

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ACEITE DE LINAZA SOBRE LA
EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA DESACOPLANTE 3
(UCP3) EN RATAS OBESAS”**

Presentada por:

CARMEN ROSA ASTUVILCA CUPE

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

LIMA-PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ACEITE DE LINAZA SOBRE LA
EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA DESACOPLANTE 3
(UCP3) EN RATAS OBESAS”**

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

Presentada por:

CARMEN ROSA ASTUVILCA CUPE

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Víctor Hidalgo Lozano
PRESIDENTE

Dr.Sc. María Villanueva Espinoza
PATROCINADOR

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
CO-PATROCINADOR

Ph.D. Carlos Vílchez Perales
MIEMBRO

MSc.DSP Haydee Cárdenas de Jurado
MIEMBRO

DEDICATORIA

- A mis padres queridos, Fidela y Juan por su apoyo incondicional
- A mis hermanos Juan y Germán, por su compañía en cada paso de mi vida
- A Jesús, el amor de mi vida
- A mis hijos perrunos por alegrarme todos los días

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, la doctora María Elena Villanueva Espinoza, por su apoyo durante toda la maestría.
- A los miembros de mi jurado: V. Hidalgo, H. Cárdenas, C. Vílchez y G. Gutiérrez por sus apreciaciones hacia la investigación.
- A CONCYTEC-FONDECYT por la beca de maestría y colaboración brindada hacia mi persona
- A la Universidad Nacional Agraria La Molina, por acogerme durante toda la maestría
- A mis amigas que me apoyaron durante la investigación.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1	Nutrigenómica.....	2
2.1.1	Relación con la expresión génica.....	2
2.2	Obesidad.....	2
2.2.1	Metainflamación.....	3
2.2.2	Prevalencia.....	4
2.3	Desacoplamiento mitocondrial.....	4
2.4	Proteínas desacoplantes.....	5
2.4.1	Proteínas desacoplantes 1 y 2.....	5
2.4.2	Proteína desacoplante 3.....	5
2.5	Factores de transcripción.....	7
2.6	Dieta obesogénica.....	8
2.7	Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).....	8
2.7.1	PUFAs ω -3.....	9
2.7.2	Aceite de linaza.....	10
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1	Lugar y duración del experimento.....	11
3.2	Material biológico.....	11
3.3	Instalaciones y equipo.....	11
3.4	Alimentación.....	11
3.5	Periodos.....	12
3.6	Parámetros de evaluación.....	13
3.6.1	Peso de animales.....	13
3.6.2	Medidas morfológicas.....	13
3.6.3	Perfil lipídico sanguíneo.....	14
3.7	Protocolo de anestesia y eutanasia.....	14
3.8	Procedimiento molecular.....	14
3.8.1	Aislamiento de ARN.....	14
3.8.2	Cuantificación de ARN.....	15
3.8.3	Electroforesis.....	15
3.8.4	Limpieza de trazas de ADN.....	15
3.8.5	Retrotranscripción reversa.....	16

3.8.6	PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR)	16
3.8.7	Cebadores utilizados	17
3.8.8	Cuantificación relativa	18
3.8.9	Curvas de estandarización	18
3.9	Expresión génica	19
3.10	Análisis estadístico	19
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1	Consumo de alimento y peso corporal	20
4.2	Perfil lipídico sanguíneo	21
4.3	Cuantificación relativa mediante el método comparativo de Ct	23
4.4	Expresión relativa del ARNm UCP3	23
V.	CONCLUSIONES	25
VI.	RECOMENDACIONES	26
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Composición nutricional del alimento base para ratas	13
Cuadro 2:	Condiciones del termociclador para la retrotranscripción	16
Cuadro 3:	Condiciones de amplificación en PCR en tiempo real	17
Cuadro 4:	Secuencias, tamaño del producto y T°Melting de los genes	17
Cuadro 5:	Datos de estandarización de genes UCP3, B actina y 18S	18
Cuadro 6:	Consumo de alimento y peso corporal después de 59 días	21
Cuadro 7:	Peso y perfil lipídico después de 30 días de inducción a la obesidad en ratas	21
Cuadro 8:	Perfil lipídico después de 59 días de la suplementación con aceite de linaza en ratas	22
Cuadro 9:	Expresión relativa del grupo tratamiento (aceite de linaza) y grupo control	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva estándar de genes	19
Figura 3: Nivel de expresión relativa del gen <i>UCP3</i> en los grupos control y tratamiento	23

RESUMEN

El impacto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la serie omega 3 sobre la obesidad ha sido reportado en diversas investigaciones; sin embargo existe poca información del efecto dietético de los PUFAs sobre la expresión génica de ciertas proteínas desacoplantes de la fosforilación oxidativa (UCPs) que juegan un rol importante en el metabolismo lipídico. El objetivo de la investigación fue determinar el efecto del aceite de linaza como fuente de PUFA sobre la expresión del gen *UCP3* en ratas inducidas a obesidad. Se utilizaron 24 ratas adultos machos Holtzman de la UNALM. La fase experimental constó de 2 etapas. En la primera etapa (30 días), las ratas recibieron una dieta obesogénica para inducir obesidad y se evaluaron los parámetros c-HDL con el Test de student para muestras apareadas y el nivel de triglicéridos con la prueba no paramétrica de Wilcoxon, determinándose que sólo los niveles de triglicéridos tuvieron diferencia significativa. En la segunda etapa (59 días), 12 ratas recibieron dieta obesogénica y las otras 12 ratas recibieron la misma dieta modificada más aceite de linaza vía oral (1 ml/kg p.v) y al final de este periodo no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de c-HDL ni de triglicéridos. Por último, se evaluó la expresión del ARNm *UCP3* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) en tejido muscular encontrándose que la expresión del gen *UCP3* se expresó 4 veces más en el grupo tratamiento (aceite de linaza) que en el grupo control, mostrando diferencias significativas con el Test de student. Se concluyó que la suplementación con aceite de linaza rico en omega 3 juega un rol importante en la expresión del gen *UCP3* en ratas que recibieron una dieta obesogénica.

Palabras clave: PUFAs, obesidad, proteína desacoplante, expresión, gen *UCP3*.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of flaxseed oil as a PUFA source on the UCP3 gene expression in rats induced to obesity. Twenty four adult male Holtzman rats of the UNALM bioterium were used. The experimental phase consisted of 2 stages. In the first phase (30 days), the rats received an obesogenic diet to induce obesity and the c-HDL parameters were evaluated with the Student's test for paired samples and the level of triglycerides with the non-parametric Wilcoxon test, determining that only triglyceride levels had significant difference. In the second phase (59 days), 12 rats received obesogenic diet and the other 12 rats received the same modified diet plus flaxseed oil orally (1 ml/kg b.w); however, no significant differences were observed in the concentrations of c-HDL or triglycerides. Finally, the UCP3 mRNA expression was evaluated by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) in muscle tissue, finding that UCP3 gene expression was expressed 4 times more in the treatment group (flaxseed oil) than in the control group, showing significant differences with the Student's test. It was concluded that the supplementation with omega 3 rich flaxseed oil plays an important role in the UCP3 gene expression in rats that received an obesogenic diet.

Key words: PUFAs, obesity, expression, UCP3 gene.

I. INTRODUCCIÓN

Los nutrientes de una dieta pueden modificar la expresión de genes relacionados con diversas patologías en el ser humano. Uno de los mayores problemas en la actualidad es la obesidad, la cual es definida como un desorden multifactorial ya que involucra factores genéticos y ambientales; en éstos últimos la dieta cumple un rol importante debido al consumo excesivo de grasas saturadas, azúcares y carbohidratos. Por eso se buscan alternativas que reduzcan esta situación; una de ellas puede ser la suplementación con aceite de linaza, rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

Se conoce que los PUFAs, principalmente de la serie omega 3, presentes en aceites vegetales, tienen múltiples efectos beneficiosos para la salud humana, ya que pueden modificar positivamente los niveles séricos de colesterol y triglicéridos; así como también, el metabolismo lipídico, al inducir la expresión de ciertas proteínas desacoplates denominadas UCP por sus siglas en inglés “*Uncoupling proteins*”. Las UCP son una familia de proteínas transportadoras mitocondriales que participan en el control del gasto energético, termogénesis y regulación de ácidos grasos; dentro de este grupo tenemos la UCP3 que se encuentra mayormente expresada en músculo y puede participar regulando la oxidación de ácidos grasos e influyendo en la reducción de peso. Sin embargo, el mecanismo de acción y la expresión génica sobre estos efectos es aún incierto.

Por eso, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la suplementación con aceite de linaza sobre la expresión del gen *UCP3* en ratas Holtzman inducidas a obesidad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Nutrigenómica

La nutrigenómica es una ciencia que estudia cómo es que la nutrición o la dieta influyen en las vías metabólicas, control homeostático y la expresión de la composición genética de un individuo. Básicamente, se enfoca en los efectos dietéticos sobre la estabilidad del genoma, cambios en el epigenoma, expresión del ARN y proteínas. Es decir, permite desarrollar nuevas estrategias nutricionales para mejorar la salud de las personas que presentan enfermedades como la obesidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares (Afman y Muller 2012; Berná et al. 2014).

2.1.1 Relación con la expresión génica

El efecto de la dieta en la salud requiere el estudio de los mecanismos de acción de nutrientes y otros constituyentes bioactivos de alimentos a nivel molecular. Estos nutrientes pueden afectar la expresión génica de diversas maneras y en distintos órganos; directamente, como ligandos para los factores de transcripción, a través de metabolitos que interfieren en la concentración de productos y a través de moléculas que actúen sobre las vías de señalización (Müller y Kersten 2003; Berná et al. 2014).

