulina y la liberación de otros factores como la hormona del crecimiento, glucagón y cortisol, sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar su importancia, ya que existen diferentes factores que pueden cambiar la concentración de estas moléculas, como la intensidad del ejercicio, el estado metabólico del individuo, el género y la edad. Otro factor que se incrementa es el flujo sanguíneo en el TA, y debido a esto, es complicado evaluar si la concentración de las moléculas de interés tuvieron modificaciones en su liberación (Thompson, *et al.*, 2012).

1.7.3 Obesidad y ejercicio

El incremento en la lipólisis lleva a una disminución en el tamaño del adipocito y modifica el patrón de expresión de proteínas mitocondriales (Thompson, *et al.*, 2012; Standford, *et al.*, 2015). Esta reducción induce una mejora en el estado metabólico de los individuos, sobre todo, en aquellos con sobrepeso y obesidad. Se ha determinado que en estos sujetos la oxidación de lípidos es igual o mayor que en personas sanas. En el caso de pacientes con DM2, el ejercicio agudo incrementa de forma significativa la oxidación de glucosa plasmática (Goodpaster y Spark,

2018).

Dentro de las alteraciones inducidas por el incremento en el tamaño del adipocito y acumulación de lípidos, se encuentra el desarrollo de inflamación crónica, a través de infiltración de macrófagos, así como el aumento de citocinas pro-inflamatorias y disminución de las anti-inflamatorias. El ejercicio es capaz de revertir esta condición, ya que, en primer lugar, disminuye los AGL en la circulación, lo cual, lleva a un decremento en la expresión de receptores de estos caracterizados por su importancia en el desarrollo de inflamación crónica y subsecuente RI (Ringseis, *et al.*, 2015). Con respecto a las adipocinas, como la adiponectina, leptina, visfatina y resistina, el ejercicio aeróbico moderado produce un incremento de la primera y una disminución de las últimas tres (Figura 1.12), sin embargo, para que estos cambios se lleven a cabo, debe ser un ejercicio prolongado (García-Hermoso, *et al.*, 2017).

De acuerdo con Shojaee-Moradie *et al.*, 2007, seis semanas de ejercicio moderado mejoran la sensibilidad a la insulina, al incrementar la oxidación de glucosa plasmática, así como reducir la glucogenólisis en sujetos con sobrepeso.

El ejercicio puede conducir a diversos beneficios durante la obesidad, sin embargo, aún son necesarios más estudios para entender cómo es que se llega a estos cambios, por lo que nos referimos a estudios donde se ha observado que el ejercicio es capaz de producir cambios en la regulación de genes a través de modificaciones en la metilación del DNA.

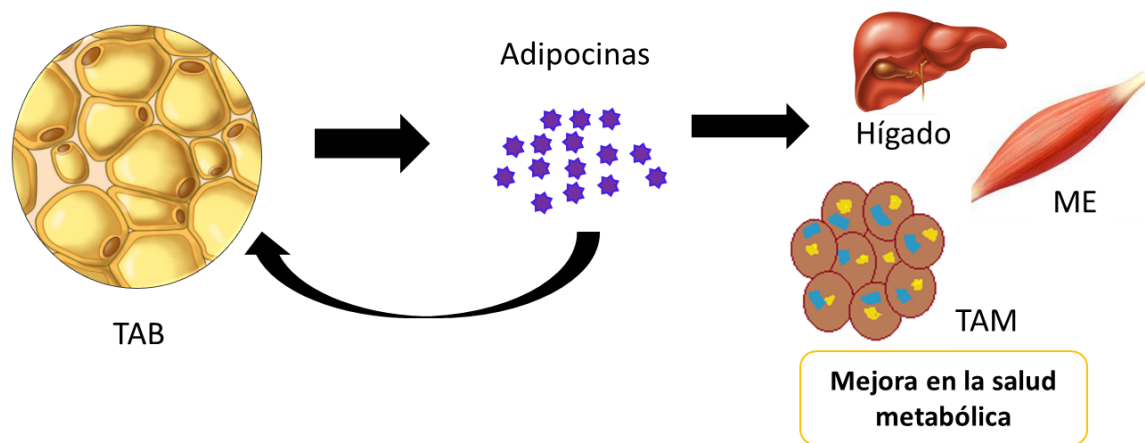


Figura 1.12 Efecto del ejercicio sobre la secreción de adipocinas. Modificada de Stanford *et al.*, 2015.

1.7.4 Ejercicio y metilación del DNA

Existe evidencia que demuestra que la realización de ejercicio puede inducir cambios en la regulación epigenética. En el caso del ME, en humanos, Bàrres y cols. (2012) comprobaron que 20 minutos de ejercicio agudo son suficientes para disminuir la metilación de genes asociados con el metabolismo energético en el ME y, posteriormente, inducir su expresión. En otro estudio realizado por Kansleiter y cols. (2014), observaron que después de nueve semanas de ejercicio aeróbico había una disminución en la grasa corporal y un aumento en la capacidad oxidativa de glucosa y AGL; además, cambió el estado de metilación de forma global en el ME. De forma específica observaron que disminuía el grado de metilación y aumentaba la expresión en genes involucrados con la diferenciación y crecimiento e inervación del ME, angiogénesis, y genes involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos.

1.7.5 Ejercicio y cambios en la metilación del DNA de genes del TA.

De forma particular, se ha comprobado que el ejercicio no solo cambia el patrón de metilación en ME, sino que también puede inducir cambios en la metilación y expresión de genes en el TA. En el estudio realizado por Rönn y cols. (2013), analizaron el patrón de metilación de forma global de genes en el TA de individuos sanos que tuvieran o no antecedentes familiares con DM2. Demostrando que entre estos dos grupos no hubo diferencias en el patrón de metilación, sin embargo, después de seis semanas de ejercicio de entrenamiento, se observó que el patrón de metilación en diferentes regiones (promotor, 3'UTR, 5'UTR, exón, cuerpo o intergénica) de los genes cambiaba. En 139 de los 236 genes analizados el nivel de metilación incremento, asociándose con la disminución en la expresión de estos; dentro de estos genes se encontró a HDAC4 (Deacetilasa de Histona 4) que inhibe la transcripción del transportador de glucosa GLUT4 en TAB y NCOR (Correpressor de Receptor Nuclear) que recluta a las deacetilasas de histonas. Otro estudio realizado por Fabre y cols (2018), evaluaron el efecto del ejercicio agudo en personas sedentarias y después de tener un régimen de ejercicio durante seis semanas, encontraron que en la primera evaluación los cambios de expresión de 32 genes del TA se asociaron con cambios en su estado de metilación; mientras que cuando se evaluó el ejercicio agudo después de seis semanas de entrenamiento se observó que sólo 6 genes tuvieron cambios de expresión asociada a cambios en su patrón de metilación. Los cambios en la primera evaluación del ejercicio agudo se dio en genes involucrados en procesos de inflamación, así como en la infiltración de macrófagos, en cambio, los genes que cambiaron con el ejercicio de entrenamiento están implicados en el metabolismo del TA, adipogénesis y sistema inmunológico.

2. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una enfermedad de origen multifactorial, en la que se produce un incremento en la secreción de leptina. La expresión diferencial de la leptina en el tejido adiposo con respecto a otros se regula por la metilación del DNA. El ejercicio aeróbico mejora la sintomatología de la obesidad y se ha asociado con cambios en el patrón de metilación y expresión de algunos genes. Por lo que en este trabajo se analizará si la disminución en la secreción de leptina está asociada a cambios en el patrón de metilación del gen Lep.

3. HIPÓTESIS

El ejercicio aeróbico moderado en ratas macho obesas inducirá un aumento en el nivel de metilación del gen Lep en el tejido adiposo.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ejercicio aeróbico moderado sobre el patrón de metilación del gen Lep en un modelo animal de obesidad inducido por una dieta alta en grasa.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En un modelo de obesidad en ratas Wistar macho inducido con DAG y sometido a un régimen de ejercicio aeróbico moderado evaluar:

1. Perfil bioquímico (triglicéridos, glucosa y colesterol total) e insulina.
2. Concentración de adipocinas (leptina y adiponectina).
3. Patrón de metilación del gen Lep en el tejido adiposo.
4. La correlación de la metilación del gen Lep con la concentración de leptina en suero.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 46 ratas Wistar macho de 20 semanas, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio, con un fotoperiodo luz/oscuridad 12/12 y fueron alimentadas *ad libitum*. Los animales se obtuvieron del bioterio del CINVESTAV Unidad Coapa y su cuidado fue de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los grupos se dividieron de acuerdo al (Cuadro 6.1):

Grupos	Dieta	Tratamiento
Control Sedentrio (C-S) n= 12	Estándar (DE)	-----
Control Ejercicio (C-E) n= 11	Estándar (DE)	Ejercicio aeróbico
Obeso Sedentario (Ob-S) n= 12	Alta en Grasa (DAG)	-----
Obeso Ejercicio (Ob-E) n= 11	Alta en Grasa (DAG)	Ejercicio aeróbico

Cuadro 6.1 Grupos experimentales

Las dos dietas las consumieron durante 3 meses y a partir del segundo mes se inició el régimen de ejercicio. DE Purina LabDiet 5008® y DAG Purina TestDiet®.

6.2 Régimen de ejercicio

Los animales realizaron ejercicio aeróbico durante cuatro semanas, el cual se ilustra en el cuadro 6.2:

<i>Semana</i>	Velocidad (m/min)	Tiempo (min)
1	6	20
2	12	20
3	15	20
4	18	20

Cuadro 6.2. Estructura del ejercicio aeróbico moderado.

6.3 Obtención de muestras

Se obtuvieron tres muestras sanguíneas: la primera, antes del inicio de la dieta; la segunda, después de haber concluido 2 meses de dieta y la tercera, cuando concluyeron el régimen de ejercicio y la dieta, fueron sacrificados por decapitación (Cuadro 6.3).

Se obtuvo 1 ml de sangre de la primera y segunda toma, mediante un corte transversal de la cola de la rata; los animales se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano a una dosis de 1 ml/Kg. La sangre, fue centrifugada 10,000 rpm durante 10 minutos. La última muestra sanguínea se obtuvo a partir de la sangre troncal, la cual siguió el mismo procedimiento para la obtención del suero. Se extrajo el tejido adiposo retroperitoneal y cerebro para el análisis del estado de metilación del gen de leptina. Todas las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron en el ultracongelador REVCO a -70°C hasta que fueron analizadas.

	1	2	3 (sacrificio)
Tiempo	0	2 meses	3 meses
Muestra	Suero	Suero	Suero, TAR y cerebro

Cuadro 6.3 Obtención de Muestras

6.3.1 Determinación del perfil bioquímico

A partir de las muestras de suero, se determinaron: glucosa, triglicéridos y colesterol total utilizando el kit Spinreact®, el cual fue modificado por el laboratorio de Farmacología y Toxicología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos, se utilizaron 2.5 µl de suero por duplicado, 250 µl del reactivo R que contiene todas las enzimas necesarias para la reacción y 2.5 µl del patrón de cada analito (glucosa (100 mg/dl), triglicéridos o colesterol (200 mg/dl)), se dejó incubar a temperatura ambiente en el agitador Microjive Boekel® durante 20 min, la absorbancia se leyó en el espectrofotómetro BioTek® a una longitud de onda de 505 nm inmediatamente después de retirarlo de

agitación y 30 minutos después para determinar el tiempo en el que la reacción fue más estable.

6.3.1.1 Colesterol

Los ésteres de colesterol presentes en la muestra son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa dando como productos colesterol y ácido graso libre; el colesterol y el O_2 reaccionan con la enzima colesterol oxidasa formando a la 4-colestenona y H_2O_2 . El H_2O_2 , el fenol y 4-aminofenazona por medio de la enzima peroxidasa forman al compuesto colorimétrico quinonimina.

6.3.1.2 Triglicéridos

Los triglicéridos incubados con lipoproteína lipasa liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerol fosfato deshidrogenasa y ATP en presencia de glicerol quinasa para producir glicerol-3-fosfato y ADP. El glicerol-3-fosfato es transformado a dihidroxiacetona fosfato y H_2O_2 reacciona con 4-aminofenazona y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa dando una coloración roja.

