

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO

EL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO COMO REGULADOR DE LA
LIPOPROTEÍNALIPASA Y APOLIPOPROTEÍNA C-III EN RATONES

por

Lyssia Castellanos Tapia

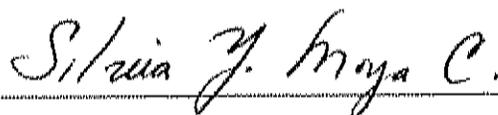
Tesis aprobada por la División de Nutrición como
requisito para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Hermosillo, Sonora

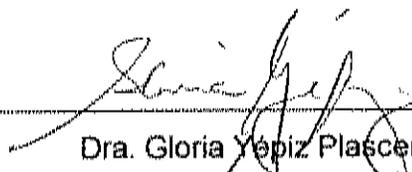
Diciembre 2002

APROBACIÓN

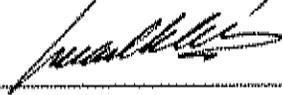
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de la Lic. Nut Lyssia Castellanos Tapia la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



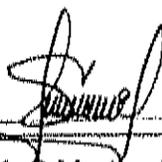
Dra. Silvia Y Moya Camarena



Dra. Gloria Yepiz Plascencia



Dra. Ana María Calderón de la Barca



M. C Martha Nydia Ballesteros

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, se deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para dar término a mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme hacer uso de sus laboratorios y apoyo financiero.

A la Dra. Gloria Yépiz por su apoyo incondicional en mi trabajo de investigación.

A la Dra. Ana María Calderón y M.C. Martha Nydia Ballesteros por haberme permitido el uso de sus reactivos y laboratorios.

A la Dra. Silvia Moya por el apoyo prestado a todo el proceso en la elaboración de mi tesis.

A René Valenzuela y M.C. Adriana Bolaños por su paciencia y ayuda en todo momento.

A Gerardo y Luis Conde por contar con su ayuda y hacerme pasar momento muy felices en Hermosillo.

A Ana Isabel, Juan Pedro por su paciencia y comprensión.

A mis compañeros de generación y de la generación posterior a la mía por los momentos agradables en mi estancia por Hermosillo.

A Erendira, Marie, Nayeli y Luzma por animarme y apoyarme en los momentos difíciles.

A Bertha Pacheco y Zadie por prestarme su tiempo en la elaboración de las técnicas.

A mis amigos queridos (Gaby, Zaida, Katia, Eugenia, Javier) con los que compartí momentos muy felices y amargos, y sin embargo siempre estuvieron conmigo para alentarme. Muchas gracias por aceptarme tal como soy.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	
Hipertigliceridemia.....	3
Fármacos hipolipemiantes.....	4
Fibratos.....	5
Tiazolidinedionas.....	6
Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARs).....	7
Expresión de PPARs en diversos tejidos.....	8
Estructura de PPARs.....	9
Ligandos de los PPARs.....	11
Subtipo α	11
Subtipo γ	13
Subtipo β	14
Apoproteína C-III.....	14
Lipoproteína lipasa.....	15
Mecanismo hipolipidémico de fibratos y TZD a través de PPARs.....	17
El ácido linoleico conjugado.....	20
Efectos benéficos del CLA.....	21
Efecto hipolipemiante del CLA.....	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	
Animales y dieta.....	27
Extracción de RNA total.....	30

Reacción de la transcriptasa reversa acoplada con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (cRT-PCR).....	30
Construcción estándar interno.....	31
Síntesis de cDNA.....	34
Rango de concentración óptima.....	34
Amplificación.....	36
DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Amplificación del gen constitutivo β -actina.....	40
Ventajas y desventajas de la RT-PCR comparada con otras técnicas de análisis de mRNA.....	44
Hipertrigliceridemia inducida por sacarosa.....	45
Efecto del CLA en músculo.....	46
Efecto del CLA en tejido adiposo.....	50
Efecto de la troglitazona en músculo y tejido adiposo.....	52
Efecto del CLA en hígado.....	54
CONCLUSIONES.....	58
ANEXOS	
Síntesis de estándar interno.....	59
Método Gilliland.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de los PPARs.....	10
2	Activación de los PPARs.....	12
3	Mecanismo de acción de LPL y apo C-III.....	18
4	Modulación de eicosanoides por el CLA.....	22
5	Efecto de las dietas sobre las concentraciones de triglicéridos sanguíneos.....	29
6	Síntesis del estándar interno	32
7	Esquema general de la cuantificación del mRNA	35
8	Rango de concentración óptima.....	37
9	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de β -actina en tejido adiposo.....	41
10	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de β -actina en tejido muscular.....	42
11	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de β -actina en hígado.....	43
12	Inducción de hipertrigliceridemia y su efecto en la acumulación de mRNA de apo C-III y LPL.....	47
13	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de LPL en músculo.....	48
14	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de apo CIII en tejido muscular.....	49
15	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de LPL en tejido adiposo.....	51
16	Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de apo CIII en hígado.....	56

17 Efecto de las dietas en el peso del hígado.....57

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Composición del ácido linoleico conjugado.....	28
2 Secuencias de los iniciadores para el estándar interno.....	33

RESUMEN

Uno de los efectos benéficos que presenta el ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés) es la reducción de los triglicéridos sanguíneos. El mecanismo que explique este efecto no está aún determinado. Sin embargo, se sabe que el CLA es un ligando con muy alta afinidad por el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARs), quiénes se encuentran involucrados en el metabolismo de los lípidos. Por otra parte, el mecanismo de acción de los fibratos y las tiazolidinedionas está mediado por la activación de los PPARs, quiénes a su vez regulan la transcripción de la apolipoproteína C-III (apo C-III) y lipoproteínalipasa (LPL). Por consiguiente, se propone que al igual que estos fármacos, el efecto hipolipemiente del CLA es explicado por la regulación de la expresión de la LPL y apo C-III. El objetivo de la presente investigación es aportar datos que expliquen el mecanismo mediante el cual el CLA disminuye los triglicéridos sanguíneos. Para el análisis se extrajo el RNA total de los tejidos adiposo, hepático y muscular provenientes de 30 ratones albino (*Mus musculus*). Los ratones fueron alimentados con 5 tipo de dietas que contenían como ingrediente principal: a) 65% sacarosa para inducir la hipertrigliceridemia (SAC), b) dextrosa al 65% (DEX) como control, c) 65% SAC + ácido linoleico conjugado 1.0% (CLA), d) 65% SAC + 0.2% de troglitazona (TRO) y e) 65% SAC + 1.0% CLA + 0.2 % TRO. La cuantificación de la acumulación de mRNA de la lipoproteínalipasa y apolipoproteína C-III se realizó por la reacción de la transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se utilizó un RNA recombinante (rcRNA) como estándar interno para cuantificar los transcritos de cada gen. Los resultados señalan que en músculo el mRNA acumulado de la apo C-III de los ratones alimentados con 1% de CLA, se redujo 97% y la LPL aumentó 240% en comparación con los alimentados con SAC ($p < 0.05$). En cambio, en tejido adiposo la acumulación de mRNA de la LPL se redujo 97% ($p < 0.05$). Por otro lado, la TRO redujo en un

45% la acumulación de mRNA de la apo C-III en músculo. En tejido adiposo, se observó una reducción de los transcritos de LPL 57% en comparación con los ratones alimentados con SAC. En conclusión, se puede decir que uno de los mecanismos que están explicando el efecto hipotriglicéridémico por parte del CLA, es la regulación de la LPL y apo C-III tejido-específico a nivel de transcripción.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de desórdenes del corazón y vasos arteriales, responsables de una tasa de mortalidad de un 74.8 x 100,000 habitantes (SSA, 1999). La transición económica, urbanización, industrialización y la globalización traen como consecuencia cambios en el estilo de vida que promueven riesgos para desarrollar enfermedad cardiovascular. Recientemente se propuso que la hipertrigliceridemia es predictor de riesgo de muerte para enfermedad cardiovascular en personas con antecedentes familiares de hiperlipidemia combinada (Yamamoto y col., 1996; Austin y col., 2000).

Los fibratos y tiazolidinedionas son dos grupos de fármacos que se utilizan en el tratamiento de las hipertrigliceridemias en humanos. Diversos investigadores han propuesto que el mecanismo a través del cual estos disminuyen los triglicéridos sanguíneos, está mediado por un factor de transcripción nuclear llamado receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Los PPARs son receptores que son activados por ligandos, que se heterodimerizan con otro receptor (RXR), controlando una variedad de genes que intervienen en el metabolismo de los lípidos (Schoofjans y col., 1996).

Hay diversos compuestos con una alta afinidad por los PPARs, como los fibratos y las tiazolidinedionas, que son ligandos y activadores de los subtipos PPAR α y PPAR γ respectivamente, en diferentes tejidos (Auwerx y col., 1996; Lehmann, 1995). La lipoproteína lipasa (LPL) y la apolipoproteína C-III (apo C-III) son dos proteínas involucradas en el metabolismo de los triglicéridos y están reguladas vía PPAR. En ratones transgénicos sin el gen que codifica a los PPAR α alimentados con una clase de fibrato (Wy-14,643), se vio una reducción en la transcripción de la apo C-III en hígado (Peters y col., 1997). En

apo C-III en hígado (Peters y col., 1997). En ratas alimentadas con BRL49653 (tiazolidinediona), el RNA mensajero de la lipoproteína lipasa aumentó en preadipocitos (Ranganathan y col., 1998, Lefebvre y col., 1997). Además, al administrarse estos dos fármacos simultáneamente en ratas, el efecto fue mayor en la disminución de los triglicéridos séricos, a la vez que disminuían los transcritos de la apo C-III y aumentaba el mRNA (por sus siglas en inglés) de la LPL (Lefevre y col., 1997).

El ácido linoleico conjugado (CLA) comparte ciertas características químicas con los activadores de los PPARs como son grandes regiones hidrofóbicas y grupos carboxilo. El CLA tiene un efecto hipolipidémico en varios modelos animales, reduciendo los triglicéridos sanguíneos (Lee y col., 1994; Munday y col., 1999). De acuerdo a un estudio el isómero 10 *cis*-12 *trans* en adipocitos disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa (Lin y col., 2001). Además, en células hepáticas la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) disminuyeron, al mismo tiempo que se suprimía la secreción de triglicéridos del hígado a la circulación (Lin y col., 2001).

Se encontró que el CLA tiene una alta afinidad por los PPAR α y de afinidad intermedia para los PPAR γ . Además, algunos genes involucrados en el metabolismo de los lípidos fueron regulados por este ácido graso (Moya-Camarena y col., 1999; Belury y col., 2002). Sin embargo, aún falta más información para comprender el modo de acción del CLA en la reducción de los triglicéridos séricos. De ahí que el objetivo general de esta tesis fuera el analizar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la acumulación del mRNA de la lipoproteína lipasa y apolipoproteína C-III en ratones hipertrigliceridémicos.

ANTECEDENTES

Hipertrigliceridemias

Las alteraciones en el metabolismo de los lípidos, colesterol y triglicéridos, así como de las partículas que los transportan (lipoproteínas) se definen como dislipidemias. Estas se clasifican de acuerdo a sus etiologías como primarias y secundarias, las primeras resultan de las alteraciones en la síntesis, procesamiento o catabolismo de las lipoproteínas plasmáticas transmitidas genéticamente. Las segundas son causadas por enfermedades tales como la diabetes mellitus, obesidad, enfermedad renal entre otras o por fármacos (Halabe y col., 1998). Se considera hipertrigliceridemia cuando los niveles plasmáticos de triglicéridos se encuentran por arriba de 200 mg/dL (NIH, 2001).

Las elevaciones de los triglicéridos plasmáticos suelen acompañarse de la síntesis y secreción de triglicéridos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado. La formación hepática de triglicéridos se regula por el flujo de sustrato (la disponibilidad de ácidos grasos libres), el equilibrio energético (el nivel de los depósitos de glucógeno hepáticos), y la situación hormonal (el equilibrio entre la insulina y el glucagón). La obesidad, el consumo excesivo de azúcares y de grasas saturadas, la inactividad física, el consumo de alcohol y la resistencia a la insulina se asocian con frecuencia a la hipertrigliceridemia (González y Guevara, 1998; Scheorain y col 1980; Aarstrand y col., 1996).

En las hipertrigliceridemias el aumento del flujo de ácido grasos libres desde el tejido adiposo al hígado estimula la síntesis y secreción de VLDL. Cuando los niveles de triglicéridos VLDL están muy elevados (>11 mmol/L o >1000 mg/dL), la lipoproteínalipasa puede saturarse, incluso sin un trastorno genético, desarrollando una deficiencia durante el periodo

pospandrial. La hipertrigliceridemia familiar se hereda en forma autosómica dominante y se caracteriza por sobreproducción de VLDL en hígado y por disminución del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. La deficiencia familiar de lipoproteína lipasa causa acumulación de quilomicrones en plasma desde una edad temprana. Por su parte, la deficiencia familiar de apolipoproteína CII es un desorden autosómico recesivo, que causa deficiencia de lipoproteína lipasa y presenta manifestaciones similares a la anterior. La ausencia total de la lipasa hepática es un trastorno autosómico recesivo raro que altera el catabolismo final de las VLDL y las IDL. Los individuos con déficit de esta enzima a menudo presentan niveles elevados de VLDL y HDL; ya que esta enzima participa en la conversión de HDL₂ en HDL₃ (Halabe y col., 1997; Ginsberg y col., 1998).

Fármacos hipolipemiantes

Cuando los niveles de triglicéridos plasmáticos son mayores de 500 mg/dL, aumenta el riesgo de pancreatitis, por lo que se recomienda centrarse directamente en la reducción de éstos. El tratamiento farmacológico que se emplea puede dividirse en dos grupos: a) los que disminuyen la síntesis de VLDL y LDL (ácido nicotínico) y b) los fibratos que interfieren en la síntesis de triglicéridos-VLDL a nivel hepático y en el aumento de la actividad de la lipoproteína lipasa. No se ha podido establecer si estas dos acciones son primarias e independientes una de la otra. Con todo, los fibratos promueven la lipólisis de los triglicéridos-VLDL y la de los quilomicrones para reducir los niveles de triglicéridos (Grundy, 1990).

Fibratos

Los fibratos son un grupo de fármacos derivados del clorofenoxusobutírico, entre los más utilizados en la práctica clínica se encuentran el gemfibrozilo, bezafibrato, fenofibrato, ciprofibrato y clofibrato. Este último fue el primero en utilizarse, en los años 1960-1980, demostrando ser un fármaco hipolipemiente potente con un efecto fuerte en la disminución de las VLDL y moderado sobre las LDL. Sin embargo, los efectos secundarios a largo plazo demostraron que el clofibrato aumentaba la incidencia de litiasis biliar, la mortalidad no cardiovascular (principalmente neoplásica) y que en algunos animales se desarrollaba cáncer de hígado. Estos hechos provocaron que el clofibrato prácticamente haya dejado de utilizarse. Posteriormente surgieron el resto de los fármacos de este grupo bajo el nombre genérico de fibratos, pareciendo estar exentos de los efectos indeseables antes mencionados (Wood y col., 1999).