Aunque la mayoría de los nutrientes presentes en los alimentos tienen actividad biológica específica, se sabe poco sobre sus funciones moleculares y los procesos biológicos involucrados (Mizoguchi et al. 2008).

2.2 Obesidad

La obesidad es un problema de salud pública en muchas partes del mundo y un factor de riesgo significativo para el aumento de morbilidad y mortalidad; principalmente porque se asocia a múltiples comorbilidades, como las enfermedades cardiovasculares (ECV), cánceres, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial, siendo las dos últimas las de mayor riesgo (Haidar y Cosman 2011 y Mandal 2014). Es caracterizada por una acumulación excesiva de grasa corporal que resulta de un desbalance entre el consumo

y el gasto energético (Moustafa y Froguel 2014). Los factores que desencadenan este problema son factores genéticos y ambientales (Drummond y Gibney 2013), de manera importante lo es el medio ambiente, particularmente por una sobreabundancia de alimentos hiperenergéticos, altamente palatables y de fácil adquisición, así como también, la inactividad física, por la alta tecnificación y reducción de las actividades manuales (Keith et al. 2006). Sin embargo, no todas las personas expuestas al mismo ambiente obesogénico desarrollan obesidad y en tal aspecto la predisposición genética desempeña un rol clave (Choquet y Meyre 2011).

2.2.1 Metainflamación

Es una inflamación crónica leve, que es la causa principal de las respuestas inadaptadas a la obesidad. La inflamación está ligada a distintas patogénesis, por tanto crea un problema común que hace que la obesidad se vincule con diversas enfermedades, principalmente diabetes mellitus 2 y enfermedades cardiovasculares, que a su vez comparten un ambiente metabólico caracterizado por la resistencia a la insulina (Steven et al. 2006).

La acumulación lipídica en adipocitos puede iniciar un estado de estrés celular y activación de vías de señalización inflamatoria como las citoquinas inflamatorias, dentro de las cuales tenemos al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina-1 β (IL-1 β) y la resistina. Los adipocitos blancos también pueden producir leptina, hormona reguladora de la producción de adipocinas, ésta aumenta su producción durante la obesidad y genera la estimulación de síntesis de resistina y factores proinflamatorios ya mencionados (Smitka et al. 2015), que a su vez pueden inhibir la señalización de la insulina. Por otro lado, se ha demostrado que una reducción en el peso corporal conduce a una mayor expresión de adipocinas antiinflamatorias concomitantes con una disminución en la resistencia a la insulina y en los niveles de citoquinas proinflamatorias (Shah et al. 2008).

La acumulación de macrófagos (célula del sistema inmunitario) en adipocitos se da por un metabolismo anormal de grasas durante la obesidad, después del aumento de la adiposidad pero antes de la resistencia a la insulina. La expresión del ARNm de los genes relacionados con macrófagos se restringe exclusivamente al tejido adiposo, pero esta inflamación se puede volver sistémica (Xu et al. 2003). A diferencia del tejido adiposo y el hígado, otro

sitio importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en la obesidad y la diabetes mellitus 2 es el músculo esquelético (Steven et al. 2006).

2.2.2 Prevalencia

A nivel mundial, la obesidad ha aumentado a más del doble entre 1980 y 2014. En 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales más de 650 millones eran obesos, el equivalente a aproximadamente el 13% y 39% de la población adulta respectivamente. La prevalencia es mayor en promedio entre las mujeres (15%) que entre los hombres (11%), aunque varía mucho entre las distintas regiones del mundo (OMS 2017).

En América Latina y el Caribe, aproximadamente una cuarta parte de la población adulta actual es considerada obesa. Con respecto a la población infantil, existen más de 41 millones de niños menores de 5 años que presentan sobrepeso u obesidad (OMS 2017). A nivel nacional, según el informe “Perú: Enfermedades no transmisibles y transmisibles, 2017” el 36.9 % de personas de 15 y más años presentan sobrepeso y el 21% de personas de 15 años a más presenta obesidad (INEI 2017).

La obesidad en el niño y adolescente es considerada un problema de salud pública tanto en los países desarrollados como en países en desarrollo, por el incremento de su prevalencia y las consecuencias sobre la salud de la población (Low et al. 2009). En los últimos años, según los reportes del Observatorio de Nutrición y Estudio del Sobrepeso y Obesidad (2017) en niños de cinco a nueve años se presentó un incremento de la prevalencia de obesidad; pasando de 7,3% en el año 2008 a 14,8% en el periodo 2013-2014. Del mismo modo, en adolescentes se observa un incremento de la prevalencia de 4,9% en el año 2007 a 7,5% en el periodo 2013-2014.

2.3 Desacoplamiento mitocondrial

En condiciones de reposo en animales y humanos, el trifosfato de adenosina (ATP) se consume continuamente mediante la bomba Na^+ / K^+ ATPasa. En la fosforilación oxidativa, los protones regresan hacia la matriz mitocondrial mediante la ATP sintasa, y la energía de la fuerza protón motriz se usa para la síntesis de ATP. Cuando algunos protones regresan a la matriz mitocondrial por otras vías independientes de la ATP sintasa, existe una disociación entre la respiración oxidativa y la síntesis de ATP, provocando una

disminución de la fuerza protón motriz que no acopla a la síntesis de ATP (Aguirre 2010). El gradiente electroquímico resultante a través de la membrana mitocondrial interna, que generalmente se acopla a la síntesis de ATP a través del complejo V de la cadena de transferencia de electrones, puede disiparse por una fuga de protones de vuelta a través de la membrana interna. Por lo tanto, gran parte de la energía química generada por la oxidación del combustible en las células grasas podría ser liberada como calor (Cohen y Spiegelman 2015).

2.4 Proteínas desacoplates

Las proteínas desacoplates denominadas UCP por sus siglas en inglés “*Uncoupling proteins*” son un subconjunto de la familia de transportadores de solutos como metabolitos, protones o nucleótidos que se encuentran en la membrana interna mitocondrial (Cannon y Nedergaard 2004). Dentro de esta familia de proteínas se encuentran principalmente la UCP1, UCP2 y UCP3 que participan en el gasto energético, la termogénesis, la regulación de los ácidos grasos libres y la reducción de las especies reactivas del oxígeno (Brondani et al. 2014) y las UCP4 y UCP5, cuyas funciones y mecanismos de acción son aún más inciertas. Básicamente, las UCPs desacoplan la fosforilación oxidativa a través de la fuga de protones, lo que conduce a la disipación de energía como calor y a la modulación del metabolismo energético (Riley et al. 2016).

2.4.1 Proteínas desacoplates 1 y 2

La UCP1 es capaz de separar el transporte de electrones de la producción de ATP (Barlet y Heeren 2014), permitiendo que los electrones se liberen en lugar de almacenarse, lo que resulta en la liberación de calor por medio de las mitocondrias del tejido adiposo marrón (TAM) (Harms y Seale 2013), cuyo papel crucial es el mantenimiento de la temperatura corporal en recién nacidos (Cohen y Spiegelman 2015). La UCP2 está distribuida en varios tejidos como el bazo, riñón, páncreas y cerebro; cuya función está relacionada con promover el metabolismo de ácidos grasos y de la glucosa (Diano y Horvath 2012).

2.4.2 Proteína desacoplante 3

La proteína desacoplante 3 (UCP3) es homóloga a la proteína desacoplante 1, se expresa principalmente en el músculo esquelético, aunque también es encontrada en el tejido adiposo marrón, músculo cardíaco y ciertas zonas del cerebro. El músculo esquelético es un tejido que representa el 40% de la masa metabólica activa y que contribuye a la

homeostasis energética (Busiello et al. 2015). Investigaciones sugieren que UCP3 juega un papel importante en la modulación del uso de lípidos y glucosa como sustrato de energía (Toda y Diano 2014). Existe una alta correlación entre los patrones de expresión de UCP3 y las condiciones en las que los ácidos grasos libres son la fuente de combustible predominante, como el ayuno, la infusión de ácidos grasos libres y la alimentación rica en grasas (Boss et al. 2000). La inducción de UCP3 por tanto se ha relacionado con un cambio metabólico hacia una mayor oxidación de ácidos grasos (Giordano et al. 2015).

El mecanismo de acción de la UCP3 es aún incierto, pero su asociación con el metabolismo de los ácidos grasos y un aumento de la capacidad de respuesta de la insulina en los músculos conduce a la posibilidad de que esté involucrada en la protección contra la lipotoxicidad en los músculos (MacLellan et al. 2005; Schrauwen et al. 2006). Por otro lado, la participación de UCP3 en la protección contra el estrés oxidativo inducido por especies reactivas por oxígeno (ROS) y en la mejora de la velocidad de oxidación de los ácidos grasos sugiere un papel protector de esta proteína en la obesidad (Toda y Diano 2014).

Otra de las hipótesis con respecto a la función de las UCP3 sobre el metabolismo de ácidos grasos es que cuando la tasa de oxidación de ácidos grasos es alta, la UCP3 y la tioesterasa mitocondrial 1 (MTE1) trabajan en conjunto; la UCP3 podría exportar fuera de la matriz mitocondrial, aniones de ácidos grasos liberados por la MTE1, que no pudieron ser reesterificados a CoASH, debido a la ausencia de acil-CoA sintetasa; permitiendo así aumentar la oxidación de ácidos grasos para su uso posterior en otras vías (Himms y Harper 2001).