6.3.1.3 Glucosa

La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y H_2O_2 . El H_2O_2 se detecta mediante un aceptor cromogénico de O_2 , fenol, 4-aminofenazona en presencia de la peroxidasa.

6.3.2 Cuantificación de leptina, insulina o adiponectina

Se utilizaron las muestras de suero obtenidas en los diferentes tiempos, la cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) del kit comercial Millipore®, cuyo principio es el siguiente: La molécula de interés es capturada en las paredes del pozo cargado con un anticuerpo monoclonal anti-(leptina, adiponectina o insulina), posteriormente se lava para eliminar lo que no fue capturado, después se agrega un anticuerpo monoclonal biotinilado de la molécula de interés, se lava y se le añade el conjugado estreptavidina -rabano picante peroxidasa y el sustrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina. La actividad de la enzima se mide en el espectrofotómetro por el incremento de la absorbancia de 450 a 590 nm después de la acidificación de los productos formados.

6.3.2.1 Leptina

Se utilizaron 20 µl de muestra por duplicado, 20 µl del estándar a concentración (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 y 30 ng/ml), a cada muestra o estándar se agregaron 10 µl de la solución matriz y 50 µl del antisuero. Se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente en el agitador Microjive Boekel®, pasado este tiempo se eliminó el exceso, se lavó 3 veces con el buffer de lavado y se adicionaron 100 µl del anticuerpo de detección con el que se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación; se retiró y se repitió el paso de lavado. Se agregaron 100 µl de la enzima y se dejó incubar durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, se retiró y se lavó 6 veces. Se adicionaron 100 µl de sustrato

dejándose incubar durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Por último, se colocó la solución de paro.

6.3.2.2 Insulina

Se agregaron 10 µl del buffer de ensayo, 10 µl del estándar a 5 diferentes concentraciones (0.2, 0.5 1, 2, 5 y 10 ng/ml) para realizar la curva de calibración y en los pozos restantes 10 µl de las muestras problema, después se agregan 80 µl del anticuerpo de detección; se incubó por dos horas en agitación a temperatura ambiente en el agitador Microjive Boekel®, una vez que terminó el tiempo de agitación se lavó 3 veces con el buffer de lavado y se agregaron 100 µl de la enzima, con ésta se incubó por 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, se retiró el resto de la enzima y se lavó 6 veces, posteriormente se agregaron 100 µl de sustrato y se incubó por 15 minutos, por último, se agregaron 100 µl de la solución de paro.

6.3.2.3 Adiponectina

Se realizó una dilución de la muestra 1:500 con el buffer de ensayo. El estándar y los controles del kit se resuspendieron en 0.5 ml de agua desionizada y a partir de ésta se realizaron siete diluciones, tomando 0.25 ml del tubo anterior (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 100 ng/ml) para realizar la curva estándar. En los pozos se agregaron 60 µl del buffer de ensayo, 20 µl de los estándares o las muestras desconocidas por duplicado y del anticuerpo de detección, esto se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en el agitador de marca Microjive Boekel®. Se eliminó el exceso y se lavó 3 veces. Se adicionaron 100 µl de la enzima y se incubó en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos, se retiró el exceso y se lavó 6 veces. Se agregaron 100 µl de sustrato y se dejó incubar por 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, pasado este tiempo se agregaron 100 µl de la solución de paro.

En todos los casos la absorbancia se midió en el espectrofotómetro BioTek® a una longitud de onda de 490 nm. La curva estándar se calculó con una ecuación de 4 parámetros en el programa estadístico GraphPad Prism 6.

6.3.3 Análisis de metilación del gen Lep

6.3.3.1 Diseño de *primers*

A partir de la base de datos NCBI se buscó el gen Lep de *rattus norvegicus*, el cual, se encuentra en el cromosoma 4 en la posición 22 del brazo largo (4q22), una vez seleccionado se abrió el siguiente link: [Ensembl:ENSRNOG00000045797](#), donde se identificó el sitio de inicio de la transcripción (SST) y a partir de éste, se seleccionaron 600 pb río arriba. Los 600 pb se copiaron en el programa MethPrimer. Con este programa se identificaron dos islas CpG, las cuales cumplían con ser > 100 pb, %CG > 50 y la relación Obs/Exp > 0.60. Posteriormente se evaluó el primer intrón, en el cual, se encontró una isla CpG, sus características son: > 100 pb, %CG > 50 y la relación Obs/Exp > 0.60. (Figura 6.1).

Gen Lep 4q22

Rattus norvegicus

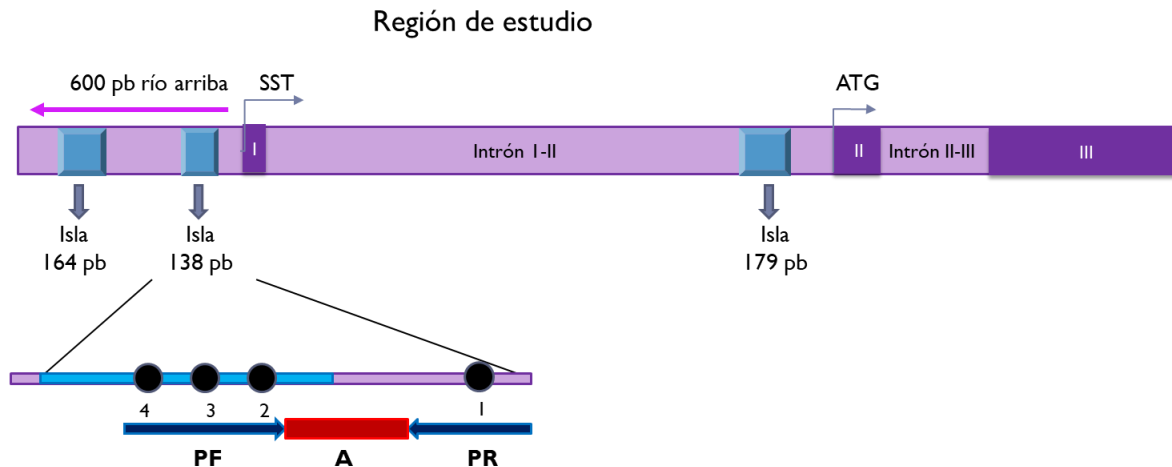


Figura 6.1 Gen Lep *Rattus norvegicus*. Isla 138 pb se encuentra en la posición -204 del SST, la de 164 pb -419, la isla de 179 pb se encuentra en la posición +8549 río abajo del SST. (I, II, III representan los exones por los que se compone el gen Lep, ATG sitio donde inicia la traducción, SST sitio de inicio de la transcripción) PF: primer forward, PR: primer reverse; sitios CpG: 4 (-225), 3 (-213), 2 (-207) en el PF y 1 (-161) en el PR.

De éstas se eligió la más cercana al SST, que se encuentra en la posición -204 a -342 del SST. En el cuadro 6.4. se muestran las secuencias de los *primer* obtenidos con el software MethPrimer.

PRIMER	SECUENCIA	
Forward M	ATTAAGCG ₄ TTTTTAATTG ₃ TATTG ₂	(25pb)
Reverse M	CTATTACAACCTAATACTCCACG ₁ CA	(25 pb)
Forward U	TTAAGTG ₄ TTTTTAATTG ₃ TATTG ₂ A	(25 pb)
Reverse U	ACTATTACAACCTAATACTCCACA ₁ CA	(26 pb)

Cuadro 6.4 Secuencia de los *primer* metilados (M) y no metilados (U), forward y reverse.

En cada secuencia están resaltados en color rojo los sitios CG analizados ₁ -161, ₂ -207, ₃ -213 y ₄ -225, los 3 últimos sitios se encuentran dentro de la isla CpG de 138 pb.

6.3.3.2 Extracción de DNA

- Tejido adiposo retroperitoneal (TAR) y cerebro.

Se realizó por medio de la técnica fenol-cloroformo, cuyo principio es la eliminación de proteínas con el fenol y la eliminación de este disolvente con cloroformo y alcohol isoamílico.

Se obtuvieron 300 mg de TAR y cerebro de las muestras congeladas, éstas fueron homogeneizadas con un homogeneizador manual y nitrógeno líquido en un tubo de 2 ml, se colocó en hielo y se agregó 1 ml de tritón-sacarosa 1X, esto se mezcló con el agitador vortex-genie2 S^{Inc.}, se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se repitió el paso, después se le adicionó 1 ml de PBS 1X, se mezcló con el agitador vortex y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se repitió el paso. Posteriormente se agregaron 500 µl de PBS 1X y 4 µl de la enzima proteinasa K, esto se incubó durante 18 h en baño maría a 56 °C en agitación a 100 rpm. Una vez que terminó el tiempo de incubación se colocó a temperatura ambiente, se adicionaron 500 µl de la mezcla fenol-

cloroformo 25:24 se agitó en vortex y se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C durante 10 min., se recuperó la fase acuosa, ésta se colocó en un tubo cónico de 1.5 ml y se agregaron 500 µl de cloroformo- alcohol isoamílico 48:2, se mezcló con vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. a 4 °C, se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo cónico nuevo de 1.5 ml donde se adicionaron 500 µl de etanol 100% y 8 µl de acetato de sodio, esto se incubó a -30 °C durante 18 h. Después de la incubación se centrifugó a 4000 rpm por 30 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó para lo cual se agregó 1 ml de etanol al 70%, se agitó el tubo por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, el etanol se decantó. Este paso se realizó por duplicado y finalmente se dejó evaporar el etanol restante. Finalmente, el precipitado (DNA) se resuspendió en 20-50 µl de agua libre de RNAsas Quiagen N.V.

Para la evaluación de la calidad de la extracción de DNA se cuantificó en ng/ µl y determinó la pureza al medir la relación de absorbancias 260/280 que debe estar en el rango de 1.8-1.9 y de 260/230 que debe ser ≥ 2 en el equipo Implen NanoPhotometer[®]. Su integridad se evaluó con un gel de agarosa al 1%, el cual se preparó con 500 mg de agarosa, 5 ml de TAE 10X (Tris, ácido acético y EDTA), 45 ml de agua desionizada y 2 µl de ATCGene HydraGreen[™] (intercalante de DNA), siendo el buffer de corrida TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Owl EasyCast[™] B1 a 70 voltios (V) durante 1 h.

6.3.3.3. Conversión con bisulfito de sodio

Esta técnica se fundamenta en la transformación de las citosinas no metiladas a uracilo, que consta de tres reacciones: sulfonación, desaminación y una desulfonación del DNA. En el caso de las citosinas metiladas, el grupo metilo, funciona como protector de la desaminación. (Figura 6.2).

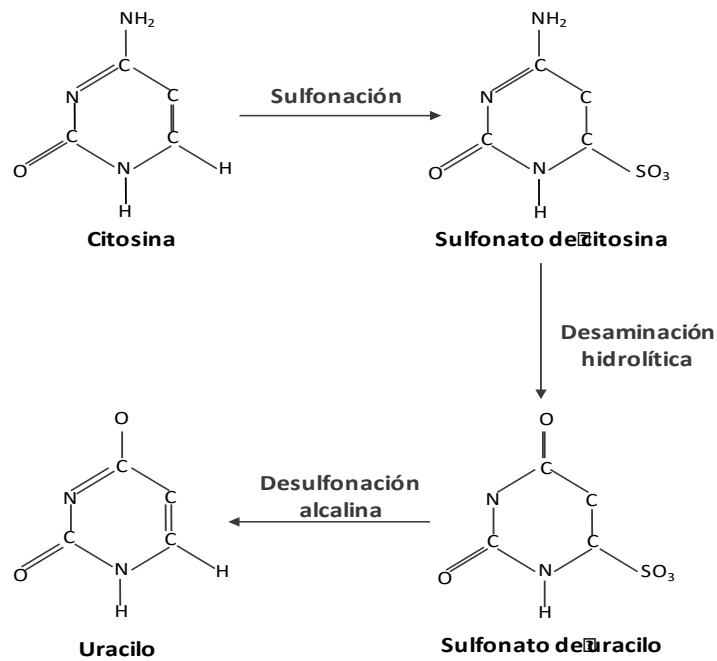


Figura 6.2 Sulfonación, desaminación y desulfonación de la citosina

Para realizarla se utilizó el kit comercial Epitect Bisulfite (Qiagen), el cual, consiste en incubar al DNA a alta concentración de bisulfito de sodio, temperatura elevada y pH ácido.