La acción hipolipemiente de los fibratos se debe fundamentalmente a la inducción del descenso de la concentración de las VLDL. Dicha inducción es producida por dos mecanismos diferentes: el primero es en la reducción de la síntesis de las VLDL por mecanismos todavía desconocidos. El segundo, consiste en el aumento de la degradación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, a través de la inducción de la actividad de la lipoproteína lipasa. Estos fármacos poseen un potente efecto hipotrigliceridemiante, por lo que pueden ser utilizados en las hiperlipemias que no puedan ser controladas por la dieta. Su eficacia hipocolesterolemia es menor, induciendo descensos de la concentración plasmática de colesterol que oscila entre el 5 y el 20%, según el fármaco y el tipo de intensidad de la hiperlipemia. Por esta razón su utilidad en las hiperlipemias con fenotipo IIa es limitada. El mecanismo sobre la HDL no está aclarado, pero podría estar relacionado con su

efecto sobre el metabolismo de las otras lipoproteínas. Esto porque el aumento de la concentración de HDL-colesterol no ocurre en pacientes con hipoalfalipoproteinemias aisladas (Wood y col., 1999).

Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas (TZD) son una nueva clase de agentes antidiabéticos que tienen tres compuestos de uso clínico. Éstas son la troglitazona (rezulina[®], actualmente retirada del mercado), la rosiglitazona (Avandia[®]) y la pioglitazona (Actos[®]), entre otros que se han limitado por su uso en estudios pre-clínicos. Las TZD fueron descubiertas por su acción hipoglicémica en ratones *ob/ob*, en donde mejoraron los niveles de insulina y anormalidades en el metabolismo de los lípidos y de los triglicéridos sanguíneos (Ronald y col., 2000). Estos fármacos claramente demuestran mejorar la acción de la insulina en un amplio espectro de estados insulino-resistentes, tanto en modelos obesos como en diabéticos. Cabe resaltar que las tiazolidinedionas han sido más eficaces en los roedores, llegando a prevenir o a revertir completamente los estados insulinoresistentes.

En humanos, las TZD disminuyen la glucosa en ayuno y posprandial en diabéticos tipo 2. Además, parecen tener efectos benéficos en algunos de los componentes del síndrome X (reducción de los triglicéridos sanguíneos y presión sanguínea y aumento de HDL). Es posible que al menos algunos de los efectos de las TZD en los estados insulino resistentes se deban a mecanismos secundarios. Por ejemplo, en varios estudios el tratamiento con estos fármacos se ha asociado con la reducción de los niveles de triglicéridos circulantes. Es posible que niveles elevados de ácidos grasos no esterificados contribuyan a la resistencia a la insulina, al menos en algunos estados (Olefsky, 2000). Sin embargo,

aún no está claro si el efecto en la disminución de los ácidos grasos representa una acción directa en los adipocitos o podrían ser efectos secundarios en el mejoramiento en la sensibilidad a la insulina, con un incremento en el efecto antilipolítico de la insulina.

Algunas de las drogas hipotriglicéridémicas (fibratos y tiazolidinedionas), ftalatos, plastificadores y ácido tricloroacético inducen proliferación de peroxisomas en hígado de roedores, por lo que son llamados colectivamente proliferadores de peroxisomas. Los peroxisomas son organelos celulares que tienen como principal función reacciones relacionadas al metabolismo de lípidos. Estos proliferadores de peroxisomas inducen la expresión de genes involucrados en la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial por medio de un factor de transcripción, que actúa de manera similar a las hormonas esteroideas. A este factor se le dio el nombre de receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR por sus siglas en inglés) (Dreyer y col., 1993).

Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Los PPARs son proteínas nucleares que pertenecen a la superfamilia de los receptores de las hormonas esteroideas / tiroideas / ácido retinóico. Su activación depende de ligandos y de la heterodimerización con otros receptores nucleares para modular la expresión de los genes, mediante la unión a regiones reguladoras de los genes blancos (Kersten y col., 2000).

Existen tres subtipos de PPARs caracterizados en diversas especies de vertebrados, humanos y roedores, llamados PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2) y PPAR γ 1 (NR1C3) y γ 2. En el hombre este último se ha encontrado como una variante de los arreglos postranscripcionales del

PPAR γ 1 con 30 aminoácidos adicionales. Su organización genómica consiste de 8 exones (A1, A2 y exón 1 a 6) permaneciendo dos de los primeros (A1 y A2) como no codificantes. Los PPAR γ en el ratón se localizan en el cromosoma 6 en la posición E3-F1, mientras que el PPAR α y β se localizan en el cromosoma 15 y 17 respectivamente. En el humano, el subtipo α está en el cromosoma 22 en las regiones 22q12-q13.1. En cuanto al subtipo PPAR γ está ubicado en el cromosoma 3, en la posición 3p25 cercano a los receptores RAR β y TR β (Desvergne y col., 1999; Lemberger y col., 1996).

Expresión de los PPARs en diversos tejidos

Se ha trabajado mucho sobre la expresión de los diferentes subtipos de PPARs en tejidos de roedores y humanos. La expresión de PPAR α más alta se da en grasa parda, hígado, riñón, corazón, en la mucosa del estómago y duodeno. Mientras tanto se han encontrado pequeñas cantidades en retina, glándula adrenal, músculo esquelético e islotes del páncreas. Por ello, se puede asociar la expresión del subtipo PPAR α en tejidos, con una β -oxidación alta tanto en mitocondrias como en peroxisomas. Aunque, los PPAR γ se expresan principalmente en el tejido adiposo, la mucosa intestinal, tejido linfoide, retina y músculo esquelético los expresan en pequeñas cantidades. Por otra parte el subtipo PPAR β se encuentra ubicuamente en diversos órganos tanto de roedores como en humanos. Es más abundante en músculo esquelético y cardiaco, células de sertoli y útero; también la placenta y el intestino grueso presentan expresión moderada de este receptor (Desvergne y col., 1999).

Estructura de los PPARs

La organización molecular de los PPARs consiste de 6 dominios funcionales A/B, C/D y E/F. En ellos el sitio C o sitio de enlace con el DNA (DBD por sus siglas en inglés) es el dominio más conservado entre los receptores nucleares. Su estructura se encuentra estabilizada por dos átomos de zinc enlazados a cuatro residuos de cisteína, seguido por una estructura α helicoidal (Fig. 1). Cada uno de estos dedos de zinc sirve como principal sitio de reconocimiento a las bases específicas, en la curvatura principal del DNA. Cada una de estas estructuras cuenta con un sitio que tienen funciones importantes en la especificidad del contacto con el receptor y el DNA. En el primer dedo, el sitio se conoce como caja-P, que son los aminoácidos localizados en el carboxilo terminal, los cuales determinan la especificidad del contacto del receptor con la curvatura mayor del DNA. El segundo dedo se denomina caja D y en él los aminoácidos que están entre la primera y la segunda cisteína, participan en la dimerización con otros receptores (Fig. 1). El sitio de enlace con el ligando (LBD) o dominio E, juega un papel primordial en la activación de la transcripción. Su estructura consiste de 12 hélices α antiparalelas que se encuentran organizadas en tres capas con una región hidrofóbica. En ella, los ligandos inducen un cambio de conformación, que previene la interacción con proteínas represoras (Desvergne y col., 1999; Lemberger y col., 1996; Schoojans y col., 1996).

Los PPARs como otros de los miembros de la superfamilia de las hormonas esteroideas se encuentran formando heterodímeros con el receptor del ácido retinóico (RXR). Junto a éste, reconocen secuencias específicas en los genes regulados llamadas elementos de respuesta para los proliferadores de peroxisomas (PPRE, por sus siglas en inglés). Los PPRE son definidas como dos secuencias (AGGTCA) espaciadas por un nucleótido (adenina) llamado DR1. La estructura repetida y extendida de

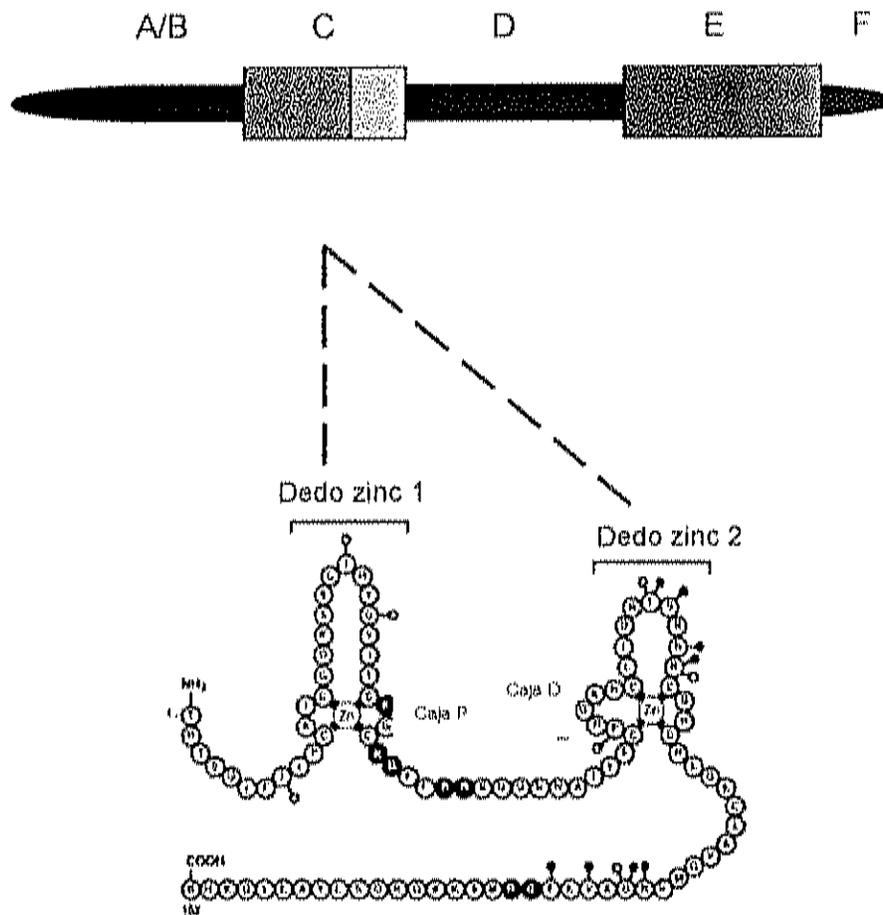


Figura 1. Estructura de los PPARs

Región **A/B** dominio modulador, **C** sitio de enlace para el DNA **D**, extensión carboxilo terminal, **E** sitio de unión con el ligando.

éstas le permite a los PPARs interactuar con los hexámeros corrientes arriba y a los RXR con los hexámeros corrientes abajo de la cadena de DNA. Esto permite discriminar la selectividad de los PPAR:RXR con otros receptores de la misma familia en el reconocimiento de estos elementos (Desvergne y col., 1999; Lemberger y col., 1996). La competencia en la formación de heterodímeros con los receptores RXR, dependerá de la cantidad de éstos dentro de la célula (Glass y col., 2000).

Durante la inhibición de la transcripción los receptores se encuentran formando complejos PPAR:RXR asociados con un conjunto multiproteico de represores (N-CoR) y silenciadores mediados por receptores de las hormonas tiroideas (SMRT). Estos complejos interactúan con numerosos ligandos, influyendo en la respuesta represiva a través de la unión del complejo al promotor. Esto evita también que la actividad de las histonas acetiladas sea unida al nucleosoma (McKenna y col., 1999).

Una de las principales formas de activar a los PPARs sucede por medio de ligandos que se enlazan al receptor (dominio LBD), disociando el complejo proteico y activando el inicio de la transcripción (Fig. 2) (Glass y col., 2000). Existen otras maneras alternativas de activación, como son a través de la cascada en la expresión de los genes de la proteína-cinasa (MAPK). Éstos incrementan la fosforilación de ciertos PPARs, al alterar la habilidad de enlazarse al DNA. Así también, algunos de los ligandos del receptor RXR actúan como reguladores de los genes que son típicamente modulados por PPAR (Desvergne y col., 1999).

Ligandos de los PPARs

PPAR α . Entre los ligandos que activan a los PPAR α se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), fibratos, fármacos antiinflamatorios

no esteroideos y leucotrienos β_4 . Algunos de estos compuestos (ácidos grasos y fibratos), vía PPAR α , modulan enzimas implicadas en la β -oxidación de peroxisomas como la acil-CoA oxidasa (ACO), enoil-CoA hidratasa/deshidrogenasa (HD) y ceto-acetil-tiolasa. Así también, la palmitoil transferasa I (CPT), enzima que participa en el sistema de transporte de ácidos grasos a la mitocondria es modulada vía PPAR α . En el hígado, muchos de los derivados de la acetil CoA son convertidos a cuerpos cetónicos. La enzima encargada de este mecanismo, también es regulada por PPAR α . La activación de los PPAR α se encuentra modulando la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en la utilización de los ácidos grasos, en respuesta a los cambios en las necesidades de la célula (Lemberger y col., 1996).

PPAR γ . Algunos de los metabolitos del ácido araquidónico, tanto de la ruta de las ciclooxigenasas como de las lipooxigenasas, son activadores de los PPAR γ . Tal es el caso de la prostanglandina 15 deoxy PGJ₂ y la 15-HETE. Los ácidos grasos poliinsaturados y compuestos derivados de la oxidación de las LDL son también ligandos naturales de los PPAR γ . Algunas de estas sustancias promueven la diferenciación de fibroblastos a adipocitos, así como también a osteocitos. La activación de los PPAR γ induce genes implicados en el depósito de ácidos grasos como la lipoproteína lipasa, la proteína transportadora de los ácidos grasos, proteína enlazadora de ácidos grasos en los adipocitos, la acil-CoA sintetasa y la fosfoenolpiruvasa carboxiquinasa. Así también, promueve la lipólisis y la lipogénesis reprimiendo a los genes del receptor β_3 -adrenérgicos y leptina. Esta última se segrega principalmente en los adipocitos y tiene una importante función en la regulación del peso corporal y el apetito (Bar-Tana, 2001; Kersten y col., 2000).

PPAR β . Entre los ligandos del receptor PPAR β / δ se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados, las prostaglandinas PG-J2 y la carbaprostaciclina (Bocher y col, 2002). Los efectos de estos receptores no se conocen aún, sin embargo se sabe de su implicación en el cáncer de colon a través de la regulación negativa del gen APC (Kersten y col., 2000). Así como también, se sugiere que su activación, promueve la acumulación de lípidos en macrófagos, por lo que se da un efecto detrimental en la aterogénesis (Bocher y col, 2002).