En una investigación se demostró que el ayuno aumentó significativamente la expresión de los niveles de ARNm de UCP3 en músculos de ratones y no se correlacionó con la fuga de protones mitocondriales, demostrando que la función de las UCP3 podría no ser la misma que la UCP1 (Bézaire et al. 2001; Tiraby et al. 2007).

El aumento del metabolismo y la pérdida de peso en ratones que expresan positivamente la proteína UCP3 fueron causados por la exportación de ácidos grasos de la matriz mitocondrial para prevenir la acumulación de ácidos grasos en las mitocondrias, tanto en los tejidos adiposos como en los músculos, durante la alimentación con alto contenido de grasa (Costford et al. 2008; Rousset et al. 2004) esto último se comprobó en ratones que

carecían de UCP3 los cuales fueron alimentados con dietas ricas en grasas observándose que almacenaban niveles más altos de grasa (Costford et al. 2006). Por ende, aumentar el desacoplamiento en el músculo esquelético podría ser un tratamiento efectivo contra la obesidad (Cadenas et al. 2002).

2.5 Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que tienen una arquitectura marcada por dominios que se unen a secuencias específicas de ADN, en conjunto a numerosas cascadas de señalización pueden activar o reprimir genes dianas (Impey et al. 2004). Uno de los factores de transcripción de la regulación de la expresión de las proteínas desacoplates (UCP) son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas, conocidos por sus siglas PPARs.

Los PPARs son una familia de receptores nucleares que actúan formando un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y participan controlando la expresión de genes diana implicados en la regulación del metabolismo lipídico regulando el cambio metabólico entre el almacenamiento y la movilización de lípidos luego de ser activados por ligandos, ya sean de origen natural o artificial (Adeghate et al. 2011; Kersten 2014). La formación de este heterodímero es fundamental ya que éste se une a la región reguladora de varios genes que sumado a sus ligandos respectivos inician la regulación de la transcripción. Dentro de los ligandos naturales se incluyen diversos ácidos grasos, preferentemente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Hosteller et al. 2006); principalmente los ácidos grasos que tienen 18 y 20 carbonos en su estructura (Dong et al. 2015).

Los PPARs también pueden inhibir la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF-kb, reducir la expresión de genes inflamatorios y por tanto producir una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias (Buckley et al. 2014; Liao et al. 2012). Su clasificación depende de su localización y el papel que cumplen en ésta; como por ejemplo, el PPAR α se expresa en corazón, músculo esquelético, hígado, riñón y grasa parda, se menciona que actúa en la absorción de ácidos grasos y catabolismo de grasa hepática ayudando a reducir la adiposidad y peso corporal (Jeong y Yoon 2009).

El PPAR β/δ también desempeña un papel en el control de la oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo y músculo esquelético y el PPAR γ participa en el almacenamiento de lípidos y adipogénesis en el tejido adiposo (Kersten 2014). El PPAR α juega un rol importante en la expresión del gen *UCP3* en respuesta a los ácidos grasos circulantes, pero el PPAR δ ha sido demostrado que influye más en la inducción del gen *UCP3* en respuesta a un tratamiento de fibratos; esta regulación dual por parte del PPAR α y δ muestra que son los mayores reguladores de la expresión del gen *UCP3* en músculo esquelético y en corazón ya que pueden mediar la respuesta transcripcional de este gen por ácidos grasos o por drogas sintéticas (Villarroya et al. 2007).

2.6 Dieta obesogénica

Las dietas con alto contenido de energía han sido ampliamente utilizadas para generar las condiciones que provocan sobrepeso u obesidad (Hariri y Thibault 2010). Se ha utilizado una amplia variedad de dietas de alta energía, en las cuales el alto contenido de lípidos o grasa en la dieta indica que es un factor crítico para la acumulación de grasa en modelos de animales, como los roedores que son muy útiles para estudios de obesidad (Buettner et al. 2007).

El consumo de una dieta alta en grasa provoca la acumulación de triglicéridos en los músculos esqueléticos, a pesar de su mayor capacidad oxidativa mitocondrial (Gómez-Pérez et al. 2008). Además, la acumulación de grasas en los músculos esqueléticos por esta dieta se correlaciona más fuertemente con la sensibilidad a la insulina en ratas, que la grasa abdominal (Lim et al. 2009), esto ocurre debido al aumento de citoquinas inflamatorias que interfieren con la ruta de señalización de la insulina. Así como también, Rizk (2010) menciona que al producirse niveles circulantes elevados de ácidos grasos se muestra una regulación positiva de ARNm de la *UCP3* en el músculo esquelético de roedores.

2.7 Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Son ácidos grasos que tienen dos o más dobles enlaces en su cadena carbonada, presentan 2 tipos de series: serie ω -3, siendo el ácido α linolénico (ALA) el más representativo y la serie ω -6 con el ácido linoleico (AL). Los PUFAs son ácidos grasos esenciales para el ser humano y juegan un rol esencial en la salud de las personas ya que confieren efectos protectores por ejemplo en pacientes con enfermedades cardiovasculares (Abel et al. 2014). Estos ácidos no pueden ser sintetizados en el cuerpo humano y tienen que ser

absorbidos desde fuentes dietarias como pescado, aceite de pescado o fuentes vegetales de ácido α -linolénico (Galano et al. 2015).

2.7.1 PUFAs ω -3

Hay 2 tipos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ω -3 conocidos como PUFA ω -3 de cadena corta como ALA (ácido alfa linolénico C18: 3n-3) o PUFA ω -3 de cadena larga como EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5n-3) y DHA (Ácido docosahexaenoico, C22:6n-3). Los ácidos grasos de cadena corta se presentan en aceites vegetales como la linaza y soya; mientras que los de cadena larga, en productos marinos, como el aceite de pescado (Chen et al. 2017). Los efectos benéficos de los PUFAs ω -3 parecen ser producidos por la activación de PPARs, cabe mencionar que el ALA y EPA pueden ser activadores eficientes de PPAR α y participar como reguladores tanto en la absorción de ácidos grasos como en el catabolismo de las grasas (Dong et al. 2015; Kersten 2014).

Los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 tienen un efecto positivo sobre el sistema antioxidante en roedores basados en modelos de estrés oxidativo así como en estado normal (Zararsiz et al. 2006). Por otro lado, reportes mencionan que los PUFAs ω -3, EPA y DHA participan en la inhibición de la activación del factor nuclear κ B (NF κ B), que es un factor de transcripción proinflamatorio (Calder 2015). Además, el DHA puede modular positivamente la expresión génica antiinflamatoria activando el receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ) (Heras-Sandoval et al. 2016).

Larter et al. (2008) han demostrado que los PUFAs de la serie omega 3 modulan la expresión de varios genes que están relacionados con el metabolismo lipídico; como por ejemplo, pueden suprimir las vías de síntesis de lípidos en el hígado por medio de los niveles de ARNm del factor de transcripción pro lipogénico, la proteína-1 de unión al elemento de respuesta de esterol (SREBP-1) (Davidson 2006; Xu et al. 2002); también, se ha demostrado, en ratas que recibieron una dieta alta en grasas, que los PUFAs suprimen la expresión de algunos genes de moléculas inflamatorias como la IL-6, IL-1 y TNF- α a través de la activación de PPARs (Todoric et al. 2006; Xu et al. 2014).

Estudios previos han demostrado que la administración de PUFAs ω -3 reduce la incidencia de eventos adversos cardiovasculares a través de efectos benéficos antihiperlipidémicos, antiinflamatorios, antioxidativos, antiarrítmicos y efectos anticoagulantes (Mori et al.

2014; Wu et al. 2012). De Andrade et al. (2017) determinaron en roedores que la suplementación de PUFAs ω -3 a pesar de una dieta alta en grasa mejoró la sensibilidad de la insulina, disminuyó la adiposidad visceral y el perfil neuroinflamatorio.

2.7.2 Aceite de linaza

La linaza (*Linum usitatissimum*) es considerada como alimento funcional debido a la presencia de tres principales componentes bioactivos: ácido alfa-linolénico (ALA), lignanos y fibra dietética (Dubois et al. 2007). El ácido alfa linolénico (ALA) se encuentra en un mayor porcentaje (39 a 60.42%), comparado con los demás ácidos (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) (Pu et al. 2010). Así mismo, tiene mayor biodisponibilidad en el aceite que en la semilla de linaza molida (Austria et al. 2008).

El aceite de linaza es bajo en ácidos grasos saturados (9%), moderado en ácidos monoinsaturados (18%) y rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (73%) (Dubois et al. 2007). Se ha informado que la conversión de ALA a EPA y DHA no es muy eficiente en humanos y animales, y existe competencia entre el ALA y AL por las mismas enzimas elongasas y desaturasas (Domenichiello et al. 2015).

Vijaimohan et al. (2006) mencionan que el aceite de linaza rico en ALA tiene efectos beneficiosos en el metabolismo del colesterol en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y efectos hipolipidémicos, así como efectos antioxidantes sobre el aumento de peso corporal y peso del hígado (Prozorovskaia et al. 2003). Está claro que los lignanos, las fibras y las proteínas vegetales presentes en la linaza tendrían también un papel importante en la reducción del colesterol sérico en modelos animales y humanos (Wiesenfeld et al. 2003).