En tubos de PCR de 200 µl se agregaron 2000 ng de DNA genómico, agua libre de RNAsas, 85 µl de mix de bisulfito y 35 µl del buffer protector de DNA, esto se mezcló hasta que el cambio de color fue homogéneo. Se programó el termociclador Techne Prime para realizar la conversión con bisulfito como se muestra en el cuadro 6.5.

Peso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturalización	5	99
Incubación	25	60
Desnaturalización	5	99
Incubación	85	60
Desnaturalización	5	99
Incubación	175	60
Almacenamiento	∞	20

Cuadro 6.5 Tiempo y temperatura para la conversión con bisulfito

Una vez terminada la reacción los tubos se colocaron en columnas de sílica para realizar lavados y la desulfonación de las muestras, las cuales consistieron en centrifugaciones a máxima velocidad y un calentamiento final a una temperatura de 56°C por 5 min. en el Multi-therm Benchmark Scientific. Finalmente, el DNA transformado fue eluido con 20 µl agua libre de RNAsas.

Posterior a esto, el DNA transformado fue cuantificado en el NanoPhotometer como DNA de cadena sencilla y almacenado a -30°C.

6.3.3.4 PCR metilación específica (MSP)

Es una de las técnicas más utilizadas para evaluar la metilación del DNA en la que, previamente, éste debe someterse a la conversión con bisulfito de sodio. Se basa en el uso de 2 par de primer de metilación específica diferentes para la misma región de interés; el no metilado solo amplificará con DNA tratado con bisulfito de sodio en el que las citosinas de los sitios CpG de interés se hayan transformado a uracilo, mientras que el metilado amplificará DNA transformado en el que las citosinas de los sitios CpG estén metiladas y por lo tanto se mantengan como citosinas, (Figura 6.3). El método de MSP es muy sensible al detectar un alelo metilado entre 10,000 no metilados.

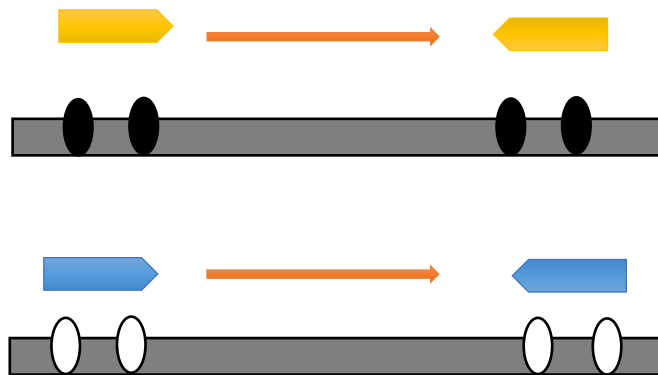


Figura 6.3 PCR metilación específica (MSP). Círculos negros ejemplifican a las citosinas metiladas, que son reconocidas por los primer diseñados para DNA metilado (color amarillo); círculos blancos ejemplifican los uracilos que son reconocidos por los primer para DNA no metilado (color azul).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 26 de las muestras de rata, C-S (n=7), C-E (n=6), Ob-S (n=7) y Ob-E (n=6) en el caso del TAR, con respecto al cerebro, fue n=7 de C-S. Para realizar la PCR se utilizó el kit Epitect MSP de Qiagen

que contiene a la enzima HotStar Taq d-Tect polimerasa, que es una forma recombinante de 94 KDa de la Taq DNA polimerasa de Qiagen, esta modificación, previene la elongación de bases no complementarias en el extremo 3`del primer y adiciona 500 pb en 60 s. Se preparó un mix de reacción para cada par de primer y en tubos de PCR de 200 µl se hizo por reacción, de acuerdo con el volumen y la concentración del cuadro 6.6:

Reactivo	µl	Concentración final
Buffer MSP	10	1X
Primer F	0.5	0.3 µM
Primer R	0.5	0.3 µM
Muestra	4	250 ng
H2O	5	

Cuadro 6.6 Volumen y concentración utilizados para MSP del gen Lep.

Posteriormente en el termociclador de gradiente Techne Prime se estandarizó la temperatura adecuada de alineamiento, para cada par de primer, así como el tiempo [67]

y la temperatura de la etapa de extensión. Las condiciones finales se muestran en el cuadro 6.7.

ETAPA	TIEMPO	TEMPERATURA
Activación	10 min	95°C
Desnaturalización	30s	94°C
Alineamiento	30s	45-48°C
Extensión	30s	72°C
Extensión final	7min	72°C

Cuadro 6.7 Condiciones de la MSP para el gen Lep . La temperatura de alineamiento (T_m): 45°C para el par de primer U y 48°C al de los primer M

Posteriormente con los productos de la MSP se hizo una electroforesis en un gel de agarosa 2%, para lo cual, se utilizó 1g de agarosa, 5 ml de TAE 10X, 45 ml de agua desionizada y 2 µl de ATCGene HydraGreen™; la fase móvil para la electroforesis fue TAE 1X; en la figura 6.4 se muestran los posibles resultados de un análisis de metilación con la técnica MSP.

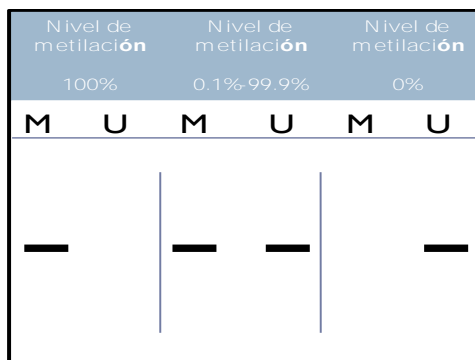


Figura 6.4 Resultados de electroforesis probables con la técnica de MSP

Para evaluar si el producto amplificado corresponde al esperado se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) Axygen®, en este caso fue de 100 a 3000 pb, ya que el producto amplificado fue de 101 pb. Los geles se observaron en un fotodocumentador con luz UV Gel-Imager Life Technologies. Las imágenes fueron evaluadas por densitometría con el software ImageStudioLite.

Se realizó el cálculo de % de alelos metilados por medio de la fórmula:

$$\text{índice de metilación} = \frac{M}{M + U} * 100$$

6.4 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se empleó el programa Graphpad Prism 7. Los datos se presentan como la media ± SE. Para evaluar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba estadística ANOVA de 2 vías seguida de la prueba *post hoc* Tukey. En el caso de las diferencias entre el grupo Ob-S y Ob-E en los parámetros de peso corporal, peso relativo y glucosa se utilizó la prueba estadística U de Mann

Whitney. Para evaluar la relación del cambio en la concentración de leptina con el porcentaje de metilación y el peso relativo del tejido adiposo se realizó el coeficiente de correlación de Pearson. Se indicó diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

- *Medida antropométrica*

7.1 Peso corporal

Para evaluar el desarrollo de obesidad se pesó a las ratas diariamente durante todo el protocolo. Los grupos Ob-S y Ob-E incrementaron el peso corporal de forma significativa. El mes de ejercicio disminuyó significativamente el peso en el Ob-E con respecto al Ob-S, mientras que el grupo C-E no mostró diferencia con el grupo C-S. (Figura 7.1).

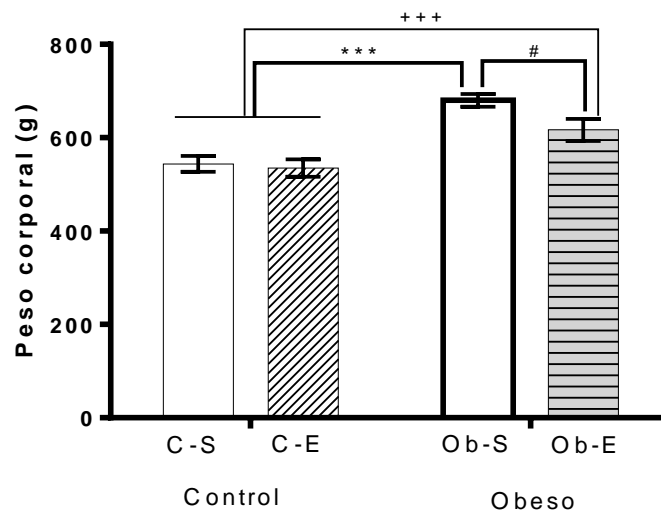


Figura 7.1 Peso corporal. Se realizó un promedio de los pesos de los animales de acuerdo a su condición. C-S: control sedentario, OB+S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. *** $p < 0.001$ Ob-S vs (C-S, C-E), +++ $p < 0.001$ Ob-E vs (C-S, C-E) y # $p < 0.05$ Ob-E vs Ob-S. (n = 11-12). (n = 11-12)

7.2 Peso relativo (tejido adiposo retroperitoneal /Peso corporal) (TAR/PC)

El peso relativo (TAR/PC) incrementó de forma significativa en el grupo Ob-S con respecto a los controles. El ejercicio disminuyó de manera significativa esta proporción entre el grupo Ob-E y el Ob-S (Figura 7.2).

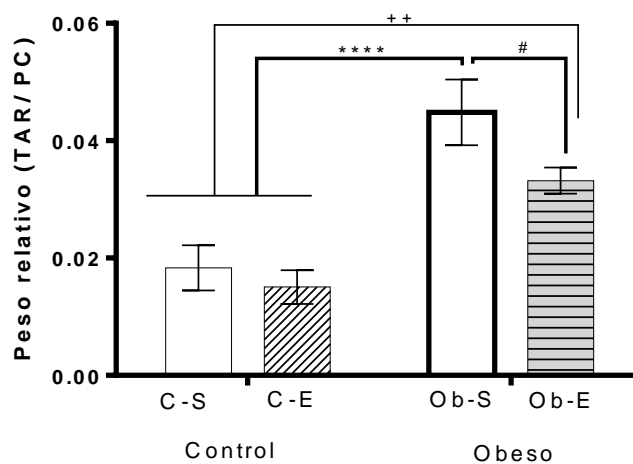


Figura 7.2 Peso relativo TAR/PC. Para su evaluación se pesó el tejido adiposo retroperitoneal y se dividió entre el peso corporal. C-S: control sedentario, OB+S: obeso sedentario, C+E: control ejercicio y OB+E: obeso ejercicio. **** $p < 0.0001$ Ob-S vs (C-S, C-E), ++ $p < 0.01$ Ob-E vs (C-S, C-E) y # $p < 0.05$ Ob-E vs Ob-S. (n = 11-12)

- *Determinación de parámetros bioquímicos*

7.3 Colesterol

LA DAG incrementó la concentración de colesterol de forma significativa en los grupos Ob-S y Ob-E con respecto a los C-S y C-E. El mes de ejercicio no disminuyó el colesterol total en los grupos C-E y Ob-E con respecto a los grupos sedentarios. (Figura 7.3).

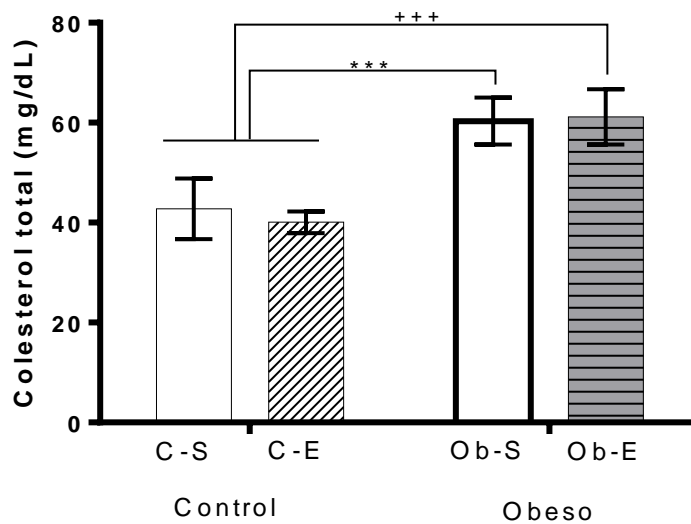


Figura 7.3 Cuantificación de colesterol total. Por medio de la técnica enzimático-colorimétrica se evaluó su concentración en suero. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. *** $p < 0.001$ Ob-S vs (C-S, C-E) y +++ $p < 0.05$ Ob-E vs (C-S, C-E). (n = 11-12)

7.4 Triglicéridos

La concentración de triglicéridos incrementó de forma significativa en el grupo Ob-S con respecto a los controles (C-S y C-E). En el grupo Ob-E disminuyó su concentración de forma significativa con respecto al grupo Ob-S y en el grupo C-E no cambiaron sus niveles con respecto al C-S (Figura 7.4).