Apolipoproteína C-III

La apolipoproteína C-III es una proteína que se sintetiza principalmente en el hígado y en menor cantidad en el intestino delgado. Es un péptido de 99 aminoácidos, con un peso molecular de 8.8 kDa, que se encuentra codificada en el humano en el cromosoma 11, junto con los genes de la apolipoproteína A1 y A4, con un tamaño de 3.1 Kb. Debido a su alta afinidad hacia los lípidos de superficie, se asocia fácilmente con las VLDL y HDL en el plasma, y durante el ayuno se redistribuyen a la superficie de los quilomicrones y VLDL. De acuerdo a un análisis estructural, los residuos del dominio del carbón terminal 50 al 69 de la apo C-III, son los responsables de unirse a la superficie de los fosfolípidos de las lipoproteínas (Jong y col., 1999).

Los estudios con ratones transgénicos han confirmado la implicación de la apo C-III en el metabolismo de los triglicéridos sanguíneos. En estos ratones, las concentraciones de triglicéridos se ven disminuidas, cuando se suprime el gen que codifica a la apo C-III y viceversa (Maeda y col., 1994; Ito y col., 1990).

La apo C-III es la principal proteína que actúa en la lipólisis. Su función la realiza a través de la interferencia con las VLDL y la inhibición de la actividad de la LPL (Ginsberg y col., 1986; Schachter, 2001). El mecanismo bioquímico mediante el cual la apo C-III inhibe a la LPL aún permanece bajo investigación. Sin embargo, se piensa que hay una interacción entre las proteínas de la apo C-III y la LPL, independientemente de los lípidos involucrados.

Algunas hormonas como la insulina y tiroidea, el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$), interleucinas-1 y fibratos disminuyen altamente la expresión de la apo C-III. No obstante, los retinoides son uno de los principales inductores de la apo CIII (Shachter, 2001).

Lipoproteínalipasa

La lipoproteínalipasa (LPL) es una enzima que se expresa en varias células de los tejidos adiposo, hepático, músculo esquelético y cardiaco. Mientras que en pulmón, intestinos, cerebro y glándulas mamaria y adrenal se encuentra expresada en pequeñas cantidades (Flier, 1989).

La LPL se sintetiza como un precursor inactivo en el retículo endoplásmico, y su activación depende de la glicosilación de la proteína en el aparato de golgi. Esto último ocurre, cuando se modifican los residuos de la alta manosa de la LPL en su paso por la parte *cis* del aparato de golgi por la acción de la enzima n-acetilglucosamina. Es en la parte *trans* del mismo aparato, en donde la enzima activa depende de la heparina para que salga a la superficie del endotelial vascular e incorporarse a los glicosaminoglicanos (Flier, 1989).

La heparina y los glicosaminoglicanos son producidos en células madre de tejidos donde hay regulación de la LPL. Se ha encontrado que la

heparina induce la salida de la LPL a la periferia de las células, al ser inyectada a órganos, o al incubarla en células (Flier, 1989). Aunque ambas formas de LPL (activa e inactiva) también incrementan su actividad al adicionar heparina (Olivercrona y col., 1987). No obstante, cuando la enzima es purificada, la heparina no incrementa su actividad. Por lo anterior, se dice que la participación de la heparina podría ser la de estabilizador de la forma activa o protectora de su degradación proteolítica (Flier, 1989).

La LPL se encuentra unida al endotelio vascular en los proteoglicanos sulfatos de heparan; los cuales están integrados dentro del glicocálix de la membrana plasmática. Su localización exacta es en la parte final de los proteoglicanos. De tal manera, que esta ubicación facilita la unión y la hidrólisis con las lipoproteínas circulantes (Flier, 1989).

Una de las principales funciones de la LPL es la de hidrolizar a los triglicéridos de las lipoproteínas, tales como los quilomicrones y las VLDL. Sin embargo, también se ha confirmado que es un receptor de las LDL y un ligando de las VLDL (De Beer y col., 1999). Muchas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) también son el producto final de la acción de esta enzima sobre las VLDL (Goldberg, 1996).

La lipólisis mediada por la lipoproteínalipasa promueve el intercambio de lípidos entre las lipoproteínas. La evidencia sugiere que cuando las lipoproteínas son hidrolizadas a los triglicéridos séricos, algunas moléculas de HDL₃ adquieren lípidos y proteínas para convertirse en HDL₂. Además, el colesterol de las HDL puede ser reemplazado con triglicéridos de partículas menos densas. Así, los ácidos grasos hidrolizados son oxidados para generar ATP en músculo o son almacenados en tejido adiposo o secretados en la leche por la glándula mamaria (Goldberg, 1996).

Aunque la enzima se produce en varios tejidos, su actividad depende del estado metabólico del tejido. Durante el ayuno, los niveles de insulina disminuyen y la lipólisis en tejido adiposo se acelera. Estos cambios, son acompañados por una reducción en los niveles de LPL en tejido adiposo, no así en el músculo. En cambio, en una etapa posprandial, los niveles de LPL aumentan en tejido adiposo y en músculo caen o se mantienen sin cambio. (Flier, 1989).

Existen varios factores que regulan la actividad de la LPL, uno de ellos es la insulina. Algunos estudios muestran que los niveles de mRNA de la LPL aumentan, al mismo tiempo que se incrementa la actividad de la LPL salida por la heparina (Ong y col., 1988). Así pues, los glucocorticoides, las catecolaminas, las citocinas pro-inflamatorias y las TZD, regulan la actividad de la LPL en diversos tejidos. Además, su regulación se le ha involucrado con factores de transcripción tales como el SP1, RXR, la SREBP-1 y los PPAR α y γ (Raspe y col., 2001; Desvergne y col., 1999).

Mecanismo hipolipidémico de fibratos y tiazolidinedionas a través de PPARs

El mecanismo propuesto por medio del cual los fibratos ejercen su acción hipotriglicéridémica se explica a través de la regulación de la LPL y apoC-III (proteína inhibidora de la LPL). En diversos modelos animales se han mostrado que el mRNA y la actividad de la apo C-III disminuyen en hígado, mientras los transcritos de la LPL aumentan después de consumir algunas clases de fibratos (Fig. 3) (Andersson y col., 1998; Auwerx y col., 1996; Hertz y col., 1995; Mancini y col., 2001). Se han localizado los elementos DR1 en regiones reguladoras de la apo C-III, los cuales pueden

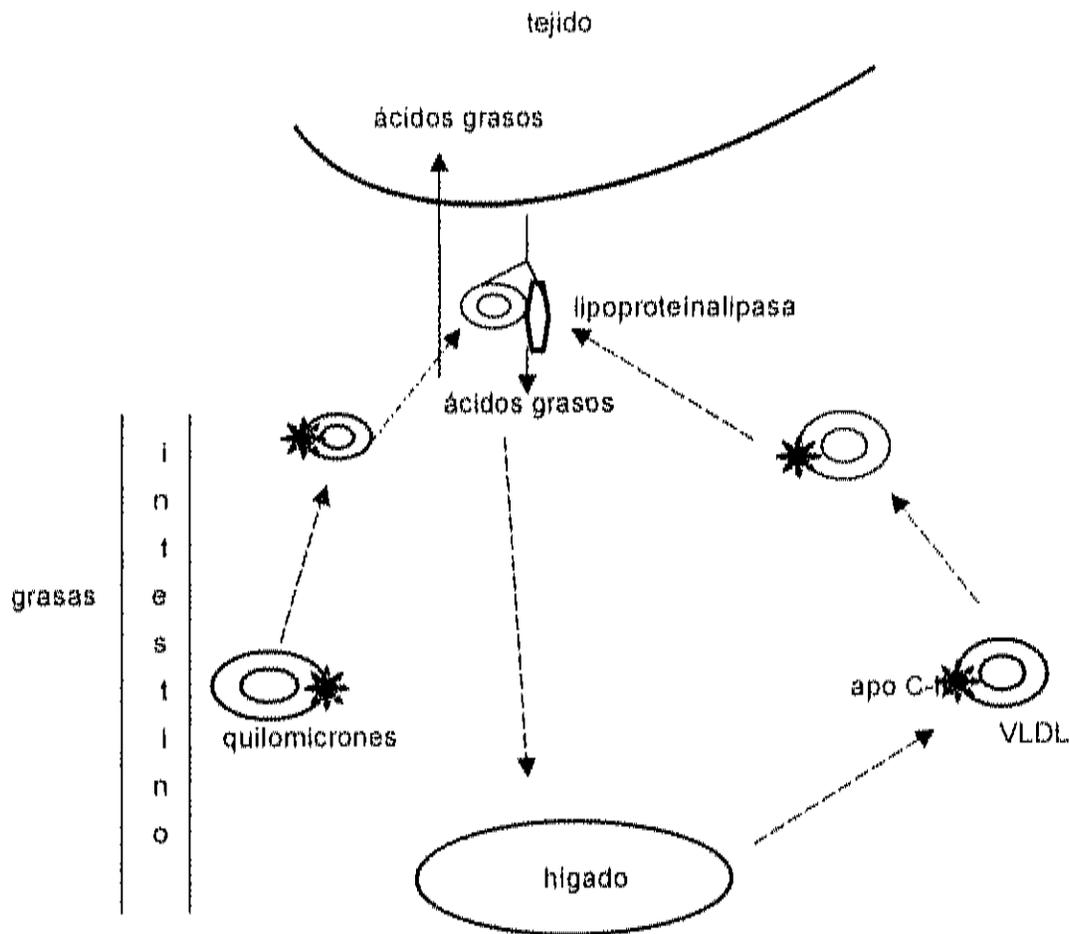


Figura 3. Mecanismo de acción de la LPL y apo C-III

-----> Circulación de las lipoproteínas (quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)).

Los triglicéridos pasan a la circulación en los quilomicrones (del intestino a los tejidos) y en las lipoproteínas de muy baja densidad (del hígado a los tejidos) los cuales acarrean la apolipoproteína C-III que inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa. La lipoproteína lipasa hidroliza a los triglicéridos que son transportados por las lipoproteínas (VLDL y quilomicrones) en el tejido adiposo, muscular y hepático.

ser potencialmente modulados por los PPARs (Ladías y col., 1992). Además, en ratones transgénicos que carecen del gen que codifica a los PPAR α , alimentados con 0,1% de un fibrato, no se observó ningún efecto en la expresión de la apo C-III en hígado. Mientras, en los ratones silvestres se observó una reducción significativa en la expresión de este gen (Peters y col., 1997). Esto sugiere que los fibratos requieren la expresión de los PPAR α para presentar sus propiedades hipolipidémicas.

Por otra parte, las TZD también disminuyen a los triglicéridos sanguíneos a través de la regulación de la LPL en el tejido adiposo. En un estudio dosis respuesta, el mRNA y la actividad de la LPL aumentaron por la acción de la rosiglitazona en preadipocitos 3T3-L1 (Subramanian y col., 1998). En células adiposas, la troglitazona es un activador de la LPL y tiene una alta afinidad por los PPAR (Lehmann y col., 1995). Esto también se apoya en la localización de los PPRE en las regiones reguladoras de la LPL para PPAR α y γ en ratas Sprague-Dawley (Schoonjans y col., 1996). Al administrarse simultáneamente fibratos (PPAR α) y TZD (PPAR γ) en ratas, el efecto fue mayor en la disminución de los triglicéridos séricos. A su vez, se disminuyeron los transcritos de la apo C-III y aumentó el mRNA de la LPL (Lefevre y col., 1997). Por lo anterior, se concluye que las tiazolidinedionas aumentan a la LPL en tejido adiposo a través de activar a los PPAR γ . Por su parte, los fibratos disminuyen la apo C-III, en hígado y músculo, vía la activación de PPAR α .

Algunos de estos fármacos hipolipemiantes comparten ciertas características químicas con el CLA; como son grandes regiones hidrofóbicas y grupos carboxilo.

El ácido linoleico conjugado

Se conoce como ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés) a una mezcla de isómeros de posición y geométricos del ácido linoleico (18:2); en donde los dobles enlaces están separados por un solo enlace sencillo. Aunque existen diversas formas sintéticas del CLA; uno de los principales isómeros dietarios es el 9 *cis* 11 *trans*. Éste se forma como un producto de la actividad de una isomerasa generada por la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens*; encontrada en la microflora de rumiantes. El 9 *cis* 11 *trans* así formado puede ser metabolizado o biohidrogenado por los microorganismos del rumen a 11 *trans* octadecanoico. Después, se absorbe en las células para ser convertido de nuevo por la acción de la estearoil-CoA desaturasa (enzima citoplasmática), a 9 *cis* 11 *trans*. Esta parece la principal vía por la que se forma el CLA en los productos de los rumiantes. Hay evidencia de que también se puede formar el isómero 10 *trans* 12 *cis* a partir del ácido linoleico, por la acción de otras bacterias del rumen (*Propionibacter* *is*), que se absorbe en los tejidos en una forma análoga al 9 *cis* 11 *trans* (Pariza, 2001).

El CLA se puede encontrar principalmente en carne de rumiantes, leche y productos lácteos. Los aceites vegetales parcialmente hidrogenados y productos marinos también lo contienen en cantidad menor. Las concentraciones de CLA en los lácteos van desde un 2.9 a 8.92 mg de CLA/g de grasa, de los cuales el isómero 9 *cis*, 11 *trans* contiene un total de 73% a 93% del total del CLA. En quesos y carnes varía de 0.1 mg de CLA/g grasa hasta un 7.96 mg de CLA/g de grasa. Estas diferencias, son debidas a las diversas prácticas de alimentación como tipo de dieta, suplementación con ácidos grasos y a las variaciones del forraje a través del año (Kelly, 2001).

Como otros ácidos grasos poliinsaturados, el CLA se incorpora en los fosfolípidos de las membranas celulares. Con esto se modifica la fluidez y se alteran algunos eventos en la traducción de señales, además de la interferencia en la síntesis de eicosanoides. Los principales tejidos en donde se concentra la mayor cantidad del isómero 9 *cis* 11 *trans* son en los fosfolípidos del hígado, piel, hueso, músculo y glándula mamaria. En cambio, el 10 *trans* 12 *cis* lo hace preferentemente en lípidos neutros de músculo y glándula mamaria. Este último, al parecer tiende a metabolizarse más rápido que el 9 *cis* 11 *trans* ya que su incorporación es menor en las membranas de los tejidos (Pariza, 2000).