El aceite de linaza produce una mayor secreción de colesterol en la bilis, lo que lleva a una reducción del colesterol intrahepático y, por lo tanto, a un aumento en la síntesis y el recambio del colesterol (Morise et al. 2004). A su vez, reduce la acumulación de lípidos hepáticos estimulando la β -oxidación y suprimiendo la síntesis de ácidos grasos (Murase et al. 2005). Investigaciones reportan que el tratamiento con aceite de linaza ocasiona una concentración disminuida de ácidos grasos libres y fosfolípidos, lo que podría deberse a un efecto inhibitorio de éste sobre las enzimas lipogénicas (Hansen et al. 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y duración del experimento

La evaluación se realizó en el bioterio del laboratorio de Evaluación Nutricional de alimentos (LENA) del Departamento Académico de Nutrición de la Universidad Nacional Agraria La Molina. La parte experimental tuvo una duración de 94 días distribuidos de la siguiente manera:

- 5 días de acondicionamiento
- Periodo I: Este periodo tuvo una duración de 30 días. Se le asignó una dieta obesogénica.
- Periodo II: Este periodo tuvo una duración de 59 días. Se le asignó la misma dieta obesogénica modificada y se le suplementó aceite de linaza a su dieta.

3.2 Material biológico

Se trabajó con 24 ratas adultos machos de la línea Holtzman, de aproximadamente 51-54 días de edad, con un peso promedio de 230 gramos procedentes del bioterio de la UNALM.

3.3 Instalaciones y equipo

Durante la parte experimental se utilizaron jaulas individuales, implementadas cada una con su comedero y bebedero y una bandeja individual para recoger sus excretas. Con 12 horas luz y 12 horas oscuridad; el agua suministrada fue agua de mesa tratada y se le brindó *ad libitum*, la temperatura del ambiente fue de 23-25°C.

3.4 Alimentación

En el primer periodo, se les suministró diariamente 20 gramos de un mismo alimento obesogénico a cada una de las 24 ratas. En el segundo periodo, a las 12 ratas del grupo

control se le brindó 20 gramos por día de la misma dieta obesogénica y a las 12 ratas del grupo tratamiento con aceite de linaza también 20 gramos por día, pero de un alimento modificado; es decir, al alimento obesogénico se le disminuyó la cantidad en gramos de manteca con el fin de poder obtener una dieta isocalórica, ya que se le está suplementando a las ratas una dosis de aceite de linaza (1 ml/kg de peso vivo) vía oral.

3.5 Periodos

Periodo I: Se les suministró una dieta obesogénica hipercalórica que fue formulada con un 85% w/w del alimento base (Cuadro 1) brindado por el Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y un 15% w/w de manteca vegetal de la marca Tropical, dando un porcentaje total de 20.00% de extracto etéreo que es similar a la dieta hipercalórica que utilizaron Miotto et al. (2017) para inducir obesidad. Este alimento se mezcló homogéneamente con una mezcladora HOBART®, y el alimento obtenido se conservó en un ambiente fresco. Se proporcionó este alimento a todos los animales para lograr inducirlos a obesidad durante 30 días.

Periodo II: Cuando los animales estuvieron obesos luego del primer mes, se dividieron en 2 grupos; a un grupo se les dio alimento obesogénico y al otro grupo, el mismo alimento modificado más 1ml/kg p.v de aceite de linaza comercial extra virgen de la marca Gatti vía oral.

- T1: Dieta obesogénica
- T2: Dieta obesogénica modificada + 1 ml/kg de aceite de linaza (Vijaimohan et al. 2006)

Cuadro 1: Composición nutricional del alimento base para ratas

Componente	Contenido
Energía Metabolizable, Kcal/Kg	2900
Proteína Digestible mín., %	17.00
Grasa máx., %	6.00
Fibra máx., %	4.00
Humedad máx., %	14.00
Lisina Digestible mín., %	0.92
Met+Cis Digestible mín., %	0.98
Fosforo Disponible mín., %	0.37
Calcio mín., %	0.63

FUENTE: Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos-UNALM; compuesto por harina de maíz, torta de soya 48, harina integral extruida de soya, subproductos de trigo, aceite de palma, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, cloruro de colina 60%, cloruro de sodio, aminoácidos sintéticos, pre mezcla Vit-Min., antioxidantes y antifúngicos.

3.6 Parámetros de evaluación

3.6.1 Peso de animales

Para ambos periodos, todos los animales fueron pesados el primer día de recepción y luego semanalmente a las 9 a.m., con una balanza digital SOEHNLE® de capacidad máxima de 5000 gramos.

3.6.2 Medidas morfológicas

Para determinar si una rata estuvo obesa se midieron las variables mediante el índice de Lee (Suárez-Román et al. 2013), el cual se halla por la $3\sqrt{\text{peso corporal (g)}} / \text{longitud}$ desde el hocico hasta el ano (cm), donde:

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

Al término de los 30 días (Periodo I) se evaluaron las medidas del Índice de Lee de las 24 ratas y el resultado fue superior a 0.3; por lo tanto, todas las ratas estaban obesas.

3.6.3 Perfil lipídico sanguíneo

Para la determinación del perfil lipídico se utilizó el kit Mission Cholesterol Meter[®], al inicio y al final de cada periodo. Se realizó rápidamente un piquete en la cola de la rata y con un capilar de transferencia se recolectó una gota de sangre, la cual se colocó en el dispositivo de control y luego fueron leídos inmediatamente al pasar unos 20 segundos aproximadamente, al final se anotaron los resultados. El kit determinó 3 pruebas en 1:

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

3.7 Protocolo de anestesia y eutanasia

Las ratas estuvieron en ayuno nocturno por 12 horas, éstas fueron alojadas individualmente en sus jaulas pero en un ambiente distinto al de la eutanasia. Para la anestesia se utilizaron agujas hipodérmicas 25G de 0.5 de diámetro x 16 mm y los fármacos ketamina, xilacina y pentobarbital. Las dosis de ketamina y xilacina fueron 40-90 mg/kg y 10-15 mg/kg p.v respectivamente y fueron administrados por vía intraperitoneal (IP), luego se procedió a realizar la eutanasia propiamente dicha con una sobredosis de pentobarbital vía intracardiaca (IC) con una dosis de 180 mg/kg p.v (dosis triplicada) considerando una dosis de anestesia de 40-60 mg/kg para un plano anestésico (Flecknell 2015). Posteriormente, se procedió a retirar los músculos gastrocnemios. Las muestras se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido a -80°C hasta el momento en que se realizó el procedimiento molecular (Sbraccia et al. 2002). Cabe mencionar que se cumplieron y siguieron los pasos del protocolo de anestesia-eutanasia y todo el experimento fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

3.8 Procedimiento molecular

3.8.1 Aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN del músculo se realizó mediante el método de extracción por Trizol Invitrogen, siguiendo las instrucciones de THERMO FISHER SCIENTIFIC[®]. Las muestras de músculos fueron homogenizadas en presencia de TRIZOL (1 ml/50-100 mg de tejido), centrifugadas e incubadas en cloroformo. Se separaron 3 fases; la fase acuosa

incolora (parte superior), interfase y fase orgánica rojo fenol-cloroformo (parte inferior), se transfirió la fase acuosa que contiene el ARN a un nuevo tubo. Luego se añadió 0.5 ml de isopropanol se incubó y centrifugó por 10 minutos para precipitar el ARN, se re-suspendió el sedimento en 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó nuevamente y eliminó el sobrenadante. Por último, se re-suspendió el nuevo sedimento en 20-50 μ l de agua libre de RNasa y se incubó en baño maría durante 15 minutos. El ARN se guardó en congelación a -20°C para posteriormente evaluar su cantidad y calidad óptima.

3.8.2 Cuantificación de ARN

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop one de la marca THERMO FISHER SCIENTIFIC® utilizando solo 2 μ l de muestra. Se realizó la lectura de densidad óptica a 260 y 280 nm de absorbancia para determinar la pureza de ARN, donde la relación A260/280 debe ser mayor al rango 1.8-2.0 y los ratios A260/230 deben estar en rangos de 1.8 a 2 para detectar suciedad de la muestra. Los datos de ARN estuvieron dentro de los rangos permitidos para el uso del método de amplificación (Díaz-Alonso et al. 2013).

3.8.3 Electroforesis

Se preparó gel de agarosa a una concentración del 2% teñido con bromuro de etidio y buffer TBE 10 X para la cámara de electroforesis. Se mezcló 3 μ l de la muestra y 3 μ l azul de bromofenol, las muestras de ARN óptimas mostraron bandas nítidas (Rizk 2010).

3.8.4 Limpieza de trazas de ADN

Se utilizó el kit TURBO DNA libre de la marca THERMO FISHER SCIENTIFIC® el cual contiene reactivos para la digestión completa de ADN como la DNasa, que cataliza todas las trazas de ADN para asegurarnos de tener solamente ARN. También contiene el buffer TURBO DNasa, el reactivo de inactivación DNasa y agua libre de nucleasas. Se mezcló el buffer TURBO DNasa y 1 μ l TURBO DNasa con el ARN para obtener hasta 10 μ g de ARN en una reacción de 50 μ l, que equivale a 200 ng/ μ l ó 200 μ g/ 1 ml (que es la mínima concentración para el tratamiento de rutina con DNasa), esta condición eliminó hasta 2 μ g de ADN genómico de ARN total. Para verificar que no haya quedado trazas de ADN se realizó nuevamente una cuantificación en el espectrofotómetro y un PCR control.