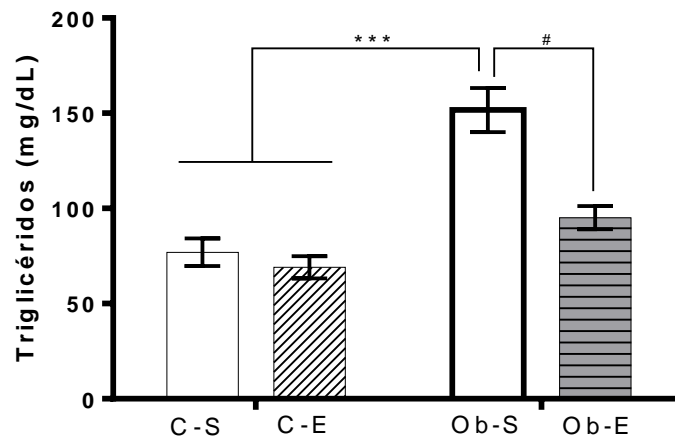


Figura 7.4 Cuantificación de triglicéridos. Por medio de la técnica enzimático-colorimétrica se evaluó su concentración en suero. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. *** $p < 0.01$ Ob-S vs (C-S, C-E) # $p < 0.05$ Ob-E vs Ob-S. (n = 11-12)

7.5 Glucosa

La obesidad inducida por la DAG durante los 3 meses del protocolo no modificó los valores de glucosa entre los grupos C-S, C-E y Ob-S. Pero si la concentración de glucosa en el grupo OB-E con respecto a los grupos C-S, C-E y Ob-S (Figura 7.5).

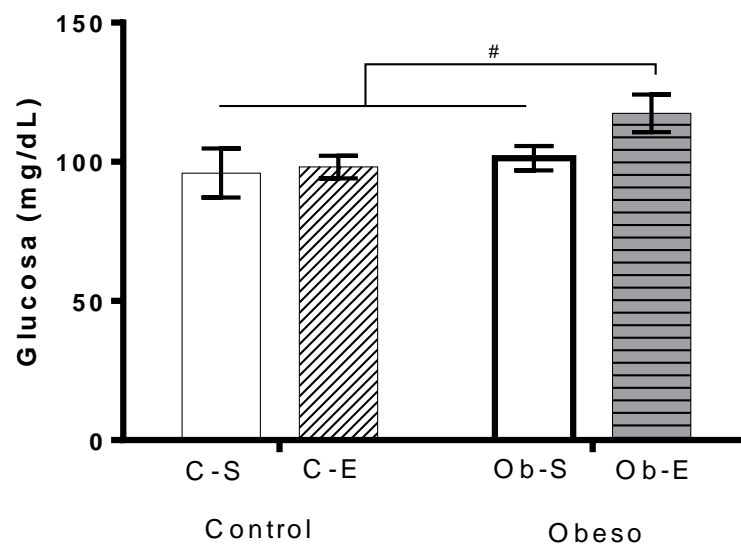


Figura 7.5 Cuantificación de glucosa. Por medio de la técnica enzimático-colorimétrica se evaluó su concentración en suero. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. # $p < 0.05$ Ob-E vs Ob-S, C-E, C-S (n = 11-12)

- *Determinación de insulina, adiponectina y leptina*

7.6 Insulina

La concentración de insulina en suero aumentó significativamente con la DAG en el grupo Ob-S con respecto a los grupos C-S y C-E. En el grupo Ob-E disminuyó de forma significativa después del mes de ejercicio con respecto al grupo Ob-S. No hubo cambios en los grupos controles (C-S y C-E) (figura 7.6).

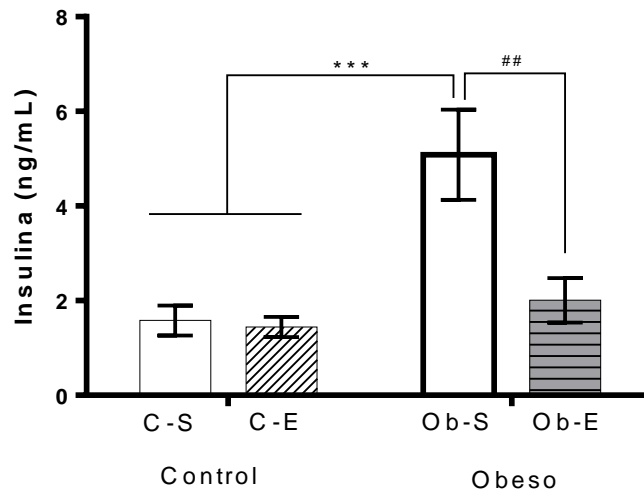


Figura 7.6 Concentración de Insulina. Determinada por la técnica ELISA. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. *** $p < 0.001$ Ob-S vs (C-S, C-E) y ## $p < 0.01$ Ob-E vs Ob-E. (n = 11-12).

7.7 Índice HOMA-RI

Este parámetro incrementó de forma significativa en el grupo Ob-S con respecto a los grupos C-S y C-E. Después de un mes de ejercicio del grupo Ob-E el índice HOMA disminuyó significativamente con respecto al grupo Ob-S; por lo que se sugiere que la DAG produce resistencia a la insulina (RI) en estos animales. Los grupos C-S y C-E no presentaron cambios como se esperaba. (Figura 7.7).

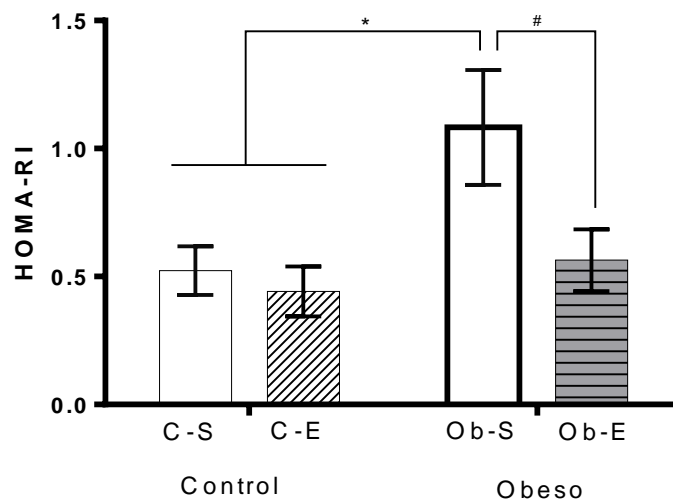


Figura 7.7 Evaluación de resistencia a la insulina. Se utilizó el índice HOMA-RI, el cual, toma en cuenta la concentración de glucosa e insulina en ayuno. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. *** $p < 0.001$ DAG vs DE, ## $p < 0.01$ Ob-S vs C-S, + $p < 0.05$ Ob-E vs Ob-S. (n = 11-12).

7.8 Adiponectina

La adiponectina mostró un incremento significativo en el grupo Ob-S con respecto al C-S y C-E. Este incremento disminuyó después de un mes de ejercicio en el grupo Ob-E con respecto al grupo Ob-S. En el caso de los grupos C-S y C-E no hubo cambios. (Figura 7.8).

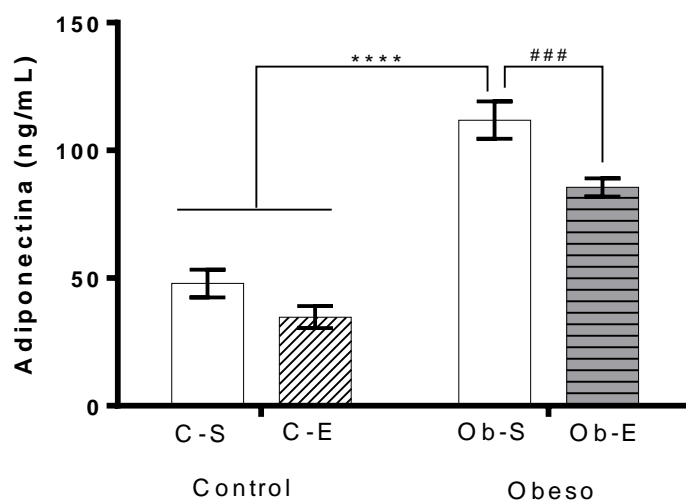


Figura 7.8 Concentración de Adiponectina. Determinada por la técnica ELISA. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. **** $p < 0.0001$ Ob-S vs (C-S, C-E) y ### $p < 0.001$ Ob-E vs (C-S, C-E). (n = 11-12)

7.9 Leptina

La concentración de leptina aumentó de forma significativa en el grupo Ob-S con respecto al C-S y C-E. El ejercicio en el grupo Ob-E disminuyó significativamente la concentración de leptina en suero, observándose un comportamiento similar al de la insulina. Con respecto al grupo C-E el ejercicio no produjo cambios (Figura 7.9).

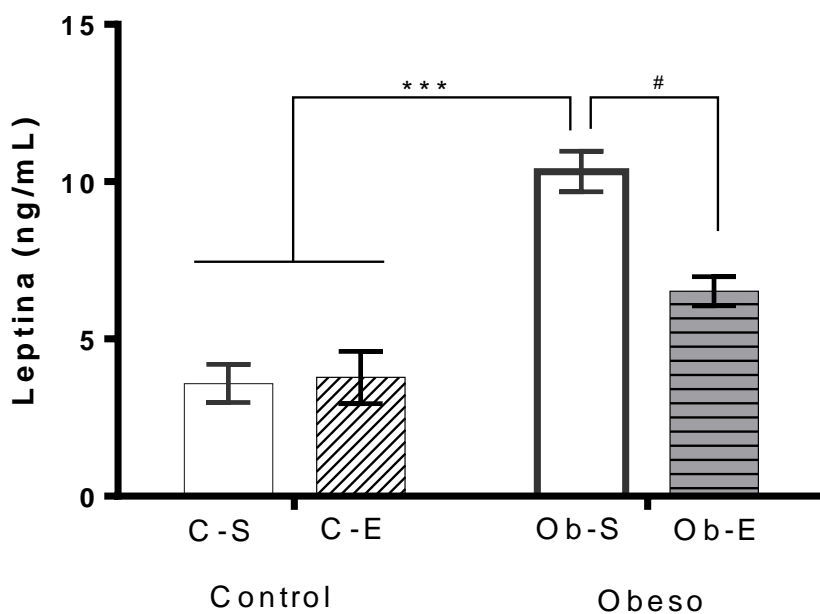


Figura 7.9 Concentración de Leptina. Determinada por la técnica ELISA .C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio *** $p < 0.001$ Ob-S vs (C-S, C-E) y # $p < 0.05$ Ob-E vs Ob-S. (n = 11-12)

7.10 Metilación del gen Lep

El porcentaje de metilación de la región analizada del gen Lep no cambia entre el TA y el cerebro. Este porcentaje tampoco mostró diferencias entre los grupos que recibieron DAG con respecto a los que tuvieron DE ni en los grupos de ejercicio con respecto a los sedentarios (C-S, C-E, Ob-S y Ob-E) (Figura 7.10 y 7.11).