El CLA altera la síntesis de eicosanoides, siendo este, uno de los mecanismos que podrían explicar los efectos benéficos al sistema inmune y cáncer. El CLA y el ácido linoleico compiten por el mismo sistema enzimático ($\Delta 6$ desaturasa y elongasa), a través del cual modulan la acumulación del ácido araquidónico en los fosfolípidos. El resultado de este evento por el CLA, produce la disminución de los productos de la vía ciclooxigenasas (disminución de prostanglandinas E2 y F2 α) y de las lipooxigenasas (leucotrienos B4 y C4) (Fig. 4). Sin embargo, el mecanismo que tiene el CLA para reducir al ácido araquidónico y éste a su vez a productos derivados de la síntesis de eicosanoides, no ha sido resuelto aún. Por lo que se piensa que el CLA podría estar desplazando al ácido araquidónico en los fosfolípidos de las membranas celulares, o reducir la expresión/actividad de la enzima ciclooxigenasa (Belury, 2002).

Efectos benéficos del CLA

En varios estudios con animales, se ha demostrado la actividad anticarcinogénica del CLA en la progresión de hematomas y adenocarcinoma de pulmón. Además, inhibe tumores en piel, colon y

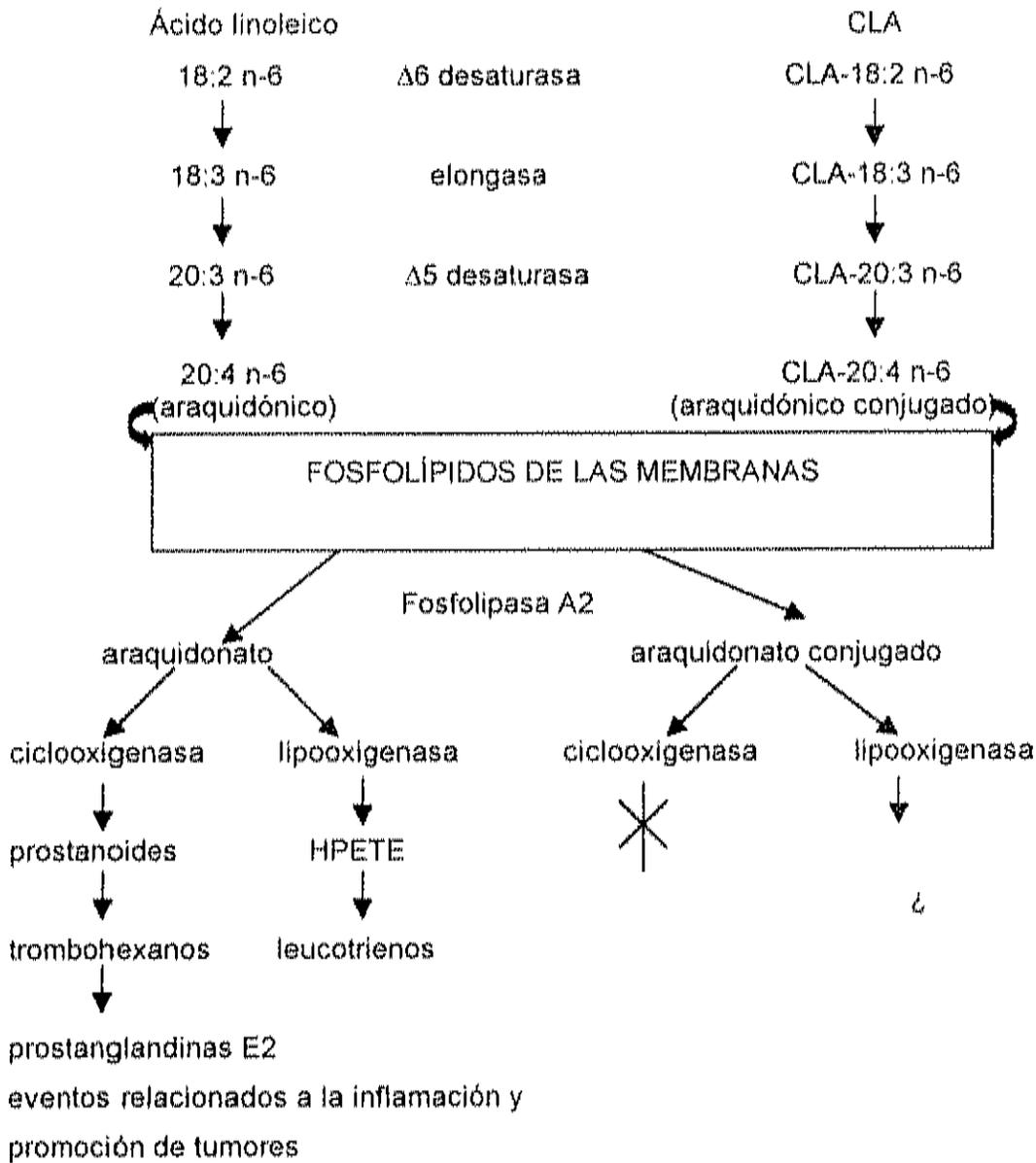


Figura 4. Regulación de eicosanoides por el CLA

a) El ácido linoleico conjugado (CLA) compite con el ácido linoleico en la síntesis de eicosanoides.

glándula mamaria, en donde al parecer se encuentra modulando eventos en el ciclo celular, disminuyendo con esto la proliferación celular en estados carcinogénicos. En numerosos tejidos como el adiposo, hepático y mamario, el CLA induce la apoptosis en células con lesiones premalignas, siendo este un evento que ofrece protección a través de la muerte programada de las células (Belury, 2002).

Las citocinas son mediadores de la respuesta inmune e inflamaciones producidas por macrófagos y otras células del sistema inmune en respuesta a un estímulo. El factor de necrosis tumoral ($TNF\ \alpha$) junto con las interleucinas (IL-1) induce efectos en las células del sistema inmune incluyendo la respuesta a la inflamación. Las $TNF\ \alpha$ aparecen como mediadores en muchas patologías crónicas como la caquexia (síndrome que conlleva a la pérdida de la masa muscular), aterosclerosis, carcinogénesis y obesidad. El CLA disminuye a las interleucinas IL-2 y tiene protección en contra de la caquexia en ratones inyectados con $TNF\alpha$. Así pues, hay investigaciones que indican que el CLA tiene un efecto benéfico en enfermedades, como el SIDA y diversas etapas del lupus eritomatoso (Whigham y col., 2000)

El CLA mejora algunos de las manifestaciones de la diabetes mellitus, como son bajar los niveles de glucosa y de insulina en ayuno (Houseknecht y col., 1998). Así también, el CLA modula la entrada de la glucosa hacia el músculo en modelos animales y reduce la resistencia a la insulina en ratones. En humanos se mejoran los niveles de glucosa en ayuno y de leptina en plasma con la suplementación con CLA (Belury, 2002).

El CLA ejerce un efecto antiaterogénico en diversos modelos animales, teniendo su principal impacto en la regresión de la placa ateromatosa inducida con dietas aterogénicas (Kritchevsky y col., 2000; Khosla y col., 2001). Además, mejora los niveles de las LDL-colesterol y

disminuye la secreción de la apolipoproteína B en células hepáticas. No obstante, hay controversia en la respuesta del CLA en el desarrollo de la aterosclerosis. Munday y col. (1999), encontraron que se favorece la formación de estrias en los ateromas, en ratones C57BL/6 alimentados con 5 g CLA/kg por 15 semanas.

Efecto hipolipemiante del CLA

El CLA también presenta propiedades hipolipidémicas en diversos modelos animales. En conejos y ratones alimentados con 0.5 g CLA/kg dieta y 5 g CLA/kg dieta, la concentración de los triglicéridos y colesterol séricos se redujeron con respecto al grupo control (Lee y col., 1994; Munday y col., 1999). En hamsters, el isómero 9 *cis*, 11 *trans* también disminuyó los niveles de triglicéridos, después de 8 semanas de ser alimentados con 6.6 g/kg dieta (Decker y col., 1999). En ratas, el descenso de triglicéridos se obtuvo con 0.5% de CLA (9.8% 11 *cis* 13 *trans*, 11, 2% 10 *trans* 12 *cis*, 19.6% otros) (Szymczyk y col., 2000). El mecanismo de acción a través del cual disminuye los triglicéridos sanguíneos aún no es completamente claro. Sin embargo, se sabe que el CLA presenta diferentes efectos en diversos tejidos explicando esta acción.

En el hígado el CLA se encuentra modulando la secreción y la repartición de lípidos. Una de las principales lipoproteínas que llevan triglicéridos del hígado a los tejidos, las VLDL, resultan disminuidas en suero de ratas Sprague-Dawley después de ser alimentadas con 3 g/100 g de CLA (Stangl, 2000). En condiciones *in vitro*, el isómero 10 *trans* 12 *cis* en células hepáticas G2, disminuye a las VLDL al mismo tiempo que reduce la secreción de los triglicéridos del hígado a las células (Lin y col., 2001). Así también, la síntesis y el almacenamiento de los triglicéridos en

células hepáticas están modulados por el CLA, a través de la enzima 9 desaturasa (Evans y col., 2002).

El CLA induce reducción en el contenido de grasa tanto *in vitro* como *in vivo*, en animales y humanos (Park y col., 1997; Smedman y col., 2001). Uno de los mecanismos que explican este efecto es la regulación de la lipólisis. En ratones y ratas OLEFT (modelo con diabetes mellitus tipo 2) la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa (CPT), enzima moduladora de la β -oxidación mitocondrial se aumenta por acción del CLA. Con esto se previene la acumulación de los TG y se reduce la masa grasa (Rahman y col., 2001, Park y col., 1997). El isómero 10 *trans* 12 *cis* en cultivos de adipocitos 3T3-L1, disminuye la actividad de la LPL. Esta reducción podría estar explicando los cambios en la composición corporal de ratones, y la disminución de los triglicéridos séricos (Park y col., 1999; Lin y col., 2001).

Algunos de los efectos del CLA sobre el metabolismo de los lípidos podrían atribuirse a la regulación a través de PPAR α . Esto porque el isómero 9 *cis* 11 *trans* resulta tener una gran afinidad por el subtipo α , regulando el mRNA de enzimas típicas moduladas por los proliferadores de peroxisomas vía el subtipo α . Estas enzimas son la L-FABP enzima enlazadora de los ácidos grasos, citocromo CYP4A1, y la acil-CoA oxidasa (Moya-Camarena y col., 1999).

HIPÓTESIS

El ácido linoleico conjugado regula la expresión de la lipoproteína lipasa y apolipoproteína C-III para la remoción de los triglicéridos sanguíneos.

OBJETIVOS

General

Analizar el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la acumulación del mRNA de la lipoproteína lipasa y apolipoproteína C-III en tejido adiposo, muscular y hepático.

Particulares

Cuantificar la acumulación de mRNA de apolipoproteína C-III en tejido hepático y muscular y lipoproteína lipasa en tejido adiposo y muscular, de ratones hipertrigliceridémicos alimentados con dietas que contenían CLA (1% en peso).

Cuantificar la acumulación de mRNA de apolipoproteína C-III y lipoproteína lipasa en tejido muscular y adiposo, de ratones hipotrigliceridémicos alimentados con una dieta que contenía TRO (0.2% en peso).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y dietas

El ácido linoleico conjugado fue donado por Pharmanutrients™ (Illinois, EUA) cuya composición se muestra en el Cuadro 1. La Rezulina™ (Park-Davis, NJ EUA) fue adquirida en una farmacia local.

Se estudiaron 30 ratones albino machos (*Mus musculus*) de tres semanas de nacidos, con peso corporal de 21 a 24 g. Los ratones fueron agrupados aleatoriamente en jaulas (n=6 por tratamiento) para asignarles una de las cinco dietas isocalóricas. Se indujo hipertrigliceridemia a los ratones formulando las dietas con 65% de sacarosa (SAC) (Sheorain y col., 1980). Las dietas experimentales fueron: a) SAC: sacarosa 65%, b) CLA: CLA 1% y sacarosa 65%, c) TROG: troglitazona 0.2% y sacarosa 65%, d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona y e) DEX: 65% dextrosa como control. El efecto de estas dietas sobre las concentraciones de triglicéridos séricos en ratones albino fue determinado previamente y se presentan en la Fig. 5 (Ayala, 2002).

Los animales fueron alimentados con dietas estándar durante una semana y tres semanas con las experimentales. Se les proporcionó agua y alimentos *Ad libitum* y se mantuvieron en un cuarto con temperatura y humedad controladas (23°C y 50% humedad relativa, respectivamente) con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Al término de las cuatro semanas, los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO₂. Se disectaron los tejidos muscular, hepático y epididimal y se congelaron en nitrógeno líquido para después almacenarlos a -70°C hasta su análisis. El hígado se pesó previamente a la congelación.

Cuadro1. Composición del ácido linoleico conjugado (Tonalin, Pharmanutrients, Illinois, EUA)

	NOMBRE COMÚN	COMPOSICIÓN
	%	%
C16:0	Ac. Palmítico	6.9
C18:0	Ac. Estéarico	2.4
C18:1 c9	Ac. Oleico	13.5
C18:2c9,c12	Ac. Linoleico	1.4
C18:2,conjugado total	CLA	73.6
C18:2conjugado c9,t11	CLA	34.4
C18:2conjugado t10c12	CLA	35.1

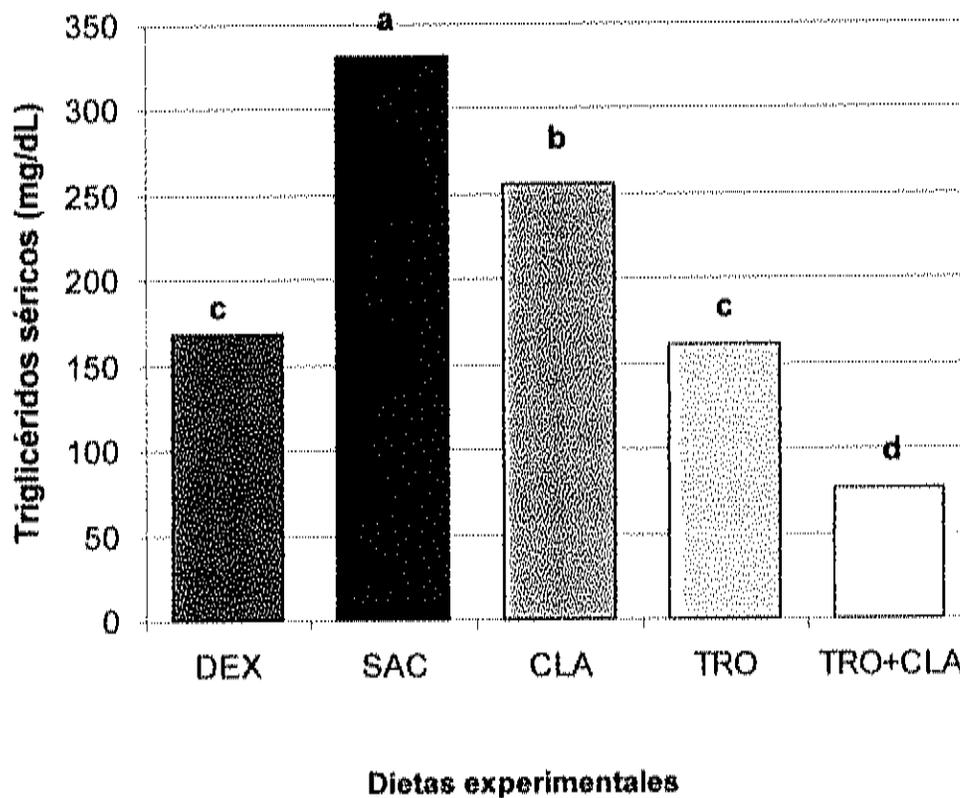


Figura 5. Efecto de las dietas experimentales sobre las concentraciones de triglicéridos sanguíneos. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona, d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona y e) DEX: 65% dextrosa como control. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Fuente: Ayala, 2002.