3.8.5 Retrotranscripción reversa

Consiste en la generación de una cadena ADN complementario (ADNc) a partir de una muestra de ARN de cadena simple, mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, para ello se utilizó un kit denominado High Capacity cDNA Reverse Transcription con inhibidor de RNasa THERMO FISHER SCIENTIFIC®. Primero se preparó el master mix compuesto por buffer RT 10 X con 2 μ l, los primers Random RT 10 X con 2 μ l, los mix de dNTP 25 X con 0.8 μ l, la enzima transcriptasa reversa MultiScribe con 1 μ l, inhibidor RNasa con 1 μ l y agua libre de nucleasas con 3.2 μ l. El equipo empleado fue el termociclador modelo Quant Studio 5 Applied Biosystems THERMO FISHER SCIENTIFIC®. Para sintetizar la cadena simple de ADNc se sacó 10 μ l del master mix y se mezcló con 10 μ l de la muestra de ARN (50 ng/ μ l) y luego fueron llevados al termociclador. Las condiciones de retrotranscripción se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Condiciones del termociclador para la retrotranscripción

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	infinito

3.8.6 PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR)

La RT-qPCR es un método muy popular para la comparación de los niveles de expresión génica entre muestras biológicas. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero que a medida que ocurre, combina amplificación y al mismo tiempo cuantifica moléculas específicas de ADN. En primer lugar, los transcritos de ARN se cuantifican por transcripción reversa en una cadena de ADN complementaria (ADNc).

Este método se realiza mediante técnicas de fluorescencia, la señal es generada por fluoróforos específicos de ADN bicatenario (Biassoni y Raso 2014) en esta investigación se utilizó un compuesto orgánico denominado SYBR-Green muy utilizado en biología molecular, la señal fluorescente que se visualiza es proporcional a la cantidad de producto de PCR obtenido. Es decir, permite detectar a tiempo real en que momento cada reacción de PCR alcanza su fase exponencial de amplificación, la cual se correlaciona con la cantidad de copias de ADN que inicialmente había en la muestra. La reacción de PCR tuvo lugar en el termociclador Quant Studio y se utilizó el PowerUp SYBR Green Master Mix

Applied Biosystems que contiene: el PowerUp SYBR Green master mix, los cebadores o primers forward y reverse y agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación para el PCR se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Condiciones de amplificación en PCR en tiempo real

	Paso	Ciclos	Modo de Análisis	Temperatura	Tiempo
Pre incubación	Desnaturalización inicial	1	-----	95°C	2 min
Amplificación PCR	Desnaturalización	40	Cuantificación	95°C	15 s
	Hibridación			58°C	15 s
	Extensión			72°C	1 min
Curvas de Melting	Desnaturalización	1	Curvas de	95°C	15 s
	apareamiento		Melting	60°C	1 min
	Extensión			95°C	15 s

3.8.7 Cebadores utilizados

Se utilizaron 2 genes de referencia *18S* y *Beta actina* para determinar cuál es el mejor para compararlo con el gen *UCP3*. Las secuencias de los cebadores, el tamaño del producto y la temperatura (T°) de Melting se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4: Secuencias, tamaño del producto y T° de melting de los genes

Gen	Secuencias	Tamaño del producto	Temperatura Melting
18S	5'GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC3' 3'CAATTACAGGGCCTCGAAAG5'	128 pb	57-60°C
B actina	5'ATGGATGACGATATCGCTGC3' 3'CTTCTGACCCATACCCACCA	150 pb	58°C
UCP3	5'ATGCATGCCTACAGAACCAT3' 3'CTGGGCCACCATCCTCAGCA5'	312 pb	58°C

3.8.8 Cuantificación relativa

Los cambios en la expresión génica de una muestra se miden en base a un estándar o una muestra referencia, también conocido como calibrador y los resultados se expresan como una relación objetivo/ referencia (Wong y Medrano 2005). Para la cuantificación relativa de la expresión del gen de interés, en la presente investigación, el gen *UCP3*, se requirió otro gen cuya expresión no variara con el tratamiento brindado y se utilizó un gen de referencia *18S*. Para ello se realizó la cuantificación a través de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El término Ct (cycle threshold) es el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal; es decir, Ct es el número de ciclos necesarios para que la cantidad necesaria de ADN amplificada alcance un valor umbral y se puede determinar de forma matemática (Biassoni y Raso 2014).

El ΔCt se calculó por la diferencia del Ct del gen de interés y el Ct del gen endógeno normalizador en este caso [$\Delta Ct = Ct(\text{gen } UCP3) - Ct(\text{gen } 18S)$], corrigiéndose así cualquier error en la preparación de las muestras. El $\Delta\Delta Ct$ corresponde al ΔCt de cada muestra tratamiento menos el ΔCt de la muestra control y finalmente se obtuvo el valor RQ que es $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001). Por tanto los valores de RQ representan la expresión génica de uno comparado al otro.

3.8.9 Curvas de estandarización

Se midió la pendiente, el R y la eficiencia de los 3 genes, de los cuales el gen *Beta actina* tuvo una eficiencia de 128% que sobrepasa el rango óptimo (90-110) (Figura 1). El gen *18S*, una eficiencia de 100.4%, y por tanto se utilizó éste último como gen de referencia y el gen *UCP3* como gen objetivo con una eficiencia de 107.36% como se puede observar en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Datos de estandarización de genes UCP3, B actina y 18S

GEN	Pendiente	R ²	Eficiencia%
UCP3	-3.157	0.98	107.36
BETA ACTINA	-2.794	0.86	128
18S	-3.311	0.99	100.4

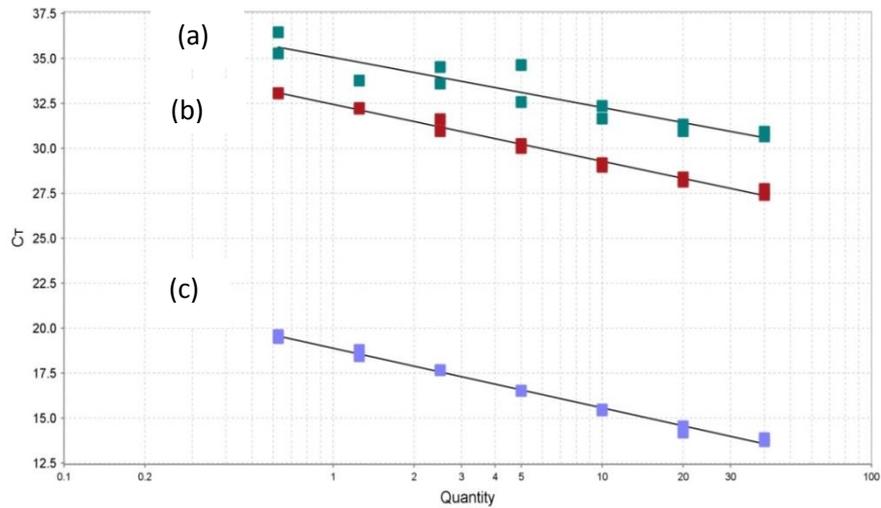


Figura 1. Curva Estándar de genes. (a) Gen *Beta actina*, (b) Gen *UCP3*, (c) Gen *18S*

3.9 Expresión génica

Es el proceso mediante el cual las células convierten la secuencia de ADN de un gen a una secuencia de ARNm de un transcrito y luego decodifican la secuencia de ARNm en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido (Hartwell et al. 2011). La expresión del ARNm de la proteína desacoplante 3 (UCP3) fue analizada mediante RT-qPCR.

3.10 Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media +/- error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre grupos fueron analizados con el Test de Student, para muestras dependientes e independientes que siguen la distribución normal, U de Mann Whitney para muestras independientes que no siguen la distribución normal y Wilcoxon para muestras dependientes que no siguen la distribución normal. Para determinar la diferencia de medias de los niveles séricos de c-HDL y triglicéridos se utilizó el paquete estadístico SPSS 25.0. Para la expresión génica, se analizó con el Test de Student, pero con el paquete estadístico GraphPad Prism 7.03.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Consumo de alimento y peso corporal

El consumo de alimento promedio fue de 17.79 ± 0.38 gramos para las ratas control y 18.48 ± 0.29 gramos para las ratas que recibieron el tratamiento (aceite de linaza), en el cual no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 6). Estos resultados fueron similares a la investigación de Khan y Makki (2017) en la cual no hubo diferencia significativa en el consumo de alimento entre el grupo de ratas suplementadas con aceite de linaza sobre el grupo control de ratas hiperlipidémicas. Este pequeño incremento en el consumo en el grupo tratamiento podría deberse a la suplementación con aceite de linaza, el cual hace más palatable su alimento.

El peso promedio del grupo control fue de 407.42 ± 8.92 gramos y el peso promedio del grupo tratamiento con aceite de linaza fue de 453.08 ± 3.91 gramos, éste último mostró un incremento significativamente mayor ($p < 0.05$) (Cuadro 6). El aumento significativo de peso en las ratas que recibieron el aceite de linaza podría deberse al mayor consumo de alimento por su alta palatabilidad y al tiempo de suplementación, un tiempo más prolongado podría revertir el peso ganado; así mismo, investigaciones anteriores concuerdan con estos resultados, Buckley y Howe (2010) mencionan que el aceite de linaza, no tuvo un efecto positivo sobre la reducción del peso en el grupo de ratas tratadas. A su vez, LeMieux et al. (2015) y De Andrade et al. (2017), también demostraron que una dieta alta en grasa suplementada con omega 3 no redujo el peso corporal en ratones alimentados con la misma dieta.