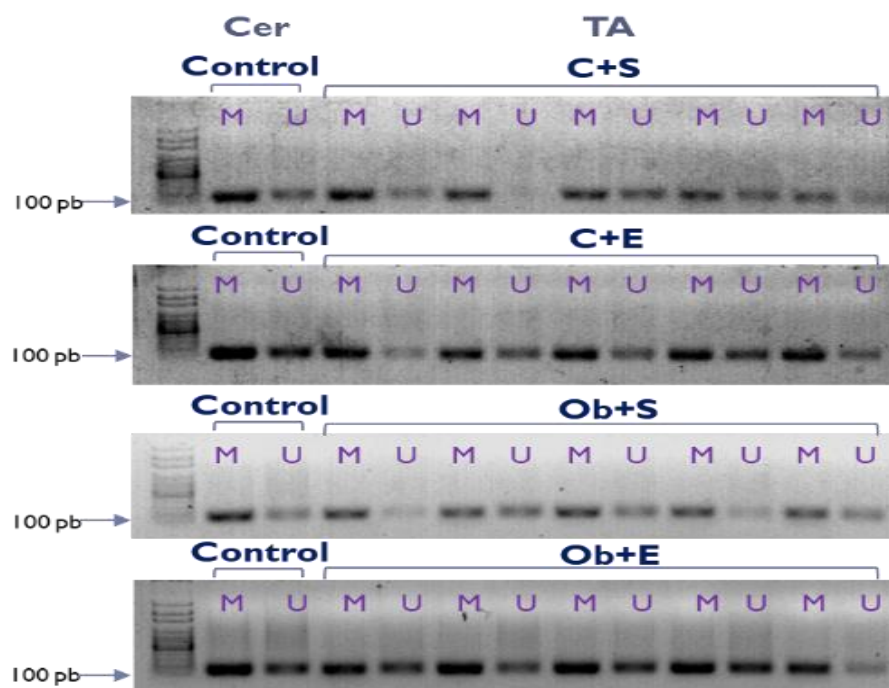


Figura 7.10 Metilación del gen Lep. Análisis de metilación en un gel de agarosa 2% donde se utilizó el DNA extraído de cerebro (Cer) como control con respecto al tejido adiposo (TA) de forma cualitativa con la técnica MSP. M producto de los primer para DNA metilado, U producto de los primer diseñados para DNA no metilado, ambos de 101 pb; del lado izquierdo el marcador de peso molecular que va de 100-3000 pb. (C+S) control sedentario, (C+E) control ejercicio, (Ob+S) obeso sedentario, (Ob+E) obeso ejercicio, n= 6

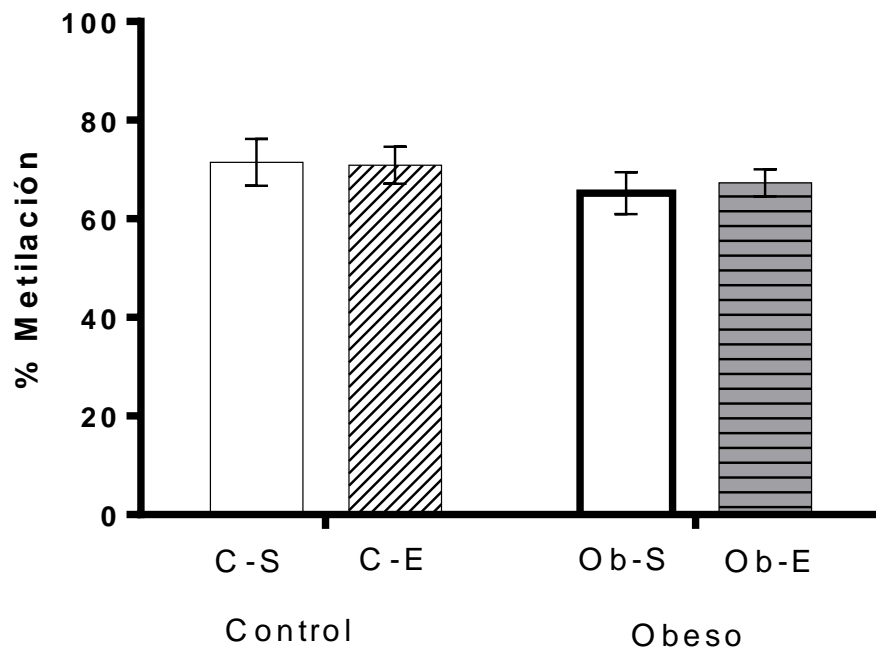


Figura 7.11 Porcentaje de Metilación. Análisis por densitometría con el software ImageStudioLite. C-S: control sedentario, OB-S: obeso sedentario, C-E: control ejercicio y OB-E: obeso ejercicio. (n = 6-7)

El porcentaje de metilación se asocia con la expresión y concentración del gen de interés, por lo que se realizó un análisis de correlación de Pearson, para evaluar si existe una relación entre los cambios de concentración de leptina en los diferentes grupos con respecto al porcentaje de metilación. (Figura 7.12).

Correlación. Los cambios en la concentración de leptina no están asociados al porcentaje de alelos metilados del gen Lep (Figura 7.12).

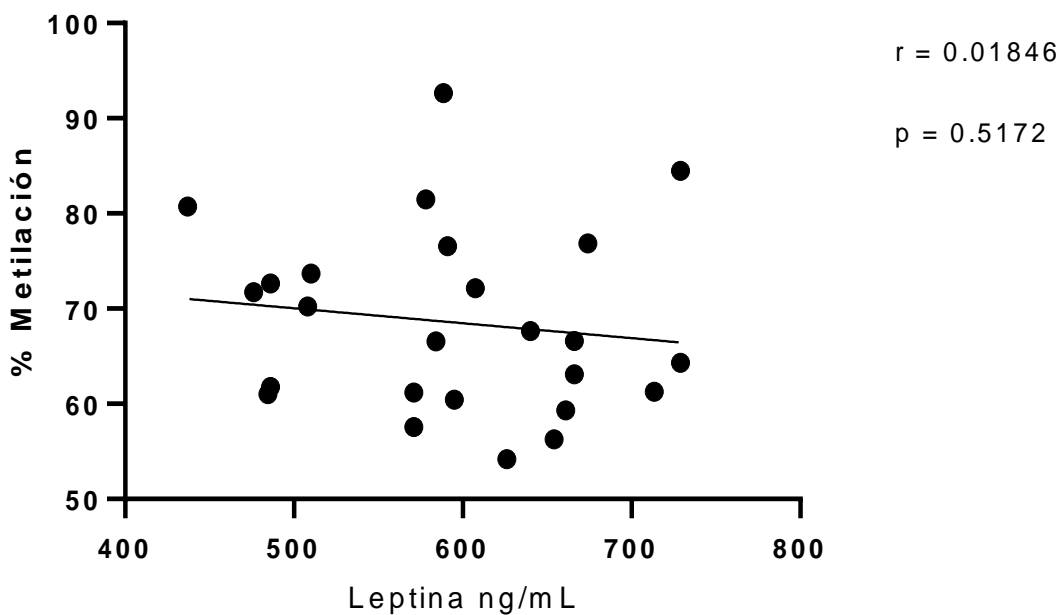


Figura 7.12 Cambio en concentración de leptina y su correlación con porcentaje de metilación. Análisis de correlación de Pearson entre el porcentaje de metilación y la concentración de leptina en suero. Se incluyen todos los grupos (C-S, C-E, Ob-S y Ob-E). (n=6-7).

El incremento de las adipocinas; leptina y adiponectina con la DAG puede estar asociada al incremento en la proporción del TA, el cual se midió al calcular la relación entre el peso del TAR y el PC (TAR/PC), por lo que se analizó si había una correlación entre estos parámetros.

Correlación la concentración de leptina en suero y el peso relativo TAR/PC. En la figura 7.13, se muestra, que el incremento de la concentración de leptina en suero se correlaciona de forma positiva con el aumento en la relación de TAR/PC.

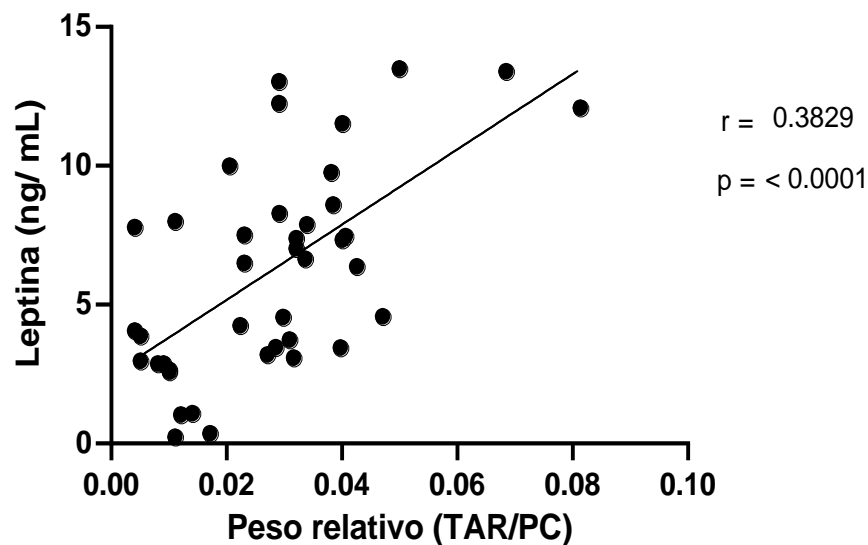


Figura 7.13 Cambio en el peso relativo y su correlación con la concentración de leptina. Análisis de correlación de Pearson entre la concentración de leptina y la relación del TAR/PC. Se incluyen todos los grupos (C-S, C-E, Ob-S y Ob-E). n=46.

Correlación entre el PC y la concentración de adiponectina en suero. En la figura 7.14, se muestra, que el incremento de la concentración de adiponectina en suero se correlaciona de forma positiva con el peso relativo del TAR/PC.

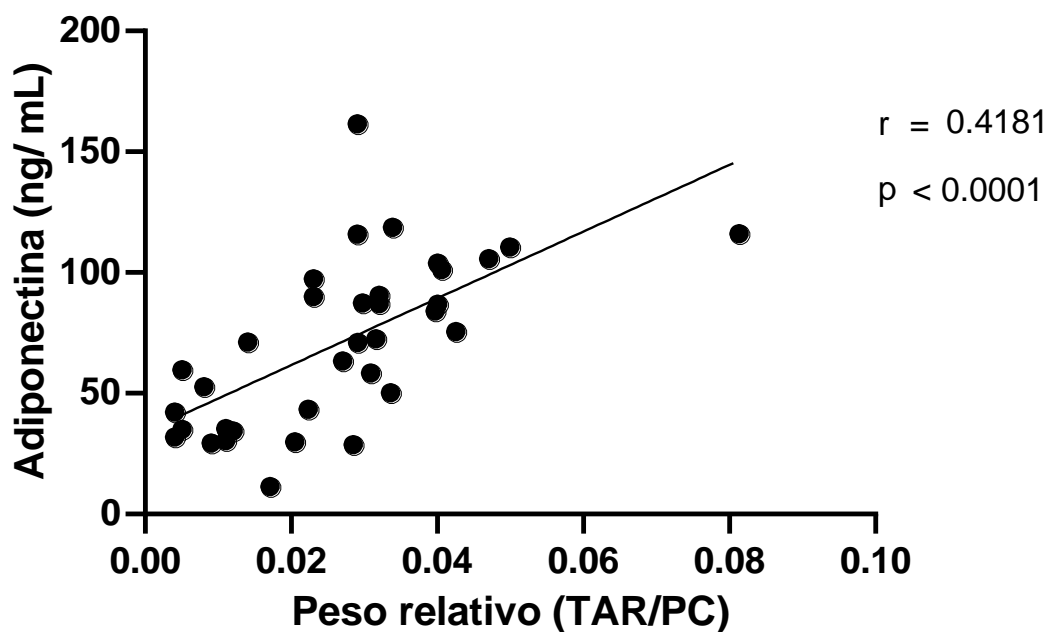


Figura 7.14 Cambio en el peso relativo y su correlación con la concentración de leptina. Análisis de correlación de Pearson entre la concentración de adiponectina y la relación del TAR/PC. Se incluyen todos los grupos (C-S, C-E, Ob-S y Ob-E) n=46.