Extracción de RNA total

Las extracciones del RNA total de los tejidos adiposo, muscular y hepático, se hicieron siguiendo el método de Chomczynski y col, (1987). Esta técnica constó de 4 pasos: Homogenización con el reactivo Tri-reagent, (Molecular Research Inc, Cincinnati, EUA) con el fin de inhibir la actividad de las RNasas y lisar los tejidos. La separación se llevó a cabo con cloroformo, para aislar el RNA del DNA y proteínas. El RNA se precipitó con isopropanol, para al final lavarlo con etanol al 75%. El RNA obtenido se resuspendió en 200 μ L de agua deionizada. La concentración de RNA total fue calculada mediante la lectura de absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU 530). Los extractos de RNA total fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

Reacción de la transcriptasa reversa acoplada con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (cRT-PCR)

La RT-PCR es una herramienta útil para amplificar mRNAs específicos, especialmente aquellos que se encuentran en un número de copias muy bajas. Además, el uso de RT-PCR cuantitativa permite comparar el efecto de diferentes tratamientos sobre la acumulación de un mRNA específico aún cuando las diferencias entre tratamientos no son muy marcadas.

En el presente estudio se utilizó la metodología descrita por Vanden Heuvel y col., (1993), para la cuantificación de moléculas de mRNA de interés. Este método incluye el uso de un RNA recombinante (rcRNA por sus siglas en inglés) como estándar interno (E.I) que se amplifica junto con el gen de interés, para aumentar la reproducibilidad en la cuantificación del

número de copias presentes. Esta molécula control o estándar interno es una molécula de RNA que contiene las mismas secuencias de los iniciadores para amplificar a los genes de interés. Los productos de PCR generados a partir de este estándar interno pueden distinguirse del mRNA por sus diferencias en tamaño.

Construcción del estándar interno

Para la construcción del estándar interno se diseñaron los iniciadores de aproximadamente 60 pares de bases que contienen las siguientes secuencias: el promotor de la RNA polimerasa T7, los genes de interés (LPL, apoC-III o β -actina), β -globina como "espaciador" y una cadena poli (dT) como se muestra en la Figura 6. Los iniciadores del estándar interno sentido contienen las secuencias del promotor de la RNA polimerasa T7, el gen de interés sentido, la β -globina sentido. El iniciador antisentido contiene las secuencias para la β -globina antisentido, gen de interés antisentido y oligonucléotidos de timina (dT₁₅). Las secuencias de los iniciadores para la síntesis del estándar interno se muestran en el Cuadro 2. Todos los iniciadores fueron sintetizados y purificados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX, EUA).

Se utilizó DNA genómico humano como templado para la amplificación del gen "espaciador" (β -globina en este caso) al cual se incorporaron las secuencias antes mencionadas. Este producto fue transcrito a RNA por el promotor de la RNA polimerasa T7 utilizando el sistema de transcripción *in vitro* Riboprobe® Gemini II (Promega Corp., Madison WI). El procedimiento detallado de la síntesis del estándar interno se describe en el Anexo I.

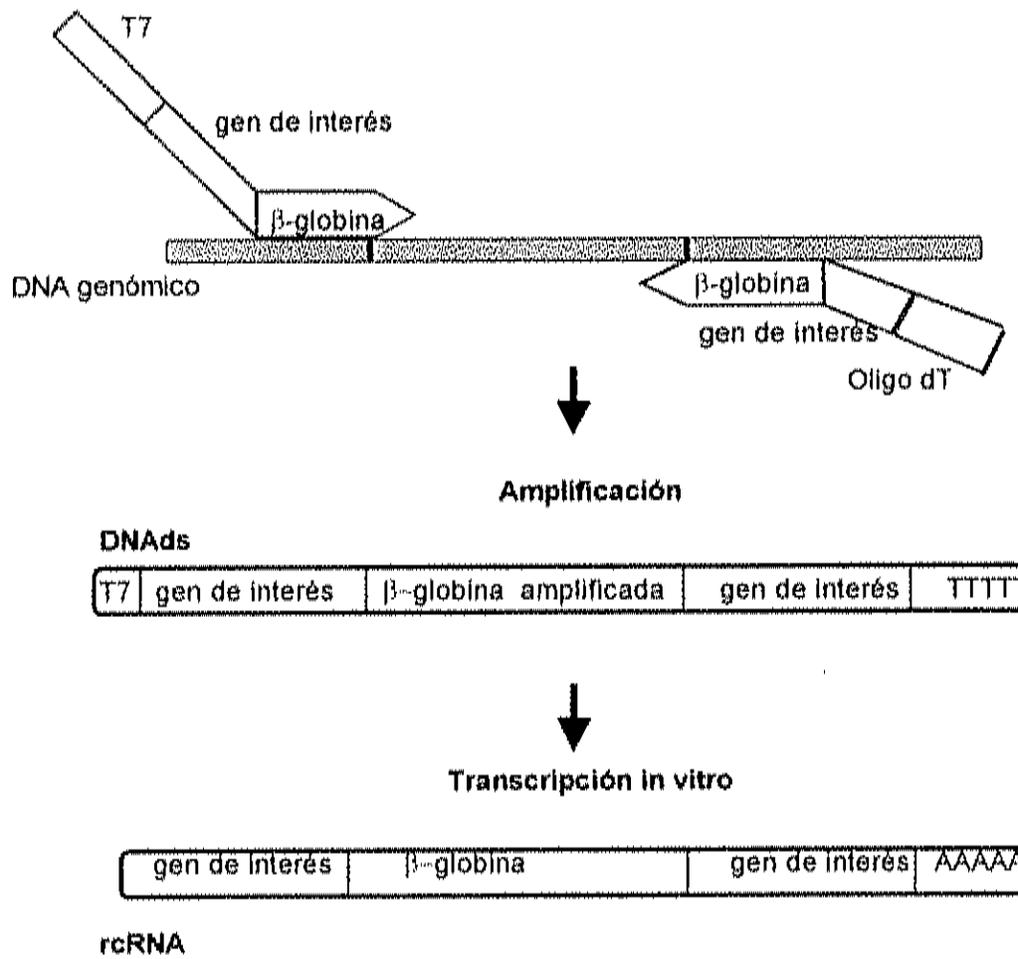


Figura 6. Síntesis del estándar interno

Cuadro 2. Secuencias de los iniciadores para el estándar interno

	SENTIDO	ANTISENTIDO
T7	5'TAATACGACTCACTATAGG 3'	-
LPL	5'TTAAACGGTGGCTAACCCAG3'	5' TGAGCCATGTCTTCAACTGC3'
Apo C-III	5'ATATAGCTGTGGTGGCCAGG3'	5'GGGAGGGTGAAGACATGAGA3'
β -actina	5' CCTCTATGCCAACACAGT 3'	5'AGCCACCAATCCACACAG 3'
β -globina	5'CAACTTCATCCACGTTCAACC3'	5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'
Oligo dT	-	TTTTTTTTTTTTTTTTT

Síntesis de cDNA

El DNA complementario (cDNA por sus siglas en inglés) se sintetizó a partir del RNA total aislado de los tejidos provenientes de los ratones alimentados con las dietas experimentales, utilizando la reacción de la transcriptasa reversa. Esta reacción se realizó en un volumen total de 20 μ L con una solución amortiguadora Tris-HCl (16.6 mM sulfato de amonio, 1 M Tris, pH 8.8, 6.8 μ M EDTA, 0.1 mg/mL BSA y 50 mM β -mercaptoetanol) con 2.5 unidades de transcriptasa reversa (MMLV, Gibco Life Technologies; Gaithersburg, MD), 2.5 mM oligo(dT)₁₅ (Promega Co. Madison, WI), 5 mM MgCl₂, de 250 a 1000 ng de RNA total y varias concentraciones del estándar interno (rcRNA) para la construcción de la curva estándar. Las reacciones de la transcriptasa reversa (RT por sus siglas en inglés) para los extractos de RNA total, contenían una cantidad de estándar interno que permitiera la visualización de las dos bandas (estándar interno y gen de interés) simultáneamente (Figura 7). Para determinar dicha cantidad de estándar interno se buscó el rango de concentración óptima como se describe a continuación.

Rango de concentración óptima

Para cada gen de interés se determinó la concentración de estándar interno a utilizar, coamplificando una cantidad fija de RNA (50 ng a 1000 ng) con diluciones seriadas 1:10 del estándar interno (10^9 , 10^8 , 10^7 , etc.). El rango de dilución dependía del nivel de expresión del gen y que tan inducible era por los tratamientos. Las condiciones de RT-PCR se describen en la siguiente sección. Los fragmentos fueron separados en geles de agarosa al 3 % ó 3.5 % dependiendo del peso molecular del gen

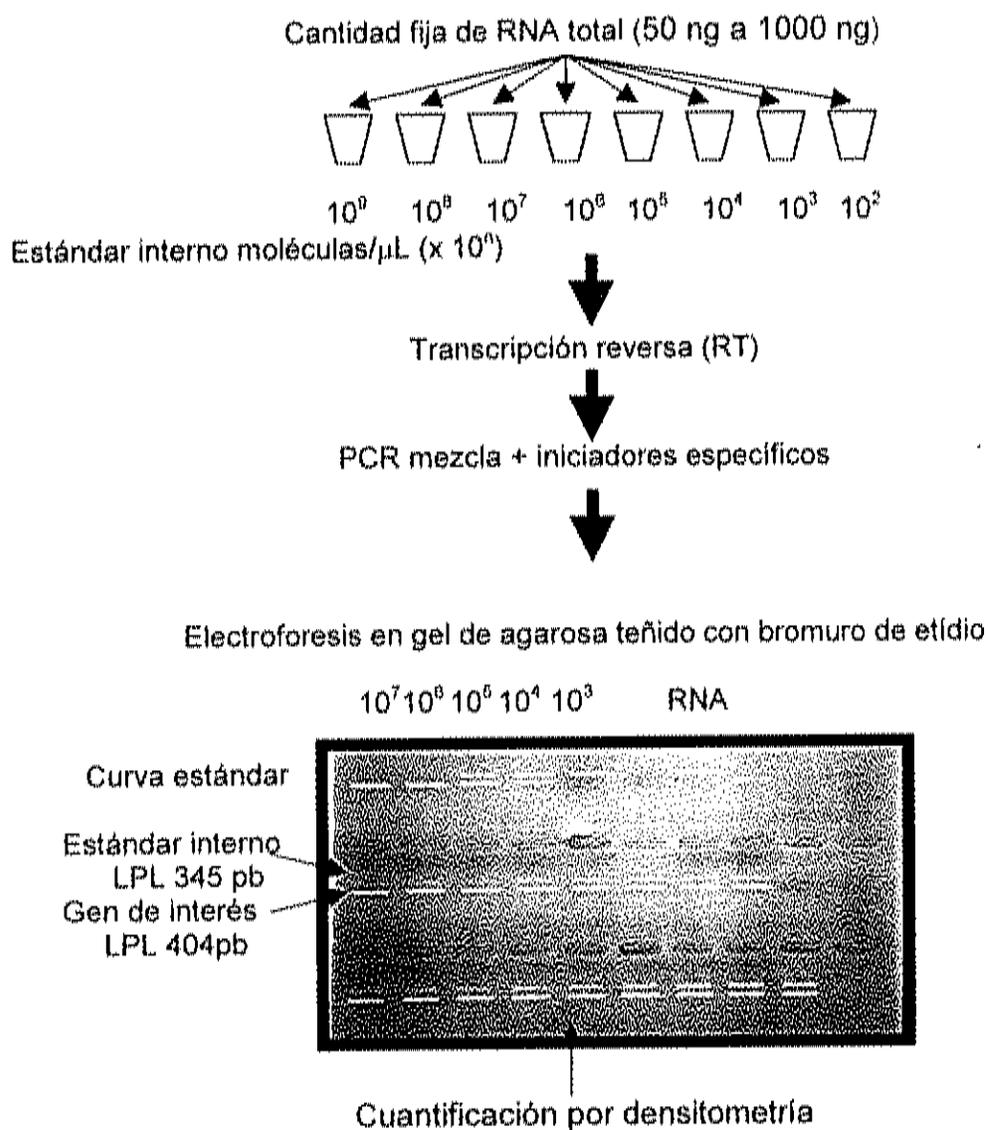


Figura 7. Esquema general de la cuantificación del mRNA usando RT-PCR competitiva.

El rcRNA es sintetizado con un peso molecular diferente, de tal manera que los productos de las reacciones por RT-PCR puedan ser diferenciados de los genes de interés. Diferentes diluciones del estándar interno son puestas junto con el RNA total antes de la transcripción reversa.

de interés y el estándar interno para lograr la separación de las bandas de los productos de PCR. El criterio para seleccionar la concentración óptima de estándar interno en cada tratamiento fue que ambas bandas (gen de interés y estándar interno) se observaran con igual intensidad.

Como ejemplo, se presenta la búsqueda del rango de concentración óptima para LPL en músculo (Fig. 8a). Como se observa, se requirió 7.50×10^6 moléculas de estándar interno para visualizar las dos bandas en los tratamientos SAC, TRO y TRO-CLA. Por lo tanto, ésta fue la concentración de estándar interno utilizada para la cuantificación de este gen (Fig. 8b).