Por otro lado, estudios en humanos mencionan que los PUFAs omega 3 no se relacionan con cambios en el peso corporal (Martínez-Victoria y Yago 2012); así mismo, Nexticapa et al. (2017) tampoco encontraron diferencias significativas en el peso corporal de niños obesos que fueron suplementados con omega 3. Sin embargo, algunos estudios si mencionan que la administración de PUFAs omega 3 en roedores alimentados con una dieta alta en grasas disminuyeron significativamente el tamaño de los adipocitos y la

ganancia de peso corporal (Ruzickova et al. 2004; Vijaimohan et al. 2006; Khan y Makki 2017).

Cuadro 6. Consumo de alimento y peso corporal después de 59 días

Parámetros	Control	Dieta con Linaza
Consumo de alimento promedio(g/d)	17.79±0.38 ^a	18.48±0.29 ^a
Peso corporal (g) después de (59d)	407.42±8.92 ^b	453.08±3.91 ^a

Los valores representan el promedio ± SEM de 12 ratas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y letras iguales indican diferencia no significativa.

4.2 Perfil lipídico sanguíneo

El promedio de los niveles séricos de triglicéridos al iniciar la etapa de inducción a la obesidad fue de 50.04±0.97 mg/dl y al finalizar fue de 132.63±6.83 mg/dl con un marcada diferencia significativa ($p < 0.05$), al igual que en el peso corporal ($p < 0.05$), este aumento considerado sumado a las medidas morfológicas determinadas por el índice de Lee concluyeron que las ratas se encontraban obesas por la dieta obesogénica (Cuadro 7).

Cuadro 7: Peso y perfil lipídico después 30 días de inducción a la obesidad en ratas

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

Los valores representan el promedio ± SEM de 24 ratas antes y después de la dieta obesogénica (DO). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y letras iguales, diferencia no significativa. c-HDL, colesterol-lipoproteína de alta densidad y TRIG, triglicéridos. * Se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Significancia estadística $p < 0.05$.

Es bien sabido que las dietas ricas en grasas aumentan la secreción de citoquinas inflamatorias (Bays et al. 2004), estimulan la infiltración de macrófagos provocando un incremento de la concentración de ácidos grasos libres circulantes, lo cual es considerado uno de los factores más importantes para esta investigación, ya que la condición de inducir a obesidad a las ratas determina un aumento en la concentración de estos ácidos grasos y por tanto un incremento de la expresión de la UCP3 (Chou et al. 2001).

Los niveles sanguíneos de c-HDL (mg/dl) al finalizar los 59 días en el grupo control fueron de 39.25 ± 1.44 mg/dl y en el grupo tratamiento fueron de 40.58 ± 2.11 mg/dl mostrando una diferencia mínima en promedio, sin embargo no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 8). Se demostró una tendencia al aumento en el promedio de c-HDL sérico, por lo cual se presume que el aceite de linaza podría mejorar los niveles séricos de c-HDL y que la tendencia aumente con un número más alto de muestras o un tiempo más prolongado de experimentación. Similar resultado se obtuvo en el trabajo de Khan y Makki (2017) donde hubo un aumento de c-HDL, pero no significativo después de 12 semanas de tratamiento en ratas con aceite de pescado, que es rico en ALA. Por otro lado, en niños obesos los niveles séricos de c-HDL no mostraron diferencias significativas cuando suplementaron con PUFAs de la serie omega 3 (Nexticapa et al. 2017).

Con respecto al nivel de triglicéridos sanguíneos se obtuvo una media de 71 ± 4.88 mg/dl en el grupo control y 62.17 ± 4.18 mg/dl en el grupo tratamiento, observándose una ligera disminución no significativa para el grupo tratamiento (Cuadro 8). Similares resultados se obtuvieron por Khan y Makki (2017), ya que encontraron una considerable reducción, aunque no significativa, de los niveles séricos de triglicéridos en ratas hiperlipidémicas tratadas con aceite de linaza durante 12 semanas. Sin embargo, en otras investigaciones Xu et al. (2014) demostraron que este aceite disminuyó significativamente los niveles de triglicéridos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. A su vez, Akrami et al. (2018) determinaron que la suplementación con aceite de linaza disminuyó los niveles séricos de triglicéridos en pacientes con síndrome metabólico pero no fue significativo. Posiblemente, se necesitaría un número mayor de tiempo de experimentación para que la suplementación con aceite de linaza pueda disminuir los niveles séricos de triglicéridos.

Los niveles de colesterol total fueron leídos, empero las unidades mostradas no fueron consideradas en el estudio por estar debajo del rango de detección del equipo usado.

Cuadro 8. Perfil lipídico después de 59 días de la suplementación con aceite de linaza (1ml/kg p.v) en ratas

Parámetros	Control	Dieta con Linaza
c-HDL(mg/dl)	39.25 ± 1.44^a	40.58 ± 2.11^a
TRIG* (mg/dl)	71 ± 4.88^a	62.17 ± 4.18^a

Los valores representan el promedio \pm D.E de 12 ratas por tratamiento. Letras iguales indican diferencia no significativa. c-HDL, colesterol-lipoproteína de alta densidad y TRIG, triglicéridos. * Se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Significancia estadística $p < 0.05$.

4.3 Cuantificación relativa mediante el método comparativo de Ct

Se determinó que el gen *UCP3* con respecto al gen de referencia *18S* se expresó 4 veces más en el grupo tratamiento (aceite de linaza) que en el grupo control como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Expresión relativa del grupo tratamiento (aceite de linaza) y grupo control

Expresión relativa al gen de referencia 18s	
Grupo tratamiento	8.33 veces
Grupo control	2.13 veces

4.4 Expresión relativa del ARNm UCP3

La expresión del gen *UCP3* en el músculo esquelético de las ratas suplementadas con aceite de linaza comparada con el grupo control tuvo un nivel de significancia de $p < 0.05$. (Figura 2).

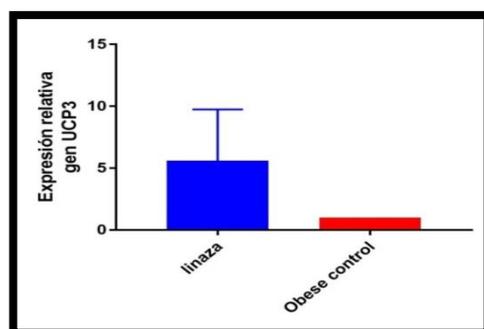


Figura 2. Nivel de expresión relativa del gen *UCP3* en los grupos control y tratamiento

En el aceite de linaza se observa una muy buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el Ácido α linolénico (ALA), el cual se encuentra en una mayor proporción. Se demostró que la suplementación del aceite de linaza influyó positivamente en la expresión del gen *UCP3* en músculo esquelético, considerando éste el sitio donde se encuentra mayormente distribuida esta proteína mitocondrial, de ratas inducidas a obesidad.

Este aumento significativo del ARNm UCP3 podría deberse a la activación de PPAR por los PUFAs de la serie omega 3 presentes en mayor concentración en el aceite de linaza, propiciando un aumento de la concentración de ácidos grasos circulantes y por ende una

mayor activación de PPARs, como por ejemplo Liu et al. (2014) mencionan que el PPAR δ fue el PPAR más abundante encontrado en músculo esquelético de ratas que recibieron una dieta de PUFA ω -3. En base a lo mencionado, podríamos inferir que la activación de PPARs tiene un efecto positivo sobre la región promotora del ADN del gen *UCP3* que regula su transcripción y por ende su expresión. El aumento de la expresión del gen *UCP3* puede aumentar la tasa de oxidación de ácidos grasos, haciendo que se pueda prevenir esa acumulación y ayudando a mantener la capacidad oxidativa de la grasa muscular. Un estudio similar en cuanto a los PUFAs encontró que el EPA y DHA, que son los derivados del ALA, regularon positivamente la expresión del ARNm *UCP3* en células musculares cultivadas (Mak-Soon et al. 2013). Otro estudio también encontró una expresión aumentada de ARNm *UCP3* en músculos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas durante 12 semanas (Pheiffer et al. 2016).

Si bien es cierto, el aceite de linaza no tuvo un efecto positivo en la reducción del peso corporal en las ratas tratadas, siendo una coincidencia en similares investigaciones, lo que sí se encontró es una modificación en la expresión del gen *UCP3*; la función principal de estas proteínas ubicadas en mayor proporción en el músculo no es la misma que las demás proteínas desacoplantes, como por ejemplo la *UCP1* o *UCP2* que básicamente se encargan de regular el metabolismo energético, por tanto, se podría inferir que la función principal de la *UCP3* estuvo más enfocada en regular la oxidación de ácidos grasos para evitar la acumulación de éstos en el músculo. Además, los efectos antiinflamatorios y antioxidativos de este aceite podrían disminuir los niveles de algunos factores proinflamatorios y el estrés oxidativo que aumenta durante la obesidad; por otro lado, se estaría demostrando que a nivel molecular ya ocurren cambios genéticos que podrían contribuir a que un tiempo más prolongado y con un número mayor de muestras se logre la reducción del peso corporal que es el objetivo de muchos de trabajos de experimentación.

V. CONCLUSIONES

1. La suplementación con aceite de linaza a ratas alimentadas con una dieta obesogénica modificó significativamente la expresión del ARNm de la UCP3.
2. Se observó una tendencia a la disminución de triglicéridos séricos y un ligero aumento en promedio del c-HDL, aunque no significativo.

VI. RECOMENDACIONES

1. Analizar el efecto de diferentes dosis del aceite linaza sobre la expresión del gen *UCP3*.
2. Analizar el efecto de aceite de linaza sobre el PPAR α y PPAR δ .
3. Comparar los efectos de otros aceites similares al aceite de linaza sobre la expresión del gen *UCP3*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S., RIEDEL, S., GELDERBLOM, W.C. 2014. Dietary PUFA and cancer. *Proc Nutr Soc.*, 73(3): 361–7.