8. DISCUSIÓN

Las dietas altas en grasa pueden producir diversas alteraciones asociadas a la obesidad en diferentes modelos animales, ya que el consumo de lípidos a diferencia de los carbohidratos, no inducen su propia oxidación (Schrauwen y Westerterp, 2000) y de acuerdo con el modelo establecido, se observa que la DAG de la cual el 45% de Kcal proviene de lípidos, induce un incremento de peso corporal significativo de forma general en los grupos obesos. En lo que respecta al ejercicio, se sabe que existen controversias en si éste induce disminución del peso corporal (Ross, *et al.*, 2000; Thomas, *et al.*, 1996). En el presente estudio se determinó que el ejercicio aeróbico moderado durante cuatro semanas disminuyó de forma significativa el peso corporal en el grupo Ob-E con respecto al grupo Ob-S, esto concuerda con los resultados obtenidos por Gollisch, *et al.*, en 2009, en donde 1 mes de ejercicio disminuyó el peso corporal. De acuerdo con los datos reportados por Kanzleiter y cols. en 2014, el peso corporal no cambió de forma significativa después de 4 semanas de ejercicio, sin embargo, la masa grasa disminuye, mientras que la masa magra aumenta. En este trabajo, aunque no se llevó a cabo un análisis sobre el efecto del ejercicio sobre el ME, se comprobó que la proporción del TAR con respecto al peso corporal disminuyó significativamente en el grupo Ob-E. El tipo de ejercicio que se llevó a cabo fue aeróbico y de acuerdo con Kang, *et al.*, 2013; Shin, *et al.*, 2015 y Araujo, *et al.*, 2018, se puede clasificar de intensidad moderada, ya que, bajo dos diferentes métodos de evaluación de intensidad, la velocidad de 12 m/min a 18 m/min, se encuentra en ese rango, cuando se ejercitan ratas obesas; ya que lo reportado en ratas normopeso la intensidad baja es de 18-20 m/min, moderada 26-28 m/min y alta 34 m/min (Jun, *et al.*, 2014; Garekani, *et al.*, 2011; Ghanbari-Niaki, *et al.*, 2010). El tipo de ejercicio que se implementa con mayor frecuencia en estudios clínicos en sujetos con alguna enfermedad metabólica es el aeróbico moderado (Seo, *et al.*, 2014; Thompson, *et al.*, 2012). En este tipo de

ejercicio se ha determinado que la adrenalina y el Ca^{2+} incrementan, lo cual está relacionado con la fosforilación de la LSH, y probablemente la fosforilación de la perilipina y de la triacilglicerol lipasa del tejido adiposo (ATGL del inglés *Adipose Tissue Triacylglycerol Lipase*) por parte de la ADP cinasa, de forma colectiva se incrementa la oxidación de los triglicéridos intramusculares, llevando así, a una disminución en el almacenamiento de lípidos por consecuencia de sus alteraciones. Mientras que al aumentar la intensidad del ejercicio se ha observado que la LSH es fosforilada en sitios que inhiben su actividad y por tanto la oxidación de lípidos es menor (Spriet, 2014; Ringseis, *et al.*, 2015). Con respecto a la duración del ejercicio, existen estudios en modelos animales que lo implementan desde 4 semanas con variaciones en el tiempo durante cada sesión (Gollisch, *et al.*, 2009) hasta 8 semanas (Nebot, *et al.*, 2016; Araujo, *et al.*, 2018). Siendo suficientes 4 semanas para inducir cambios en la salud metabólica de los roedores.

El aumento del tejido graso inducido por el modelo de DAG, llevó a su vez a diferentes alteraciones asociadas con la obesidad, entre otras el incremento de insulina en suero. De acuerdo a la literatura, el incremento de insulina en suero se puede deber a mecanismos diferentes al de la estimulación por glucosa (Fu, *et al.*, 2014), lo cual explica el porqué, a pesar de no haber una hiperglucemia, la insulina incrementa de forma significativa, entre las razones está: 1) las células β pancreáticas poseen receptores GPR40 que son activados por AGL, éstos incrementan el Ca^{2+} intracelular y por ende la secreción de insulina y al haber un exceso de AGL se sobreestimula la secreción de insulina (Itoh, *et al.*, 2003), 2) resistencia a la leptina a nivel pancreático; en condiciones fisiológicas (2nM) la leptina induce una disminución en la secreción de insulina y no así, cuando existe un incremento en suero (Zhao, *et al.*, 1998) y 3) a una inhibición en la señalización de insulina en sus órganos blanco: hígado, TA y ME, debida al incremento de AGL

en la circulación (Shojaee-Moradie *et al.*, 2007). La secreción de insulina está regulada por otras moléculas, además de las ya mencionadas. Es una hormona con una importancia metabólica, ya que su liberación no sólo modula la concentración de glucosa en suero, sino, que modula la oxidación de lípidos en estado de ayuno, llevando a una acumulación de triglicéridos cuando hay un desbalance (Wilcox, 2005; Thompson, *et al.*, 2012). La RI puede ser causada por la acumulación ectópica de triglicéridos, es decir, en tejidos diferentes al TA (hígado y músculo esquelético). Gollisch y cols. en 2009 reportaron que los triglicéridos aumentaron en hígado, pero no en ME después de un mes de DAG. Este incremento fue menor en el grupo DAG+ ejercicio, lo cual coincide con los resultados obtenidos, mostrando que el ejercicio es fundamental para disminuir las alteraciones provocadas por la obesidad.

Por otro lado, no hubo cambios en la concentración de glucosa en suero en el grupo Ob-S. De acuerdo con el trabajo de Kang y cols. (2013) donde trabajaron con ratas Sprague Dawley macho obesas y Araujo *et al.*, 2018 que trabajó con ratas Wistar macho obesas concluyeron que en ratas con obesidad inducida por una DAG no se incrementa la concentración de glucosa plasmática, sin embargo, el ejercicio fue capaz de disminuir la glucemia en estos estudios. No así, en este trabajo, en donde se observó que la glucosa incremento de forma significativa en el grupo Ob-E, probablemente porque durante cada sesión de ejercicio hay un incremento de la glucosa plasmática y en el momento de la toma de muestra no había pasado tiempo suficiente para que el valor de glucemia fuera basal, en estudios en humanos se ha determinado que deben pasar entre 48 h y 72 h después de la última vez de ejercicio (Thompson, *et al.*, 2012; Shojaee-Moradie *et al.*, 2007), en este caso pasaron 24 h después del último día de ejercicio, por lo que se tendría que evaluar si incrementando el tiempo entre la toma de muestra y el ejercicio, no se observa el

aumento de glucosa. En estos animales que recibieron DAG incrementaron los triglicéridos (TG) y el colesterol total (Colt), lo cual se asocia con un mayor almacenamiento de TG y transporte de lípidos. En aquellos animales que hicieron ejercicio la disminución de TG se debe a que hay un mayor gasto energético, en donde incrementa la lipólisis en el TA y la β -oxidación en el ME (Cho, *et al.*, 2018). Mientras que el Colt no cambió, sin embargo, es necesario el análisis específico de colesterol de alta densidad (HDL) y de baja densidad (LDL).

De acuerdo con Fan y cols. en 2011, donde expusieron a ratones C57BL/6J a una dieta inductora de obesidad (DIO) caracterizada por tener una mayor proporción de grasas saturadas, determinaron que la leptina aumenta en sangre y es interpretado como un indicador del desarrollo de resistencia a la leptina, así como los cambios en los niveles hipotalámicos de ObRb, NPY y POMC. Además, de acuerdo con Kang y cols. en 2013, trece semanas de DAG inducen una resistencia a la leptina a nivel periférico, ya que disminuye la expresión de SOCS3 y ObRb en músculo e hígado y ocho semanas de ejercicio incrementa la expresión de ambos, mejorando el estado de resistencia a la leptina.

Conforme a estudios realizados por Casabiell y cols. (2000), se determinó en células del tejido adiposo omental de sujetos con sobrepeso que el metabolismo de insulina es uno de los factores que estimula la liberación de leptina a la circulación, por lo que se explica cómo es que un estado de hiperinsulinemia lleva al estado de hiperleptinemia. Por su parte, Ahren y cols. en 1997 en un estudio en ratones C57BL/6J explicaron que una DAG primero produce un estado de hiperinsulinemia, aproximadamente 1 mes después de haber iniciado la dieta y por esto, la leptina incrementa significativamente en suero, aproximadamente 1 mes después que el de insulina. De acuerdo con Tsiloulis y Watt en 2015, la disminución de estas

hormonas por el ejercicio se ha asociado con un incremento en la liberación de adrenalina, PNA, glucagón y cortisol, que son antagonistas de la insulina, por lo que disminuyen a ésta y a la leptina al incrementar la lipólisis y por tanto favorecer la disminución en el almacenamiento de triglicéridos en el TA.

La adiponectina, a diferencia de lo esperado, incrementó de forma significativa en el grupo Ob-S y disminuyó de igual manera en el grupo Ob-E. En el trabajo realizado por Gollisch, y cols. (2009) con un mes de DAG+ejercicio la adiponectina en suero disminuyó con respecto a los controles y al grupo con DAG, esto se correlacionó con la masa grasa en el TAV y TAS. De igual forma en este trabajo se observa una correlación positiva entre el cambio en el peso relativo del TAR/PC y la concentración de adiponectina como se muestra en la figura 7.14.

Aunque existen estudios que evalúan cambios en el porcentaje de metilación y expresión de genes del TA por el ejercicio (Rönn, *et al*, 2013; Fabre, *et al*, 2018) en ninguno se evalúa el gen Lep; por lo que en este trabajo se evaluaron sitios en la isla CpG más cercana al SST.

La hiperleptinemia es un estado característico de la obesidad que puede llevar a un estado de resistencia a la leptina, caracterizado por cambios en ObRb, POMC y NPY (Fan, *et al.*, 2011). Este incremento en la leptina puede estar mediado por cambios en la regulación de su expresión, dentro de los mecanismos que se asocian a la expresión de leptina se encuentra la metilación del DNA, ya que tejidos que no expresan esta hormona presentan un porcentaje de metilación mayor en comparación al TA (Stöger 2006; Zhang Q., *et al*, 2016). En este caso se evaluaron los sitios CpG -161, -207, -213 y -225 porque se encuentran cerca del SST y cambios en el estado de metilación de este sitio lo hace propenso a afectar la unión de factores de transcripción. Esto se llevó a cabo por medio de la técnica MSP. Se

utilizó este método por ser muy sensible y rápido, al poder detectar 1 alelo metilado entre 10,000 no metilados y por medio de la medición de densitometría se determinó el porcentaje de metilación (Shen y Waterland, 2007). Existen otros métodos de análisis que incluyen la secuenciación en el que se puede analizar cada sitio CpG de la región de interés, como lo son la pirosecuenciación, secuenciación con bisulfito alelo específico, enzimas de restricción y MALDI-TOF MS (Shen y Waterland, 2007), sin embargo, se requieren de equipos a los que no se tuvo acceso.

Con respecto a los resultados obtenidos, en este trabajo no hubo diferencia entre los grupos experimentales, esto nos lleva a proponer diferentes razones: que la región analizada no tenga actividad regulatoria en la expresión del gen de Lep, ya que cuando se evaluó esa misma región en cerebro, siendo un tejido que no expresa leptina, no se observaron diferencias en el porcentaje de metilación, que el tiempo e intensidad del ejercicio hayan sido insuficientes para, que sea otro mecanismo epigenético el que module los cambios en la concentración de leptina por el ejercicio, o que la técnica sólo identifica alelos completamente metilados o completamente no metilados, por lo cual, si hubo cambio en alguno de los sitios analizados inducidos por la DAG o el ejercicio, no es perceptible por este método. A su vez, en el análisis de correlación, no se observó una asociación entre el incremento o disminución de leptina en suero con el porcentaje de metilación de Lep en el TAR.

Aunque se sabe que de forma regular, la metilación del DNA se asocia con la represión de genes, existen algunas excepciones, en las que hay represión del gen en un estado de hipometilación, lo cual se debe a otra forma de regulación (modificación de histonas y/o RNAs nc) (Bird, 2002).