Amplificación

Los oligonucleótidos para la amplificación de la lipoproteína lipasa, apolipoproteína C-III y β -actina, fueron obtenidos de la secuencia de RNA mensajero de ratones (*Mus musculus*) publicados en la National Center for Biotechnology Information (NCBI), para no incluir regiones no codificantes (intrones). Los iniciadores fueron diseñados utilizando la base de datos computarizada Oligo™ (National Biosciences, Hamel Minesota, EUA).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L que contenía solución amortiguadora Tris-HCl (16.6 mM sulfato de amonio, 1 M Tris, pH 8.8, 6.8 μ M EDTA, 0.1mg/mL BSA y 50 mM β -mercaptoetanol) 3 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, 0.6 nM iniciadores para sentido y antisentido, 2.5 unidades de DNA polimerasa Taq. La amplificación se llevó a cabo en una termocicladora (Gene Amp® PCR System 9700, PE Biosystems). Las reacciones fueron primeramente calentadas a 85°C durante 30 s, 94°C por 3 min, para después pasar por 35 ciclos que incluyen 94°C por 30 s, 30 s de alineación y la desnaturalización a 72 °C por 30s. Las temperaturas óptimas de alineación

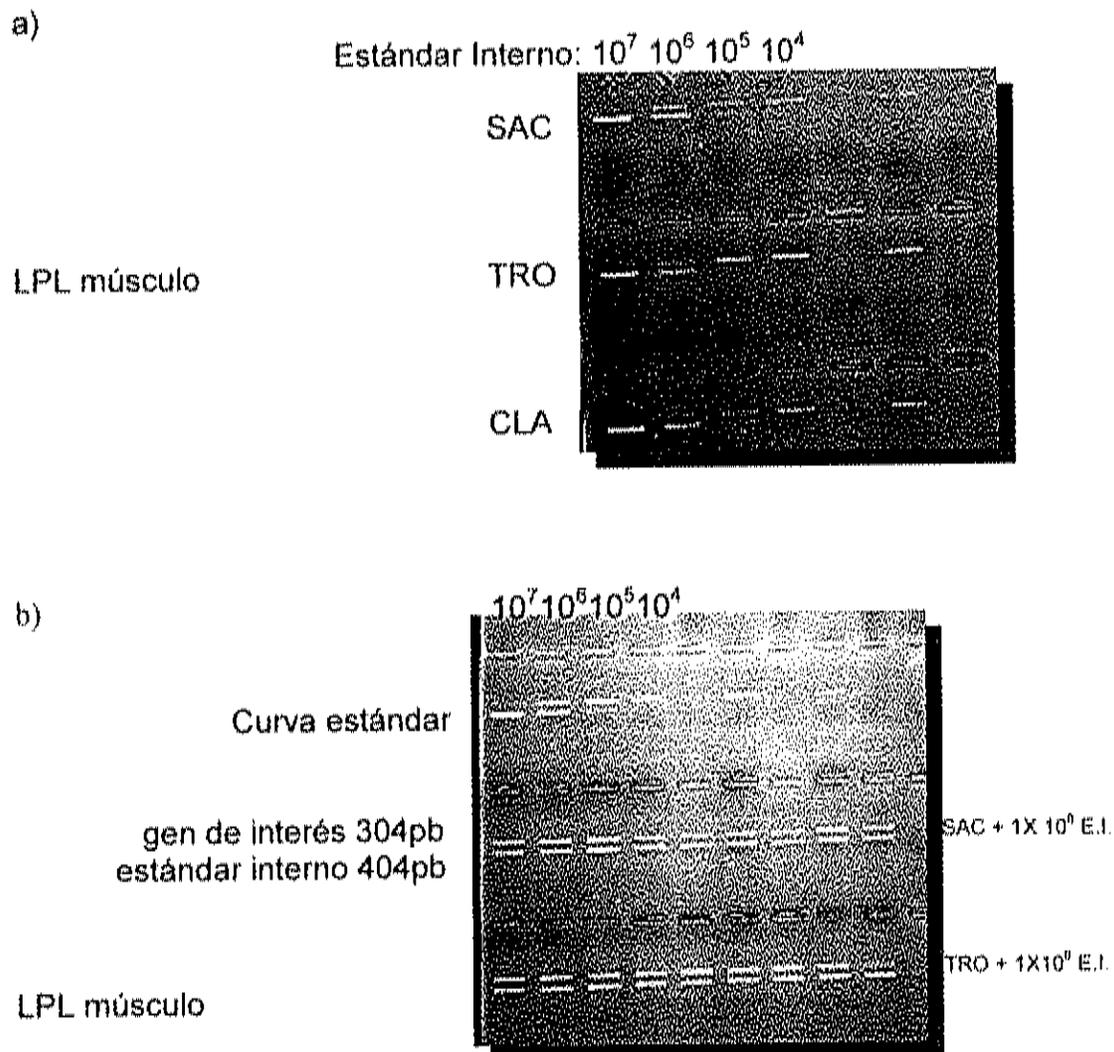


Figura 8. Rango de concentración óptima. a) La filas contenían 50 ng de RNA proveniente de músculo gastrocnemius de ratones alimentados con las dietas SAC, TRO y TRO-CLA y la concentración indicada de estándar interno. b) Reacción para la cuantificación de LPL en músculo de ratones alimentados con la dieta SAC y TRO. La curva estándar fue construida con una cantidad fija de RNA (50 ng) y 7.5×10^7 , 7.5×10^6 , 7.5×10^5 y 7.5×10^4 moléculas de RNA. Para la cuantificación de LPL en músculo gastrocnemius proveniente de los ratones alimentados con las dietas SAC y TRO, las reacciones incluyeron 50 ng de RNA y 7.5×10^6 moléculas del estándar interno.

para cada uno de los genes fueron las siguientes: β -actina 54 °C, apo C-III 59.8 °C y LPL 56.8 °C. El ciclo final se terminó con 72 por 5 min., para posteriormente pasar a un enfriamiento a 4 °C.

Las concentraciones de estándar interno y de RNA total que se colocaron para cada uno de los genes en los diferentes tejidos fueron las siguientes: apo C-III en hígado E.I 2.10×10^{10} , RNA total 50 ng; apo C-III en músculo E.I 2.10×10^7 , RNA total 50 ng; LPL en tejido adiposo E.I 7.50×10^7 , RNA total 1000 ng dieta con CLA de LPL el E.I fue 7.50×10^5 E.I y LPL en tejido muscular E.I 7.50×10^6 , RNA total 50 ng.

La visualización de los productos de las reacciones por RT-PCR fue hecha en gel de agarosa (NUSIEVE™). La concentración de éstos fue de 3 a 3.5 %, teñidos con 10 mg/mL de bromuro de etidio añadido en el momento de la gelificación. Cada pozo contenía 30 μ L de los productos de PCR. La densidad de las bandas se determinó con el densitómetro GS-700 Imaging Bio Rad, con el programa Quantity one® Bio-Rad vs. 4.3. Para la cuantificación del número de moléculas del acumulado del mRNA de la LPL, apo C-III y β -actina en los diferentes tejidos, se usó el método propuesto por Gilliland y col., (1990) (ver anexo 2).

DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El diseño del experimento fue completamente al azar, en donde las variables de respuesta fueron la acumulación de mRNA de la lipoproteína lipasa, apolipoproteína C-III y β -actina. Las diferencias entre tratamientos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA), comparando las medias obtenidas por la prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de 0.05%. El paquete estadístico utilizado fue NCSS vs 2001.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del gen constitutivo β -actina

Los genes constitutivos son aquellos cuya expresión se da siempre en una célula y no está sujeta a una regulación por factores externos. Es decir, este tipo de genes no son inducibles. Éstos pueden ser comunes o no a células de otros tipos, y codifican a proteínas que están siempre presentes en la célula, sean abundantes o minoritarias.

Se recomienda la amplificación de un gen constitutivo como control, para asegurar que las diferencias encontradas entre tratamientos no sean ocasionadas por errores metodológicos (por ejemplo: la cuantificación del RNA total, la eficiencia en las reacciones por PCR).

En este estudio se utilizó a la β -actina como gen constitutivo. La actina es una proteína que forma parte del citoesqueleto de una variedad de células. Ella está formada de filamentos que consisten de dos cadenas que contienen una serie de subunidades unidas en forma helicoidal. Se encuentra conectada con las proteínas integrales de la membrana y algunos de estos filamentos son comunmente relacionados a los del músculo, sin embargo son diferentes. Una de sus principales funciones es la de moverse de una superficie a otra o cambiar su forma en el interior. La participación en la división celular con otras dos proteínas del citoesqueleto también forma parte de su función (Lewin, 1997).

En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en la acumulación del mRNA de β -actina por las dietas experimentales en los tejidos analizados (Figs. 9,10 y 11). Se tomó como 100% la dieta que contenía 65% de sacarosa, la cual fue utilizada como grupo control.

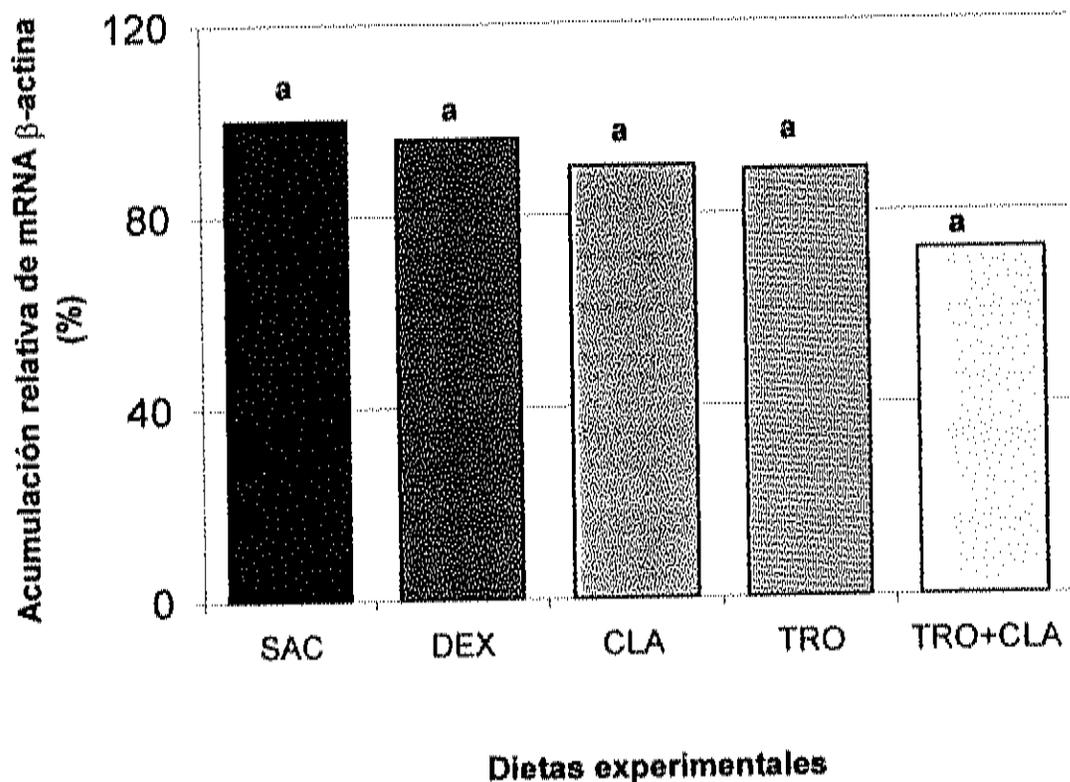


Figura 9. Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de β -actina en tejido adiposo. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona, d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona y e) DEX: 65% dextrosa como control. La concentración de estándar interno fue 1.07×10^7 y de RNA total 250ng. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p > 0.05$).

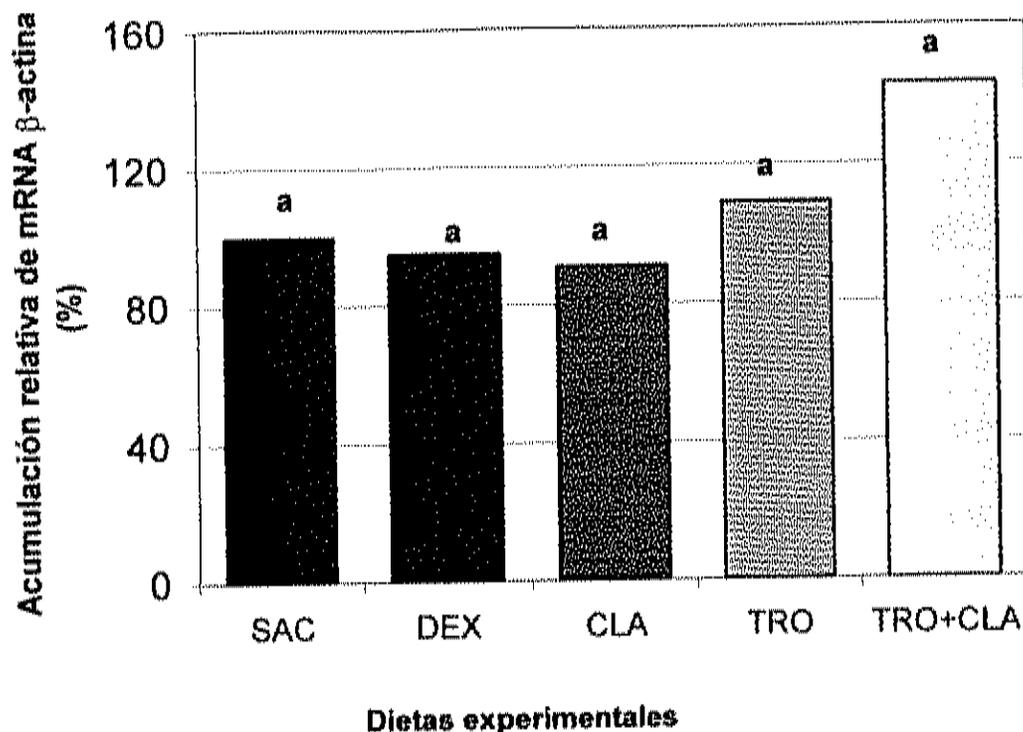


Figura 10. Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de β -actina en músculo. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona, d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona y e) DEX: 65% dextrosa como control. La concentración de estándar interno fue 1.07×10^9 y RNA total 250 ng. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p > 0.05$).