ADEGHATE, E., ADEM, A., HASAN, M.Y., TEKES, K., KALASZ, H. 2011. Medicinal chemistry and actions of dual and pan PPAR modulators. *Open Med. Chem. J.*, 5 (Suppl 2): 93–98.

AFMAN, L.A., MULLER, M. 2012. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 51(1):63-70.

AGUIRRE, E. 2010. Estudio del papel protector de la proteína desacoplante UCP3 frente al estrés oxidativo en mitocondrias de músculo esquelético y corazón de ratones tratados con endotoxina y en cardiomiocitos de rata. Tesis doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 208 p.

AKRAMI, A., NIKAEIN, F., BABAJAFARI, S., YARMOHAMMADI, H. 2018. Comparison of the effects of flaxseed oil and sunflower seed oil consumption on serum glucose, lipid profile, blood pressure, and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. *Journal of Clinical Lipidology*, 12(1):70-77.

AUSTRIA, J.A., RICHARD, M.N., CHAHINE, M.N. 2008. Bioavailability of alpha-linolenic acid in subjects after ingestion of three different forms of flaxseed. *J Am Coll Nutr.*, 27(2):214–221.

BARTELT, A., HEEREN, J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*, 10(1):24-36.

BAYS, H., MANDARINO, L. Y DEFRONZO, R.A. 2004. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(2):463-78.

BÉZAIRE, V., WOLFGANG, H., KRAMER, J., KOZAK, L., HARPER, M.E. 2001. Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in *Ucp3* (-/-) and wild-type mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 281(5):E975-E982

BERNÁ, G., OLIVERAS-LÓPEZ, M.J., JURADO-RUIZ, E., TEJEDO, J., BEDOYA, F., SORIA, B., MARTÍN, F. 2014. Nutrigenetics and nutrigenomics insights into diabetes etiopathogenesis. *Nutrients*, 6(11):5338-69.

BIASSONI, R., RASO, A. 2014. *Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols.* Springer Science Business Media (Humana Press). 231pp

BOSS, O., HAGEN, T., LOWELL, B.B. 2000. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes*, 49(2):143–156.

BRONDANI, L.A., ASSMANN, T.S., DE SOUZA, B.M., BOUCAS, A.P., CANANI, L.H., CRISPIM, D. 2014. Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (UCP) 1–3 genes with body mass index variability. *PloS one*, 9(5):e96411

BUCKLEY, J.D. Y HOWE, P.R. 2010. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity- a review. *Nutrients*, 2(12):1212-30.

BUCKLEY, C.D., GILROY, D.W., SERHAN, C.N. 2014. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 40(3):315-27.

BUETTNER, R., SCHÖLMERICH, J., BOLLHEIMER, L.C. 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, 15(4): 798-808.

BUSIELLO, R.A., SAVARESE, S., LOMBARDI, A. 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology*, 6(36).

CADENAS, S., ECHTAY K.S., HARPER, J.A., JEKABSONS, M.B., BUCKINGHAM, J.A., GRAU, E., ABUIN, A., CHAPMAN, H., CLAPHAM, J.C., BRAND, M.D. 2002. The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem.*, 277(4): 2773–2778.

CALDER, P.C. 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*, 1851(4):469–84.

CANNON, B. Y NEDERGAARD, J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.*, 84(1):277–359.

CHEN, X., DU, X., SHEN J., LU, L., WANG, W. 2017. Effect of various dietary fats on fatty acid profile in duck liver: Efficient conversion of short-chain to long-chain omega-3 fatty acids. *Experimental Biology and Medicine*, 242(1):80-87.

CHOQUET, H., MEYRE, D. 2011. Genetics of obesity: What have we Learned? *Current Genomics*, 12(3):169-179.

CHOU, C.J., CHA, M.C., JUNG, D.W., BOOZER, C.N., HASHIM, S.A. Y PI-SUNYER, F.X. 2001. High-fat diet feeding elevates skeletal muscle uncoupling protein 3 levels but not its activity in rats, *Obes Res.*, 9(5):313–9.

COHEN, P., SPIEGELMAN, B.M. 2015. Brown and beige fat: Molecular parts of a thermogenic machine. *Diabetes*, 64(7):2346-2351.

COSTFORD, S., CHAUDHRY, S., SALKHORDEH, M., HARPER, M.E. 2006. Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 290(6):E1304–12.

COSTFORD, S.R., CHAUDHRY, S.N., CRAWFORD, S.A., SALKHORDEH, M., HARPER, M.E. 2008. Longterm high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 295(5):E1018–24.

DAVIDSON, M.H. 2006. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.*, 98(4A):27i–33i

DE ANDRADE, A.M., FERNANDES, M.D.C., DE FRAGA, L.S., PORAWSKI, M., GIOVENARDI, M., GUEDES, R.P. 2017. Omega-3 fatty acids revert high-fat diet-induced neuroinflammation but not recognition memory impairment in rats. *Metab Brain Dis.*, 32(6):1871-1881.

DIANO, S. Y HORVATH, T.L. 2012. “Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism,” *Trends in Molecular Medicine*, 18(1):52–58.

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

DOMENICHELLO, A.F., KITSON, A.P., BAZINET, R.P. 2015. Is docosahexaenoic acid synthesis from α linolenic acid sufficient to supply the adult brain?. *Prog Lipid Res.*, 59:54-66

DONG, X., XU, H., MAI, K., XU, W., ZHANG, Y., AI, Q. 2015. Cloning and characterization of SREBP-1 and PPAR- α in Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*, and their gene expressions in response to different dietary fatty acid profiles. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 180:48–56

DRUMMOND, E.M. Y GIBNEY, E.R. 2013. Epigenetic regulation in obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(4):392–397.

DUBOIS, V., BRETON, S., LINDER, M., FANNI, J., PARMENTIER, M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 109(7):710–732.

FLECKNELL. 2015. *Laboratory Animal Anaesthesia.* Fourth Edition

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

GIORDANO, C., LEMAIRE, C., LI, T., KIMOFF, R.J., PETROF, B.J. 2015. Autophagy associated atrophy and metabolic remodeling of the mouse diaphragm after short-term intermittent hypoxia. *PLoS One*, 10(6):e0131068.

GÓMEZ-PÉREZ, Y., AMENGUAL-CLADERA, E., CATALÀ-NIELL, A., THOMÀS-MOYÀ, E., GIANOTTI, M., PROENZA, A.M., LLADÓ, I. 2008. Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell Physiol Biochem*, 22(5-6):539-48.

Haidar, Y.M. Y COSMAN, B.C. 2011. Obesity epidemiology. *Clin Colon Rectal Surg*, 24(4):205-10.

HANSEN, R.A., SAVAGE, C.J., REDLINGER, K., TRAUB-DARGATZ, J.L. 2002. Effects of dietary flaxseed oil supplementation on equine plasma fatty acid concentrations and whole blood platelet aggregation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(4):457–463.

HARIRI, N., THIBAUT, L. 2010. High-fat diet-induced obesity in animal. *Nutr Res Rev*, 23(2):270-99.

HARMS, M., SEALE, P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.*, 19(10):1252-63.

HARTWELL, L., HOOD, L., GOLDBERG, M., REYNOLDS, A.E., SILVER, L.M. 2011. Genetics from genes to genomes. Fourth edition. McGraw-Hill companies 730p.

HERAS-SANDOVAL, D., PEDRAZA-CHAVERRI, J., PEREZ-ROJAS, J.M. 2016. Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 13(1):61.

HIMMS-HAGEN, J., HARPER, M.E. 2001. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med* 226(2):78–84.

HOSTELLER, H.A., KIER, A.B., SCHROEDER, F. 2006. Very-long-chain and branched-chain fatty acyl-CoAs are high affinity ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *Biochemist* 45, 7669–7781

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA (INEI). 2017. Perú: Enfermedades no transmisibles y transmisibles. Lima

IMPEY, S., McCORKLE, S.R., CHA-MOLSTAD, H., DWYER, J.M., YOCHUM, G.S., BOSS, J.M., McWEENEY, S., DUNN, J.J., MANDEL, G., GOODMAN, R.H. 2004. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119(7): 1041-1054

JEONG, S., YOON, M. 2009. Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPAR alpha in high fat diet-induced obese mice. *Exp. Mol. Med.*, 41(6): 397-405

KHAN, S.A., MAKKI, A. 2017. Dietary changes with omega-3 fatty acids improves the blood lipid of wistar albino rats with hypercholesterolaemia. *International Journal of Medical Research and Health Sciences*, 6(3): 34-40

KEITH, S.W., REDDEN, D.T., KATZMARYK, P.T., BOGGIANO, M.M., HANLON, E.C., BENCA, R.M., RUDEN, D., PIETROBELLI, A., BARGER, J.L., FONTAINE, K.R., WANG, C., ARONNE, L.J., WRIGHT, S.M., BASKIN, M., DHURANDHAR,

N.V., LIJOI, M.C., GRILO, C.M., DELUCA, M., WESTFALL, A.O., ALLISON, D.B. 2006. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)*, 30(11):1585-94.

KERSTEN, S., 2014. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol. Metab.* 3(4): 354–371

LARTER, C.Z., YEH, M.M., CHENG, J., WILLIAMS, J., BROWN, S., DELA PENA, A., BELL-ANDERSON, K.S Y FARRELL, G.C. 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by dietary fish oil attenuates steatosis, but does not prevent experimental steatohepatitis because of hepatic lipoperoxide accumulation, *J Gastroenterol Hepatol.*, 23(2):267-75.