De acuerdo con Shen y cols. (2014) una dieta alta en grasa administrada en ratones C57BL/6J incrementó el porcentaje de metilación en los sitios CpG, la expresión de DNMT y disminuyó la unión de RNA polimerasa II a la región promotora del gen *Lep*; pero, la expresión del RNAm de leptina se incrementó de forma significativa. Por lo que proponen la interacción de otras modificaciones epigenéticas con la metilación del DNA por medio de MBD2, en las que incluyen a HDAC (deacetilasas de histonas) y HMT (metilasas de histonas) (Youngson y Morris, 2012; Shen, *et al.*, 2014). Por otro lado, Milagro y cols. en 2009 determinaron que en ratas alimentadas con dieta alta en grasa el porcentaje de metilación sólo cambió en el sitio CpG -441 de los 13 sitios analizados y éste se asoció con la disminución de leptina en suero, proponiendo que este sitio está asociado al factor de transcripción ARNT/HIF-1 β . En este trabajo se analizaron los sitios CpG (-161, -207, -213, -225) en la isla más cercana al SST, que no correspondieron a los evaluados en el trabajo de Milagro y cols. en 2009; en los cuales, no se encontraron cambios en el porcentaje de metilación en la región de interés, ni se correlacionó con la concentración de leptina. Por lo cual, se necesitan más estudios para determinar cómo afecta la alimentación con la DAG y el ejercicio a la metilación del promotor de este gen y a su vez, como regulan estos cambios la expresión del gen *Lep* y, si esto se correlaciona con la concentración de leptina en suero, además de evaluar otras modificaciones epigenéticas que se encuentren en la región reguladora del gen *Lep*. Dentro de estas modificaciones inducidas por dietas altas en grasa son el aumento de la actividad de las acetilasas de histonas: HDAC1, HDAC2 y HDAC6 (Shen, *et al.*, 2014), la disminución de la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y la disminución de la acetilación de la H3 e H4. (Lecoutre, *et al.*, 2017). Con respecto al ejercicio, se ha determinado, que es necesario un tipo de ejercicio moderado a intenso para producir cambios en la metilación del DNA (Barrès, *et al.*, 2012). Y se han evaluado otras modificaciones con importancia en la regulación de genes en el

ME como la disminución en la acetilación de la H3 y la expresión del miRNA mR-696 (Nakamura, *et al.* 2017; Voisin, *et al.* 2015). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el tipo de ejercicio, duración e intensidad para inducir cambios en la regulación de expresión de genes y para evaluar el tiempo que estas modificaciones permanecen después de un periodo prolongado sin realizar ejercicio.

9. CONCLUSIONES

Una DAG produjo un estado de obesidad después de dos meses; así como alteraciones asociadas a ésta.

Cuatro semanas de ejercicio aeróbico durante el tercer mes de dieta fueron suficientes para disminuir de forma significativa el peso corporal, el peso relativo TAR/PC y la mayoría de estas alteraciones, que incluyen la concentración de triglicéridos, adiponectina, leptina, insulina y el índice HOMA.

La DAG ni el ejercicio aeróbico durante cuatro semanas cambiaron el porcentaje de metilación en la región analizada utilizando la técnica MSP.

No se encontró correlación entre la concentración de leptina en suero y el porcentaje de metilación.

10. Perspectivas

- Realizar un análisis de metilación con mayor número de CpGs, para lo cual es necesario utilizar técnicas de secuenciación.
- Identificar otras regiones que puedan estar implicadas en la regulación del gen Lep.
- Determinar los factores de transcripción asociados a la región reguladora del gen Lep en rata.
- Evaluar si existen otros mecanismos epigenéticos asociados a los cambios en la concentración y expresión de leptina mediados por la DAG y el ejercicio.
- Incrementar el tiempo e intensidad del ejercicio.
- Evaluar otros genes implicados en el metabolismo, así como otros tejidos para evaluar el efecto del ejercicio.

REFERENCIAS

- Abi Khalil C. (2014). The emerging role of epigenetics in cardiovascular disease. *Ther Adv Chronic Dis*, 5(4): 178-187.
- Achari A.E. y Jain S.K. (2017). Adiponectin a therapeutic target for obesity, diabetes and endothelial dysfunction. *Int. J. Mol Sci*, 18(1321): 1-17
- Ahrén B., Månsson S., Gingerich R.L., y Havel P.J. (1997). Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol*, 273: R113-120.
- Ahrén B, y Havel PJ. (1999). Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol.*; 277(4 Pt 2): R959–66.
- Araujo H.M., Victório J.A., Valgas de Silva C.P., Sponton A.C.S., Vettorazzi J.F. y de Moraes C. (2018). Anticontractile effects of perivascular adipose tissue in thoracic aorta from rats fed a high fat diet: role of aerobic exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 45: 293-302.
- Ardenghi B.G., da Costa Viera J.L., Marcadenti de Oliveira A., Portal V.L. (2015) Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 61(1).
- Balistreri C.R., Caruso C., y Candore G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of inflammation*, 1-19.
- Bays H. y Scinta W. (2015). Adiposopathy and epigenetics: an introduction to obesity as a transgenerational disease. *Current Medical Research and Opinion*, 2059-2069. 31(11).

- Barrès R., Yan J., Egan B., Thue T.J., Rasmussen M., Fritz T., Caidahl K., Krook A, O’Gorman D. y Zierath J.R. (2012). Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab*, 405-411. 15.
- Barrès R., y Zierath J.R. (2016). The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nat Rev*, 1-11.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16: 6–21.
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A., Ye L., Lo J. C., Rasbach K. A., Almer B. E., Choi H. J., Long Z. J., Kajimura S., Zingaretti M.C., Vind F.B., Tu H., Cinti S., Højlund K., Gygi P.S., and Spiegelman M.B. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*; 481:463-468.
- Burgio E., Lopomo A., y Migliore L. (2014). Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. *Mol Biol Rep*, 42(4): 799-818.
- Casabiell X., Piñeiro V., De la Cruz L.F., Gualillo O., Folgar L., Diéguez C., y Casanueva F.F. (2000). Dual effect of insulin on in vitro leptin secretion by adipose tissue. *BBRC*, 22(2): 477-482.
- Chen Zhao-Xia y Riggs A.D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 286. 21: 18347-18353.
- Cho J., Kim D., Jang J., Kim J., y Kang H. (2018). Treadmill running suppresses the vulnerability of dopamine D2 receptor deficiency to obesity and metabolic complications: a pilot study. *J Exec Nutrition Biochem*, 22(3): 042-050.
- Combs, T.P.; Pajvani, U.B.; Berg, A.H.; Lin, Y.; Jelicks, L.A.; Laplante, M.; Nawrocki, A.R.; Rajala, M.W.; Parlow, A.F.; Cheeseboro, L. (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*, 145: 367–383
- Considine R.V., Caro J.F. (1997). Leptin and the regulation of body weight. *J. Biochem. Cell Biol*, 29 (11): 1255-1272.

- Costa M.O., Alonso-Aubin D.A., Patrocinio de Oliveira C.E., Candia-Luján R., y de Paz J.A. (2015). Métodos de evaluación de la composición corporal: una revisión actualizada de descripción, aplicación, desventajas y desventajas. *Arch Med Deporte*, 32(6): 387-394.
- Crujeiras A.B, Carreira M.C, Begoña Cabia, Andrade S, Amil M y Casanueva F.F. (2015). Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Rev Assoc Med Bras*, 72-80 61(1).
- ENSANUT. (2016). Página en red: <http://promocion.salud.gob.mx/>. Consultada en Julio de 2017.
- Egan B., y Zierath J. (2013). Exercise Metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, 17: 162-184.
- Fabre O., Ingerslev L.R., Garde C., Donkin I., Simar D. y Barrès R. (2018). Exercise training alters the genomic response to acute exercise in human adipose tissue. *Epigenomics*, 10(8): 1033-1050.
- Fan C., Liu X., Shen W., Deckelbaum R.J., y Qi K. (2011). The regulation of leptin, leptin receptor and pro-opiomelanocortin expression by n-3 pufas in diet-induced obese mice is not relate to the methylation of their promoters. *Nutrition and Metabolism*, 8: 31.
- Fernández-Tresguerres JA. Fisiología Humana. 4ta edición. McGraw Hill. Consultado en www.accessmedina.com en julio 2019.
- Ferraro E, Giammarioli A.M, Chiandotto S, Spoletini I y Rosano G. (2014). Exercise- induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 154-176. 21 (1).
- Fu Z., Gilbert ER., y Liu D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cells dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.*, 9(1): 25-53.
- Fuentes T., Santana A., Olmedillas H., Guadalupe A., Calbet J. AL., Guerra B. (2007). Señalización intracelular activada por leptina y su modulación por el ejercicio físico. *Archivos de medicina del deporte*, 41-47. XXVII (135).

- Fruebis J., Tsa T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain B.E., y Lodish HF. (2001) Proteolytic cleavage product 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acids oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc.Natl. Acad Sci U S A*, 98: 2005-2010.
- García-Hermoso A., Ceballos-Ceballos RJM., Poblete-Aro CE., Hackney AC., Mota J., y Ramírez-Velez R. (2017). Exercise, adipokines and pediatric obesity: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Inter J of Obesity*, 41: 475-482.
- Garekani E.T., Mohebbi H., Kraemer R.R., y Fathi R. (2011). Exercise training intensity/volume affects plasma and tissue adiponectin concentrations in the male rat. *Peptides*, 32: 1008-1012.
- Gesta S., Tseng Y-H., y Kahn C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131: 242-256.
- Ghanbari-Niaki A., Farshidi Z., y Fathi R. (2010). Effects of different endurance training intensities on resting levels of skeletal muscle and liver glycogen concentrations in male rats. *Int J Endocrinol Metab*, 8(2): 79-81.
- Giles S. H. Yeo. (2017) Genetics of obesity: can an old dog teach us new tricks. *Diabetologia*, 60:778-783.
- Gollisch KSC., Brandauer J., Jessen N., Toyoda T., Nayer A., Hirshman MF., y Goodyear LJ. (2009). Effects of exercise training on subcutaneous adipose tissue in normal and high fat diet fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: E495-E504.
- Goodpaster B.H. y Sparks L.M. (2017). Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab*, 25(5); 1027-1036.
- Hawley J.A, Hargreaves M, Joyner M.J. y Zierath J.R. (2014) Integrative Biology of Exercise. *Cell*, 159. 738-749.
- Ingalls AM, Dickie MM, y Snell GD. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, 41:317-8.
- Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi m., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., Tanaka Y., Uejima H., Tanaka H., Maruyama M., Satoh R., Okubo

- S., Kizawa H., Komatsu H., Matsumura F., Noguchi Y., Shinohara T., Hinuma S., Fujisawa Y., y Fujino M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*, 422: 173-176.
- Jéquier E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals of New York Academy of Sciences*, 967(1): 379-388.
 - Juge-Aubry C.E., Henrichot E., y Meier C.A. (2005). Adipose tissue: a regulator of inflamaton. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4): 547-566.
 - Jun JK, Lee WL, Park HG, Lee SK, Jeong SH, y Lee YR. (2014) Moderate intensity exercise inhibits macrophage infiltration and attenuates adipocyte inflammation in ovariectomized rats. *J Exerc Nutrition Biochem*; 18(1): 119-27.
 - Kajimura, S., Spiegelman, B. M. y Seale, P. (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab*, 22, 546–559.
 - Kang S., Kim KB., y Shin KO. (2013). Exercise training improve leptin sensitivity in peripheral tissue of obese rats. *BBRC*, 435: 454-459.
 - Kanzleiter T, Jähnert M, Schulze G, Selbig J, Hallahan N, Wolfgang S.R y Schürmann A. (2015). Exercise training alters DNA methylation patterns in genes related to muscle growth and differentiation in mice. *Physiol Endocrinol Metab*, 308: E912-E920.
 - Kaur Y., de Souza RJ., Gibson WT., Meyre D. (2017). A systematic review of genetic syndromes with obesity. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18: 603-634.
 - Kieffer T.J., Heller S.R., Leech C.A., Holz G.G., y Habener J.F. (1997). Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells. *Diabetes*, 46: 1087-1093
 - Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, Sers C, Horsthemke B, Lau S, Keil T, Lee YA, Gruters A y Krude H. (2012). An Alu element- associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genetics*, 8(3): 1-12.