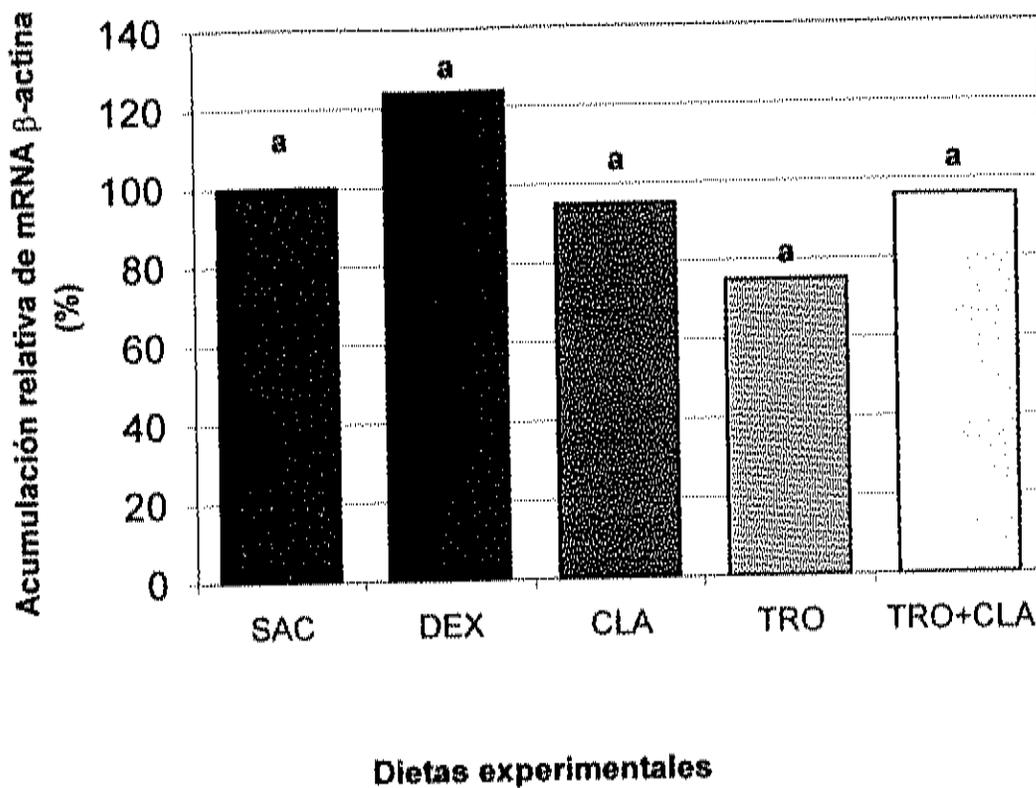


Figura 11. Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de β -actina en hígado. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona, d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona y e) DEX: 65% dextrosa como control. La concentración de estándar interno fue 1.07×10^9 y RNA total 250ng. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Ventajas y desventajas de la RT-PCR comparadas con otras técnicas de análisis de mRNA

Aunque es posible detectar y amplificar una gran variedad de transcritos, lo más difícil ha sido cuantificar el mRNA presente en las células. Uno de los procedimientos clásicos que se utilizan para el análisis del mRNA es la prueba del Northern Blot o su análoga dot blot. La base de la técnica es la reasociación de las cadenas simples y complementarias del RNA, siendo el principio para la detección de ácidos nucleicos en una muestra problema. Se debe identificar, purificar y marcar un fragmento de una de estas cadenas (sonda) que contenga una secuencia de bases específica o característica de la especie, subespecie, cepa o aislado de interés, para luego detectar la presencia de la cadena complementaria en el ácido nucleico bajo estudio. En este tipo de reacciones se debe garantizar las condiciones necesarias para que ambos fragmentos, sonda y blanco, se encuentren e hibridicen. Si no existe complementariedad de secuencias entre la sonda de la cadena sencilla y el RNA problema, el marcaje no será detectado (Heracles y col., 2000).

Aunque las ventajas que ofrecen estos sistemas es el análisis de múltiples genes. Estas técnicas no cumplen con los requisitos de ser específicas, sensitivas, rápidas, con procedimientos manuales que permitan su automatización y con sistemas de detección no radioactivos. Uno de los problemas con las sondas moleculares es que éstas deben ser amplificadas para tener un buen blanco de hibridización, además de no contener secuencias no conservadas. Tienen una limitada sensibilidad, al haber un límite de detección de 0.1 pg de RNA blanco, lo que no puede ser suficientemente bajo para detectar la expresión de genes con una simple copia de RNA. Además, esto adiciona un elemento de subjetividad, para detectar expresiones muy bajas. Otra desventaja de estas

metodologías es la utilización de radioisótopos para el marcaje de la sonda. Éstos son costosos, de una vida corta media funcional y generan graves problemas por exposición y para la deposición de los mismos. Aunque se han generado métodos de marcación no radiactiva, la mayor sensibilidad se obtiene con la marcación por isótopos, por lo que esta característica sigue siendo un problema (Heracles y col., 2000).

El uso de la RT-PCR cuantitativa permite la cuantificación de menos de 1 pg de cDNA blanco a 1ng de mRNA, y puede ser distinguido en dos veces la diferencia en concentración. Esta técnica también puede ser aplicada para cuantificar mRNA de 10 células o menos. Además, el uso de un estándar interno permite reducir la variabilidad que afecta la amplificación como son concentración de la enzima DNA polimerasa, concentración de Mg, temperatura de alineación, número de ciclos, formación de dímeros y presencia de contaminantes DNA. Otro aspecto relevante, es el uso de un rcRNA con colas poliadeniladas, ya que esto permite reducir la variabilidad en la formación de cDNA en la transcripción reversa. Al tener procedimientos manuales se puede automatizar los pasos, lo que permite una mejor reproducibilidad de los datos (Gilliland y col., 1990). Por lo tanto, este método tiene una mayor sensibilidad frente a las técnicas convencionales de cuantificación de mRNA al utilizarse cada vez más para medir la inducción y la relación dosis-respuesta de diversos genes (Vanden-Heuvel, 1994).

Hipertrigliceridemia inducida por sacarosa

Se ha propuesto que la inducción de la hipertrigliceridemia con una dieta con alto contenido de sacarosa se debe a una remoción inadecuada de triglicéridos plasmáticos. Ésta se asocia a la disminución de la

de la lipoproteína lipasa en ratones (Sheorain y col., 1980). Los resultados de este estudio concuerdan con este mecanismo propuesto y muestran que los cambios en la actividad enzimática observados se explican, en parte por una reducción en la acumulación de su mRNA. Como se presenta en la Fig. 12, la sacarosa indujo un aumento significativo ($p < 0.05$) en la acumulación de mRNA de la apoC-III con la concomitante disminución en la acumulación de la LPL en músculo.

Efectos del CLA en músculo

Debido al alto porcentaje del peso corporal que representa el tejido muscular, su participación en la remoción de triglicéridos circulantes es muy importante. El efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de LPL y apoC-III en este tejido, se presentan en las Figuras 13 y 14. La dieta CLA contrarrestó los efectos causados por la sacarosa sobre estos genes. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la acumulación de mRNA de apoC-III (97%) y un aumento del 240% en la acumulación de mRNA de LPL, comparados con los niveles de mRNA de estos genes en el músculo de los ratones alimentados con SAC. Estos resultados sugieren que la disminución de triglicéridos observada en los animales alimentados con la dieta CLA, se debe en parte al aumento en la capacidad del músculo de removerlos de la circulación. Ésta fue mediante la disminución en la expresión de la proteína inhibidora de los triglicéridos (apo C-III) y el aumento de la LPL.

La regulación en la expresión de la LPL y apo C-III, por parte del CLA, pudiera traducirse en un aumento en la capacidad del músculo para remover a los triglicéridos sanguíneos. Esta acción significaría un aumento en la β -oxidación en el músculo, ya que este tejido no tiene la capacidad

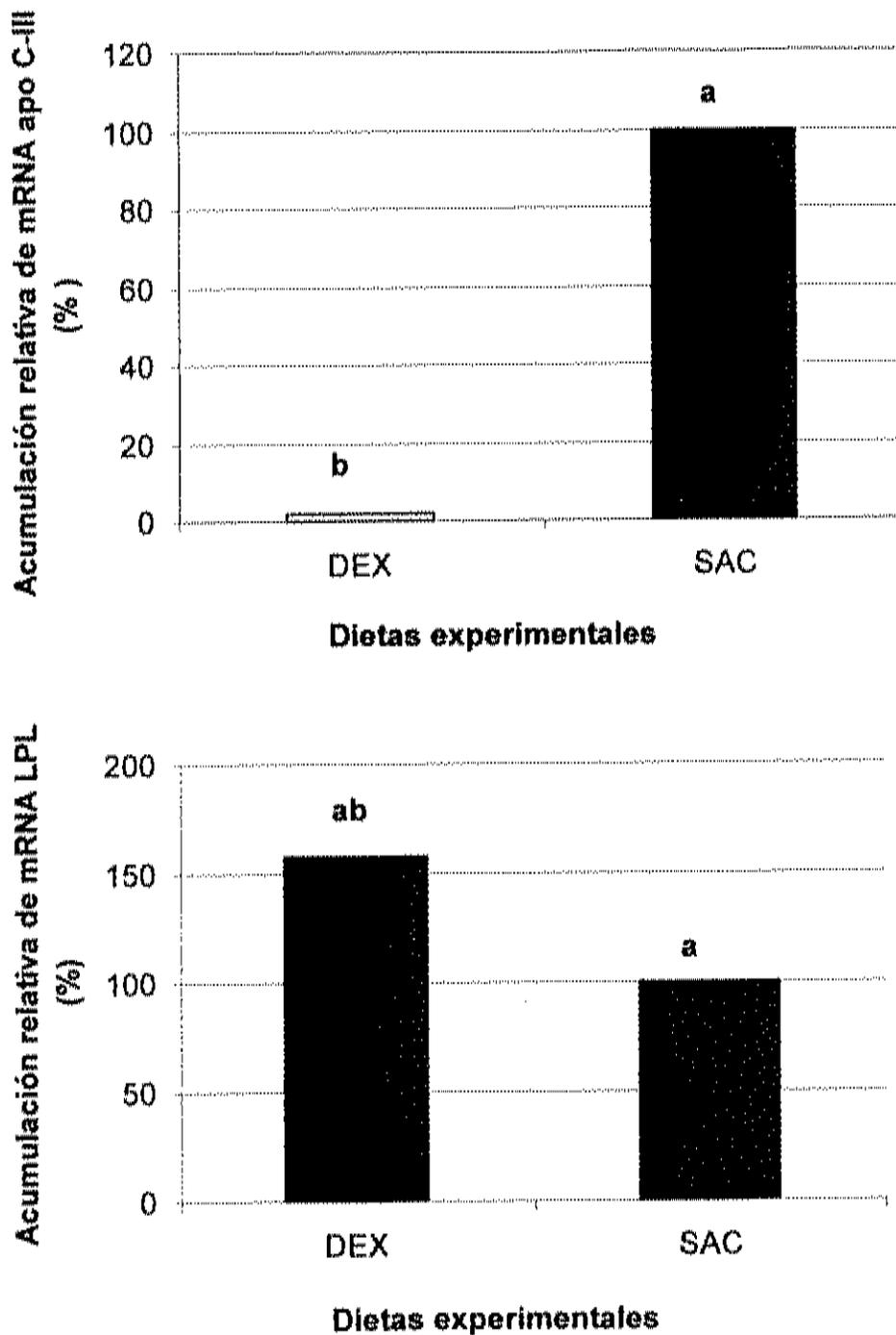


Figura 12. Inducción de hipertrigliceridemia y su efecto en la acumulación de mRNA de apo C-III y LPL. Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

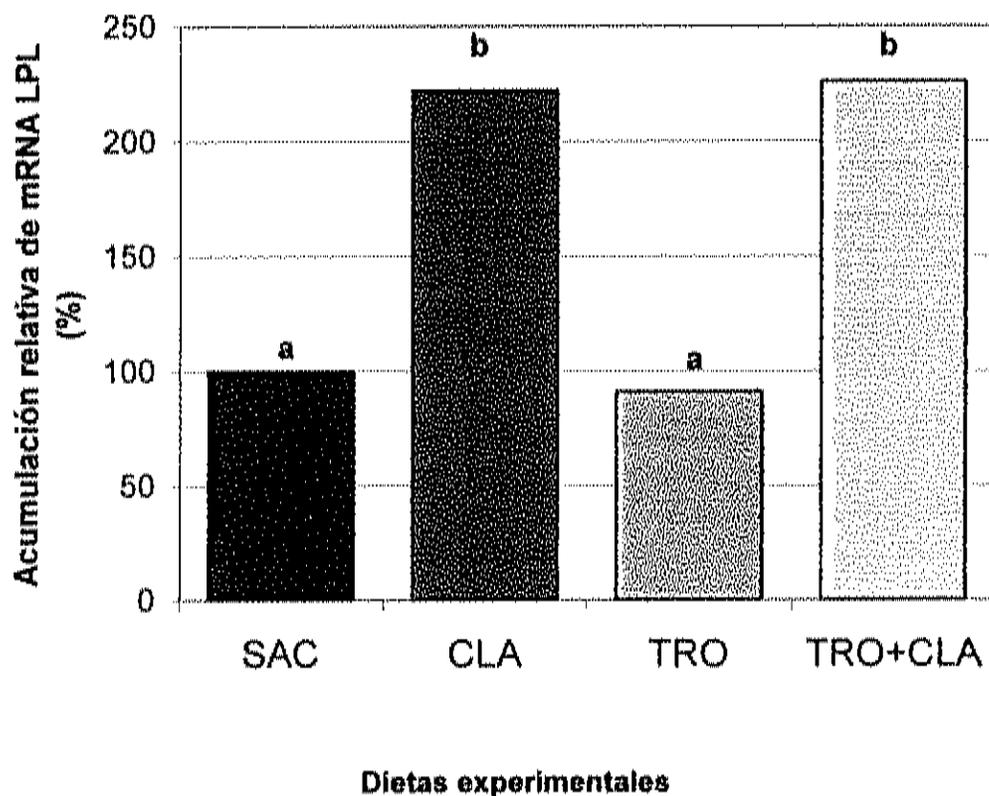


Figura 13. Efecto de las dietas de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de LPL en tejido muscular. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona y d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.005$).