LEMIEUX, M.J., KALUPAHANA, N.S., SCOGGIN, S., MOUSTAID-MOUSSA, N. 2015. Eicosapentaenoic acid reduces adipocyte hypertrophy and inflammation in diet-induced obese mice in an adiposity-independent manner. *J Nutr.*, 145(3):411–7.

LIAO, Z., DONG, J., WU, W., YANG, T., WANG, T., GUO, L., CHEN, L., XU, D., WEN, F. 2012. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR γ /NF-kappaB pathway. *Respir Res.*, 13:110.

LIM, S., SON, K.R., SONG, I.C., PARK, H.S., JIN, C.J., JANG, H.C., PARK, K.S., KIM, Y.B., LEE, H.K. 2009. Fat in liver/muscle correlates more strongly with insulin sensitivity in rats than abdominal fat. *Obesity (Silver Spring)*, 17(1):188-95.

LIU, M., MONTGOMERY, M.K., FIVEASH, C.E., OSBORNE, B., COONEY, G.J., BELL-ANDERSON, K., TURNER, N. 2014. PPAR α -independent actions of omega-3 PUFAs contribute to their beneficial effects on adiposity and glucose homeostasis. *Sci Rep.*, 4:5538

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8

LOW, S., CHIN, M.C., DEURENBERG-YAP, M. 2009. Review on epidemic of obesity. *Ann Acad Med Singapore*, 38(1):57-9.

MACLELLAN, J.D., GERRITS, M.F., GOWING, A., SMITH, P.J.S., WHEELER, M.B., HARPER, M.E. 2005. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes*, 54(8):2343-2350.

MAK-SOON, L., IN-HWAN, K. Y YANGHA K. 2013. Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Uncoupling Protein 3 Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *Nutrients*, 5(5):1660–1671.

MANDAL, A. 2014. Study of prevalence of type 2 diabetes mellitus and hypertension in overweight and obese people. *Journal of family medicine and primary care*, 3(1):25–8.

MARTÍNEZ-VICTORIA, E. Y YAGO, M.D. 2012. Omega 3 polyunsaturated fatty acids and body weight. *Br J Nutr.*, 107(Suppl 2):S107–16.

MIZOGUCHI, T., TAKEHARA, I., MASUZAWA, T., SAITO, T., NAOKI, Y. 2008. Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *J Med Food*, 11(3):395–404.

MIOTTO, P.M., HORBATUK, M., PROUDFOOT, R., MATRAVADIA, S., BAKOVIC, M., CHABOWSKI, A., HOLLOWAY, G.P. 2017. α Linolenic acid supplementation and exercise training reveal independent and additive responses on hepatic lipid accumulation in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 312(6):E461-E470.

MORI, T.A. 2014. Dietary n-3 PUFA and CVD: a review of the evidence. *Proc Nutr Soc.*, 73(1):57–64.

MORISE, A., SEROUGNE, C., GRIPOIS, D., BLOUQUIT, M.F., LUTTON, C., HERMIER, D. 2004. Effects of dietary alpha-linolenic acid on cholesterol metabolism in

male and female hamsters of the LPN strain. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15(1):51–61.

MOUSTAFA, J.S. Y FROGUEL, P. 2014. From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat Rev Endocrinol.* 10(1):4.

MÜLLER, M. Y KERSTEN, S. 2003. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Gen.* 4(4):315–322.

MURASE, T., IOKI, M., TOKIMITSU, I. 2005. Supplementation with alpha-linolenic acid rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an upregulation of β -oxidation in Zucker fatty rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1733 (2–3):224–231.

NEXTICAPA, M.R., CABALLERO D.A., HERRERA, S., ACOSTA,H.G., SANTIAGO, I., FIGUEROA, L., GARCÍA, E., POOL,E., CERVANTES C., MATEU V. 2017. Supplementation effect of omega-3 fatty acids in overweight and obese mexican schoolchildren. *ResearchGate*, 42(10):698-704.

OBSERVATORIO DE NUTRICIÓN Y ESTUDIO DEL SOBREPESO Y OBESIDAD. 2017. Instituto Nacional de Salud, [citado el 23 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://observateperu.ins.gob.pe>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2017. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311 octubre de 2017.

PHEIFFER, C., JACOBS, C., PATEL, O., GHOOR, S., MULLER, C., LOUW, J. 2016. Expression of UCP2 in Wistar rats varies according to age and the severity of obesity. *J Physiol Biochem.* 72(1):25-32.

PROZOROVSKAIA, N.N., RUSINA, I.F., LUPINOVICH, V.L., 2003. Antioxidant activity of flaxseed oil. *Vopr Pitan* 72(2): 13–17.

PU, J., BECHTEL, P.J., SATHIVEL, S. 2010. Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosyst Eng.*, 107(4):364–371.

RILEY, C.L., DAO, C., KENASTON, M.A., MUTO, L., KOHNO, S., NOWINSKI, S.M., SOLMONSON, A.D., PFEIFFER, M., SACK, M.N., LU, Z., FIERMONTE, G., SPRAGUE, J.E., MILLS, E.M. 2016. The complementary and divergent roles of uncoupling proteins 1 and 3 in thermoregulation. *J. Physiol.*, 594(24): 7455-7464.

RIZK, N.M. 2010. Effect of high fat diet on skeletal muscle uncoupling protein 3 and hypothalamic neuropeptide Y expression in rats. *Int. J Diabetes y Metab.*, 18:73-80.

ROUSSET, S., ALVES-GUERRA, M.C., MOZO, J., MIROUX, B., CASSARD-DOULCIER, A.M., BOUILLAUD, F., RICQUIER, D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53(Suppl 1):S130-S135.

RUZICKOVA, J., ROSSMEISL, M., PRAZAK, T., FLACHS, P., SPONAROVA, J., VECK, M., TVRZICKA, E., BRYHN, M., KOPECKY, J. 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*, 39(12):1177–85.

SBRACCIA, P., D'ADAMO, M., LEONETTI, F., BUONGIORNO, A., SILECCHIA, G., BASSO, M.S., TAMBURRANO, G., LAURO, D., FEDERICI, M., DI DANIELE, N., LAURO, R. 2002. Relationship between plasma free fatty acids and uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle of obese subjects: in vitro evidence of a causal link. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 57(2): 199-207

SCHRAUWEN, P., HOEKS, J., HESSELINK, M.K. 2006. Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? *Prog Lipid Res* 45(1):17–41.

SHAH, A., MEHTA, N., REILLY, M.P. 2008. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 32(6):638–644.

SMITKA, K., MAREŠOVÁ, D. 2015. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague Med Rep.*, 116(2):87–111.

STEVEN, E.S., JONGSOON, L., ALLISON, B.G. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116(7): 1793-1801.

SUÁREZ-ROMÁN, G., PERERA-CALDERÍN, A.J., CLAPÉS-HERNÁNDEZ, S., FERNÁNDEZ-ROMERO, T., EGAÑA-MORALES, E. 2013. Estandarización de un modelo para inducir obesidad en ratas. *Medisur*, 11(5): 569-573

TIRABY, C., TAVERNIER, G., CAPEL, F., MAIRAL, A., CRAMPES, F., RAMI, J., PUJOL, C., BOUTIN, J.A., LANGIN, D. 2007. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia*, 50(10):2190-2199.

TODA, C., DIANO, S. 2014. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 28(5):757–64.

TODORIC, J., LÖFFLER, M., HUBER, J., BILBAN, M., REIMERS, M., KADL, A., ZEYDA, M., WALDHÄUSL, W., STULNIG, T.M. 2006. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 49(9):2109–2119.

VIJAIMOHAN, K., MALLIKA, J., SABITHA, K.E., SUBRAMANIYAM, S., ANANDHAN, C., SHYAMALA DEVI, C.S. 2006. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil growth performance and hepatic cholesterol METABOLISM in high fat diet fed rats. *Life Sciences*, 79(5):448-54.

VILLAROYA, F., IGLESIAS, R., GIRALT, M. 2007. PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res.*, 2007:74364

WIESENFELD, P.W., BABU, U.S., COLLINS, T.F.X., SPARNO, R., O' DONELL, M.W., FLYNN, T.J., BLACK, T., OLEJNIK, N. 2003. Flaxseed increased α -linoleic acid and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. *Food and Chemical Toxicology* 41(6):841–855.

WONG, M.L. Y MEDRANO, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39:75-85

WU, J.H., LEMAITRE, R.N., KING, I.B., SONG, X., SACKS, F.M., RIMM, E.B., HECKBERT, S.R., SISCOVICK, D.S., MOZAFFARIAN, D. 2012. Association of plasma phospholipid long-chain omega-3 fatty acids with incident atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study. *Circulation*, 125(9):1084–93.

XU, H., BAMES, G.T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C.J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J.S., TARTAGLIA, L.A., CHEN, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112(12):1821-1830.

XU, J., CHO, H., O'MALLEY, S., PARK, J. H. Y CLARKE, S.D. 2002. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanisms. *J. Nutr.* 132(11):3333-3339.

XU, J., GAO, H., ZHANG, L., CHEN, C., YANG, W., DENG, Q., HUANG, Q., HUANG, F. 2014. A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. *Lipids Health Dis.*, 13:63.

ZARARSIZ, I., KUS, I., AKPOLAT, N., SONGUR, A., OGETURK, M., SARSILMAZ, M. 2006. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochem Funct.*, 24(3):237–44.