- Kühnen P, Handke D, Waterland RA, Henning BJ, Silver M, Fulford AJ, Dominguez-Salas P, Moore SE, Prentice AM, Spranger AJ, Hinney A, Hebebrand J, Heppner FL, Walzer L, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A y Krude H. (2016). Interindividual variation in DNA methylation at a putative POMC metastable epiallele is associated with obesity. *Cell Metab.*, 24: 502-509.
- Leal V. de O., y Mafra D. (2013). Adipokines in obesity. *Clinica Chimica Acta*, 419: 87-94.
- Lecoutre S., Oger F., Pourpe C., Butruille L., Marousez L., Dickes-Coopman A., Laborie C., Guinez C., Lesage J., Vieau D., Junien C., Eberlé D., Gabory A., Eekhout J. y Breton C. (2017). Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Mol Metab*, 6: 922-930.
- López-Jaramillo P., Gómez-Arbeláez D., López López J., Martínez-Ortega J., Gómez-Rodríguez A., y Triana-Cubillos S. (2014). The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 18(1): 37-45.
- Marchi M, Lisi S, Curcio M, Barbuti S, Piaggi P, Ceccarini G, Nannipieri M, Anselmino M, Di Salvo C, Vitti P, Pinchera A, Santini F y Maffei M. (2011). Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics*, 1198-1206. 6 (10).
- Marks PA., Rifkind RA., Richon VM., Breslow R., Miller T. y Kelly WK. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews*, 2: 194-202.
- Martin S.S., Qasim A., y Reilly M.P. (2008). Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 52(15): 1201-1210.

- Marques-Oliveira G.H., Marques da Silva T., Lima W.G., Silva V.H.M., y Chávez V.E. (2018). Insulin as a hormone regulator of the synthesis and release of leptin by white adipose tissue. *Peptides Int Journal*, 1-49
- Masuzaki H., Hosada K., Ogawa Y., Shigemoto M., Satoh N., Mori K., Tamura N., Nishi S., Yoshimasa Y., Yamori Y., y Nakao K. (1995). Augmented expression of obese (ob) gene during the process of obesity in genetically obese-hyperglycemic Wistar fatty (fa/fa) rats. *FEBS*, 378: 267-271.
- Maury E., y Brichard SM., (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314(1): 1-16.
- McCleary-Wheeler AL., Lombark GA., Weiss FU., Schneider G., Fabbri M., Poshusta TL., Dusseti NJ., Baumgart S., Iovanna JL., Ellenrieder V., Urrutia R., y Fernández Zapico R.E. (2014). Insights into the epigenetics mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett*, 328(2): 212-221.
- McKinney L. (2013). Diagnosis and management of obesity. Leawood KS. *American Academy of Family Physicians (AAFP)*. 7,8 pp.
- Milagro F.I., Campi3n J., Garc3a D3az D.F., Goyenechea E., Paternain L., y Mart3nez J. (2009). High fat diet induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem*, 65(1): 1-10.
- Montague C.T., Prins J.B., Sanders L., Zhang J., Sewter C.P., Digby J., Byrne C.D., O'Rahilly S. (1998). Depot-Related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*, 47: 1384-1391.
- Nakamura K., Ohsawa I., Masuzawa R., Konno R., Watanabe A. y Kawano F. (2017). Running training experience attenuates disuse atrophy in fast-twitch skeletal muscles of rats. *J Appl Physiol*, 123: 902-913.
- Nedergaard J., y Cannon B. (2014). The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*, 20:396-407
- Nigro E, Scudiero O, Ludovica M.M, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A, y Daniele A. (2014). New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. *BioMed Research International*, 1-14.

- Nowacka-Woszek J, Pruszyńska-Oszmałek E, Szydlowski M, y Szczербal I. (2017). Nutrition modulates FTO and IRX3 gene transcript levels, but does not alter their DNA methylation profiles in rat White adipose tissues. *Gene*, 1-19.
- Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., y Walsh K. (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11 (2): 85-97.
- Palou A., Picó C., Bonet M.L., y Oliver P. (1998). The uncoupling protein, thermogenina. *Int. J Biochem Cell Biol*, 30(1). 7-11.
- Pedersen BK y Febbraio MA. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*; 8:457–465
- Perona J.S., Schmidt-Río Valle J., Rueda-Medina B., Correa-Rodríguez M., y González-Jiménez E. (2017). Waist circumference shows the highest predictive value for metabolic syndrome, and waist-to-hip ratio for its components, in Spanish adolescents. *Nutrition Research*, 13-31.
- Perrota F., Nigro E., Mollica M., Costigliola A., D`Agnano V., Daniele A., Bianco A., y Guerra G. (2019). Pulmonary hypertension and obesity: focused on adiponectin. *Int. J. Mol. Sci*, 20(912): 1-13.
- Qasim A, Turcotte M, de Souza R.J, Samaan M.C, Champredon D, Dushoff J, Speakman J.R. y Meyre D (2017). On the origin of obesity: identifying the biological environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *World Obesity Federation*, 1-29.
- Rao R.R., Long J.Z., White J.P., Svensson K.J., Lou J., Lokurkar I., Jedrychowski M.P., Ruas J.L., Wrann C.D., Lo J.C., Camera D.M., Lachey J., Gygi S., Seehra J., Hawley J.A., Spiegelman B.M. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*, 157:1279–1291
- Ringseis R., Eder K., Mooren F.C. y Krüger K. (2015). Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 21: 58:68.

- Rönn T, Volkov P, Davegardh C, DAyeh T, Hall E, Olsson A.H, Nilsson E, Tornberg A. Dekker N.M, Karl-Fredrik E, Jones H.A, Groop L y Ling Ch. (2013) A six months exercise intervention influences the genome wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLOS Genetics*, 9. 6: 1-16.
- Rosenwald M., Perdikari A., Rüllicke T., y Wolfrum C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipose tissue. *Nature Cell Biology*, 15 (6): 659-667.
- Ross R., Dagnone D., Jones PJH., Smith H., Paddags A., Hudson R., Janssen I. (2000). Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise induced weight loss in men: a randomized, controlled trial. *Ann Inter Med*, 133: 92-103.
- Saladin R., De Vos P., Guerre-Millo M., Leturque A., Girard J., Steals B., y Auwerx J. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 337: 527-529.
- Saely C.H., Geiger K., Drexel H. (2010). Brown versus white adipose tissue: a mini review. *Gerontology*, 58:15-23.
- Seo DY., Lee SR., Kim N., Ko KS., Rhee BD., y Han J. (2014). Humanized animal exercise model for clinical implication. *Eur J Physiol*, 466(9): 1673-1687.
- Schrauwen P., y Westertero K.R. (2000). The role of high fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *British Journal of Nutrition*, 84: 417-427.
- Sharma AM y Kushner RF. (2009) A proposed clinical staging system for obesity. *International Journal of Obesity*, 33, 289-295.
- Shen L., y Waterland R. Methods of DNA methylation analysis. (2007). *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10: 576-581.
- Shen W, Wang C, Xia L, Fan C, Dong H, Deckelbaum R.J, y Qi K. (2014). Epigenetic Modification of the Leptin Promoter in Diet-Induced Obese Mice and the Effects of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Scientific Reports*, 1- 7. 4 (5282).
- Shin KO., Bae JY., Woo J., Jang KS., Kim KS., Park JS., Kim IK., y Kang S. (2015). The effect of exercise on the expression of myokineand angiogenesis

mRNA in skeletal muscle of high fat diet induced obese rat. *J Exerc Nutr Biochem* 19(2): 91-98.

- Shojaee-Moradie F, Baynes KCR, Pentecost C, Bell JD, Thomas EL, Jackson NC, Stolinski M, Whyte M, Lovell D, Bowes SB, Gibney J, Jones RH, Umpleby AM. (2007) Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose metabolism. *Diabetologia* 50: 404 – 413.
- Smemo S, Tena J.J, Kyoung-Han K, Gamazon R.E, Sakabe N.J, Gómez-Martín C, Aneas I, Credidio F.L, Sobreira D.R, Wasserman N.F, Hee Lee J, Puvindran V, Tam D, Shen M, Joe Eun Son, Vakili N.A, Hoon-Ki S, Naranjo S, Avemel R.D, Manzanares M, Nagy A, Cox N.J, Chi-Chung H, Gomez-Skarmeta J.L. y Nóbrega M. (2014). Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*, 1-5.
- Spriet, L.L. (2014). New insights into the interaction of carbohydrate and fat metabolism during exercise. *Sports Med.* 44 (Suppl 1), S87–S96.
- Stanford K.I, Middelbeek R.J.W, y Goodyear L.J. (2015). Exercise effects on white adipose tissue: being and metabolic adaptations. *Diabetes*, 64: 2361-2368.
- Stöger R. (2006). In Vivo Methylation Patterns of the Leptin Promoter in Human and Mouse. *Epigenetics*, 155-162. 1 (4).
- Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, y Mattick JS. (2010). Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.*, 220: 126-139.
- Thomas EL., Brynes AE., McCarty J., Goldstone., Hajnal JV., Saeed N., Frost G., y Bell JD. (1996). Preferential loss of visceral fat following aerobic exercise, measured by magnetic resonance imaging. *Lipids*, 35: 769-776.
- Thompson D, Karpe F, Lafontan M, y Frayn K. (2012). Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol Rev*, 92: 157-191.
- Tsiloulis T y Watt M.J. (2015). Exercise and the regulation of adipose tissue metabolism. *Pro in Mol Bio and Trans Sci*, 1-27.

- Tsuzuki T., Shinozaki S., Nakamoto H., Kaneki M., Goto S., Shimokado K., Kobayashi H. y Naiyo H. (2015). Voluntary exercise can ameliorate insulin resistance by reducing iNOS- mediated S-nitrosylation of Akt in the liver in obese rats. *PLoS ONE*, 10(7): 2-16.
- Vazquez Vela M.E. (2006). Señalización de la leptina. *REB*, 25(2). 50-54
- Villarroya F., Cereijo R., Villarroya J., y Giral M. (2016). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13: 26-35.
- Virtanen KA., Lidell ME., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M., Laine J., Savisto NJ., Enerbäck S y Nuutila P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, 360: 1518-1525.
- Vliet-Ostapchouk J.V. van, Snieder H., y Lagou V. (2012). Gene-lifestyle interactions in obesity. *Curr Nutr Rep*, 1, 184-196.
- Voisin S., Eynon N., Yan X. y Bishop D.J. (2015). Exercise training and DNA methylation in humans. *Acta Physiol*, 213: 39-59.
- Watada Hirotaka y Tamura Yoshifumi. (2017). Impaired insulin clearance as cause rather than a consequence of insulin resistance. *Journal of Diabetes Investigation*, 8. 6:723-725.
- Wilcox G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26: 19-39
- Wolfgang S.R, Vogel H, y Schürmann A. (2013). Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Molecular metabolism*, 337-347.
- World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. Página en red: <https://www.who.int>. Consultada en agosto 2018.
- World Health Organization (WHO/Europe). Nutrition. Página en red: <http://www.euro.who.int>. Consultada en noviembre 2018.
- Wozniack E.S., Gee L.L., Wachtel S.M., y Frezza E.E. (2008). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*, 54:1847-1856.
- Youngson, N.A. y Morris, M.J. (2012). What obesity research tells us about epigenetic mechanisms. *Royal Society*, 8, 6-13.

- Zaina S., Pérez-Luque E.L., y Lung G. (2010). Genetics talks to epigenetics? The interplay between sequences variants and chromatin structure. *Current Genomics*,11:359-367.
- Zhang Y., Proanca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman JM., (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 (6505): 425-432.
- Zhang Q, Xu D, Zhang M, Dong X, Dong H. y Pan Q. (2016). Construction and Analysis of an Adipose Tissue-Specific and Methylation-Sensitive Promoter of Leptin Gene. *Appl Biochem Biotechnol*, 1-14.
- Zheng D., Jones J.P., Usala S.J. y Dohm G.L., (1996). Differential expression of ob mRNA in rat adipose tissue in response to insulin. *Biochem and Biophys Research Commu*, 218(0077): 434-437.
- Zhao A.Z., Bornfeldt K.E., y Beavo J.A. (1998). Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest*, 102: 869-873.
- Zouhal H., Jacob C., Delamarche P., Gratas-Delamarche A. (2008). Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med*, 38(5): 401-423.