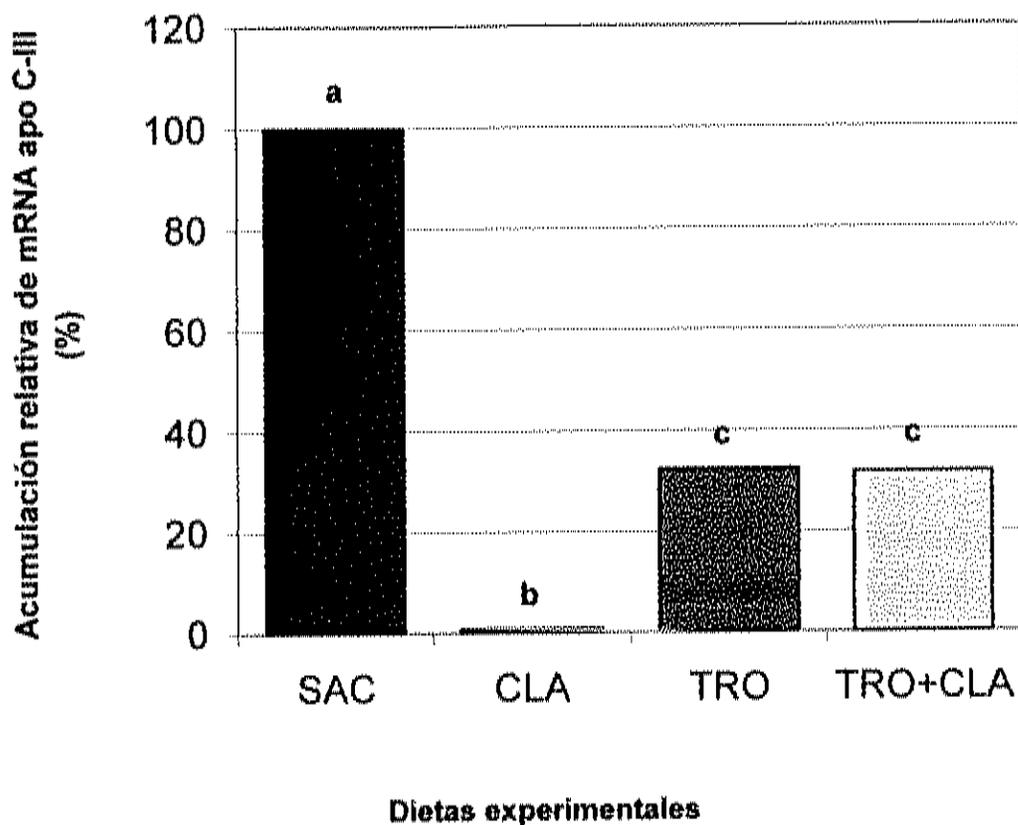


Figura 14. Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de apo C-III en tejido muscular. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona y d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

para almacenar un exceso de ácidos grasos. Apoyando esta posibilidad, algunos investigadores han encontrado que el CLA aumenta la actividad de la carnitina-palmitoiltransferasa (CPT), una enzima limitante del sistema de β -oxidación mitocondrial, en diversos tejidos como hepático, adiposo y muscular (gastrocnemius) (Rahman y col., 2001). En ratas OLEFT (modelo diabético) alimentadas con 1% de CLA en forma de triglicéridos, la actividad de la CPT resultó aumentada en músculo comparada con el grupo control. Con esto se explica la disminución en la acumulación de los TG en el tejido muscular dada en estas ratas (Rahman y col., 2001). Además Park y col., (1997), encontraron que en ratones con dietas con 0.5% de CLA, la actividad enzimática de CPT en músculo también aumentó. Estos resultados sugieren que el CLA induce la lipólisis en el músculo, para reducir con esto la hipertrigliceridemia.

Efecto del CLA en tejido adiposo

El tejido adiposo se encarga principalmente de almacenar el exceso de ácidos grasos en el organismo. La LPL es la principal enzima que se encarga de mantener un equilibrio entre los triglicéridos séricos, y los sintetizados en el citoplasma del tejido adiposo. Los ratones alimentados con CLA redujeron 97% el mRNA acumulado de la LPL en el tejido adiposo epididimal en comparación con los que tuvieron una dieta con SAC ($p < 0.05$) (Fig. 15). Estos datos concuerdan con lo aportado en diversas investigaciones, en donde señalan que la actividad de la LPL en células adiposas 3T3-L1, se encontró disminuida cuando son incubadas con el isómero 10*trans*, 12*cis*. Así también, el efecto obtenido en la reducción de la actividad de la LPL fue con concentraciones equivalentes al 0.5% de CLA (Park y col., 1997; Park y col., 1999 Smedman y col.,

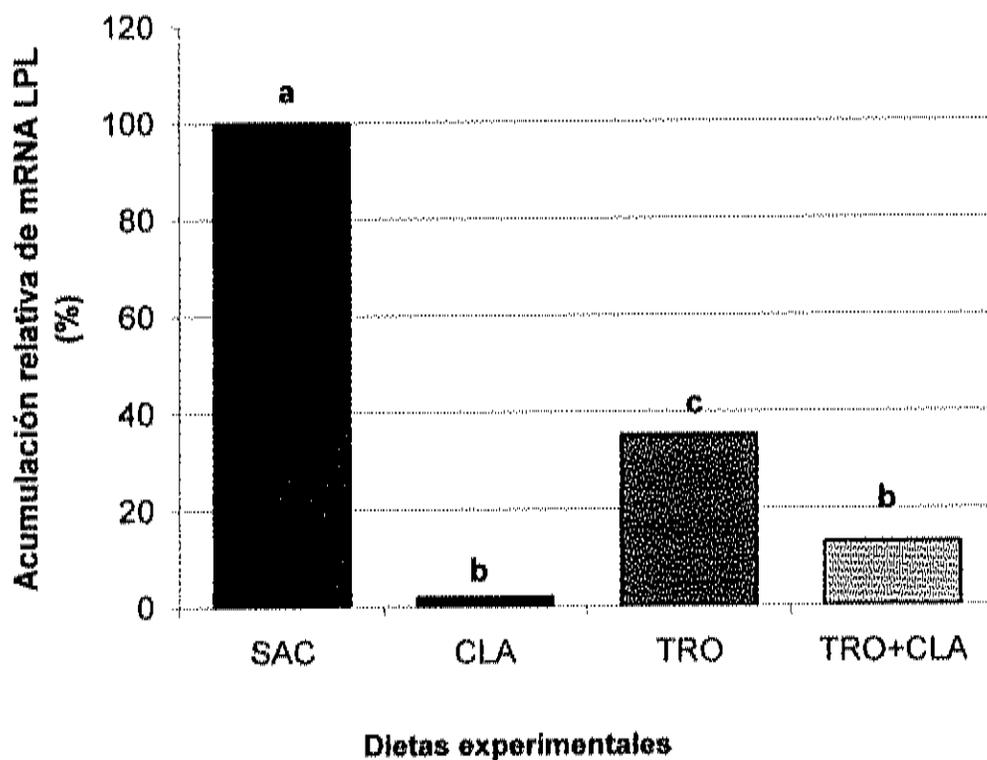


Figura 15. Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación de mRNA de LPL en tejido adiposo. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona y d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

2001). Con base en lo anterior, se sugiere que el CLA reduce la síntesis de la LPL y con ello la hidrólisis de los triglicéridos en este tejido. Con esto, los triglicéridos sanguíneos se reparten a tejidos como el muscular con mayores tasas de oxidación.

El efecto del CLA en la disminución del mRNA de la LPL explica uno de los mecanismos en la reducción de los triglicéridos sanguíneos, pero también se asocia con la repartición de los ácidos grasos a otros tejidos. Esto corresponde, con el efecto que tiene el CLA en la disminución de la masa grasa tanto en humanos como diversos animales (Benito y col., 2001, Lin y col., 2001). Además, en ratas Sprague-Dawley los adipocitos mostraron tener menor cantidad de triglicéridos con dietas al 1% y 2% de CLA después de 3 semanas (Yamasaki y col., 1999).

No se encontró un efecto sinérgico en los niveles de mRNA acumulado de apo C-III y el LPL en los ratones alimentados con CLA y TRO juntos, en músculo y tejido adiposo (Fig. 14 y 15). Estos resultados fueron similares a lo encontrado por Lefebvre y col., (1997). Ellos, al administrar simultáneamente a ratas machos durante 14 días BRL49653 (TZD) + fenofibrato (fibrato), no encontraron un efecto más pronunciado en los niveles de mRNA de la apo C-III, apo A-I, A-II y A-IV.

Efectos de la troglitazona en músculo y tejido adiposo

El mecanismo propuesto por medio del cual las TZD ejercen sus propiedades hipolipidémicas es a través del subtipo PPAR γ en tejido adiposo (Schoojans y col., 1996). En trabajos con ratones genéticamente modificados (fenotipo A-ZIP/F y aP2/DTA con severa lipodistrofia), se ha encontrado que la acción hipolipidémica de la TRO no requiere del tejido adiposo. En estos animales experimentales la troglitazona y la

rosiglitazona mejoraron las concentraciones de triglicéridos, así como también algunos de los parámetros involucrados en el metabolismo de los triglicéridos como son reducción de las VLDL y de las LDL asociadas a triglicéridos (Burant y col., 1997; Chao y col., 2000). Estos datos sugieren que las TZD tienen efectos independientes del tejido adiposo.

Los hallazgos del presente estudio concuerdan con los experimentos antes mencionados, ya que la TRO disminuyó el mRNA acumulado de la apo C-III (45%) en músculo comparado con los niveles de mRNA de este gen en los alimentados con SAC ($p < 0.05$) (Fig. 14). La reducción al nivel de transcripción de la apo C-III, implicaría la disminución en la síntesis de esta proteína y con esto un aumento en la hidrólisis de los triglicéridos al no interferir con LPL. Por lo tanto, se deduce que las TZD requieren del músculo para su efecto hipolipidémico.

Aunque como se dijo anteriormente, las TZD ejercen su acción hipolipidémica independientemente del tejido adiposo, algunos trabajos proponen que el efecto hipotrigliceridémico de las TZD es por la inducción de la LPL en este mismo tejido. Lefebvre y col. (1997), señalan que en el tejido adiposo de ratas Sprague Dawley, se dio un aumento del mRNA de la LPL con dietas que contenían rosiglitazona. Con esto se explicaba uno de los mecanismos por los que las TZD reducían los triglicéridos sanguíneos. Por el contrario, los resultados en este estudio indicaron que los alimentados con TRO disminuyeron 57% la acumulación de mRNA de LPL en comparación con los que tenían una dieta con SAC en tejido adiposo epididimal ($p < 0.05$) (Fig. 15). Aún no se tiene claro si los efectos hipolipidémicos en el tejido adiposo de las TZD son a través del receptor PPAR γ o de otros receptores nucleares. Ya que Zhang y col., 2001, encontraron un elemento funcional de respuesta en el gen de la LPL para el receptor LXR α , cuya acción podría estar implicada en su regulación. Por lo tanto, se puede decir que la inducción negativa de la LPL en el tejido

adiposo podría ser regulada por otros receptores nucleares diferentes a los PPARs.

Ranganathan y col. (1998), señalan que la troglitazona y la rosiglitazona disminuyen la actividad de la LPL en células diferenciadas y sin diferenciar. Sin embargo, en ese estudio encontraron que el efecto inhibitorio de la LPL ocurre a nivel post-traducciona l a pesar de no tener efectos en la expresión del mRNA de adipocitos 3T3L-1 y de aumentar el mRNA de preadipocitos. Por eso, habría que hacer más estudios de los efectos de la TRO a nivel traducción y de la actividad de la LPL en estos ratones, para poder determinar sus implicaciones en la reducción de los triglicéridos sanguíneos.

Efecto del CLA en hígado

Los fibratos son fármacos hipotrigliceridémicos que actúan a través del subtipo PPAR α disminuyendo la expresión de la apo C-III en hígado y músculo. Por datos aportados por Moya-Camarena y col. (1999), se sabía que el CLA es un potente activador y ligando de los PPAR α , y que al igual que los fibratos el CLA podría regular de igual manera a la apo C-III en tejido hepático. Recientemente, se encontró que el CLA administrado en la dieta (0.5% en peso), disminuyó la expresión del mRNA de la apo C-III aún en ratones que carecen del gen que codifica para PPAR α (ratón PPAR α -nulo). Estos resultados demuestran que el CLA no regula la expresión de este gen a través del subtipo PPAR α . En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la acumulación del mRNA de la apo C-III entre los animales alimentados con CLA y SAC (Fig. 16). Por otro lado, en estudios de transfección reportados, el CLA también resultó ser un activador y tener una afinidad intermedia por el subtipo

PPAR γ . Además, recientemente se encontró que el CLA 9 *cis*-11 *trans* activa al PPAR γ en presencia de la $\Delta 6$ desaturasa (la primera enzima para metabolizar al CLA) (Belury y col., 2002; Moya-Camarena y col., 1999). Por los resultados obtenidos, se sugiere que el CLA está actuando en tejidos donde hay expresión de PPAR γ , al no presentar efectos en el hígado (alta expresión de PPAR α). Lo anterior propone, que el CLA está actuando por medio del subtipo PPAR γ en la regulación de la apo C-III.

Una respuesta fisiológica común para los proliferadores de peroxisomas es el aumento de peso del hígado. Este efecto fue también observado en el presente estudio (Fig. 17) ($p < 0.05$). Algunos investigadores, han relacionado este aumento a la acumulación de lípidos en este tejido (Belury y col., 1997; Moya-Camarena y col., 1999; Yamasaki y col., 2000).

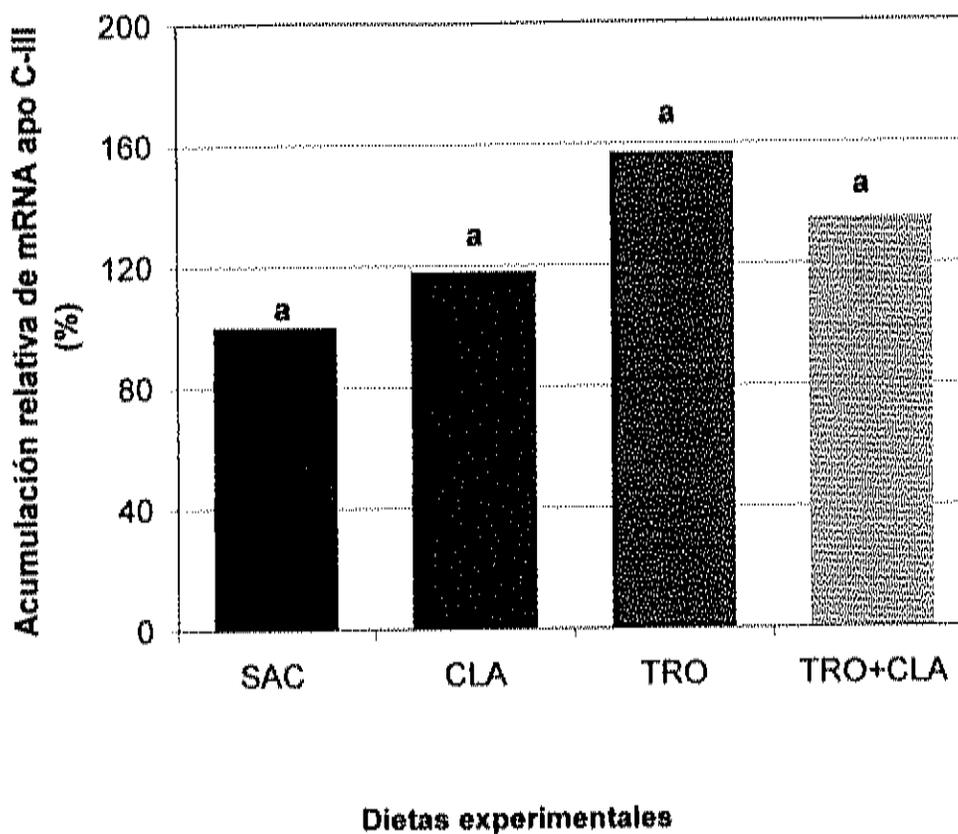


Figura 16. Efecto de las dietas experimentales sobre la acumulación del mRNA de la apo C-III en hígado. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona, d) CLA-TRO: 65% sacarosa y e) TRO+CLA 1% CLA y 0.2% troglitazona. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p > 0.05$).

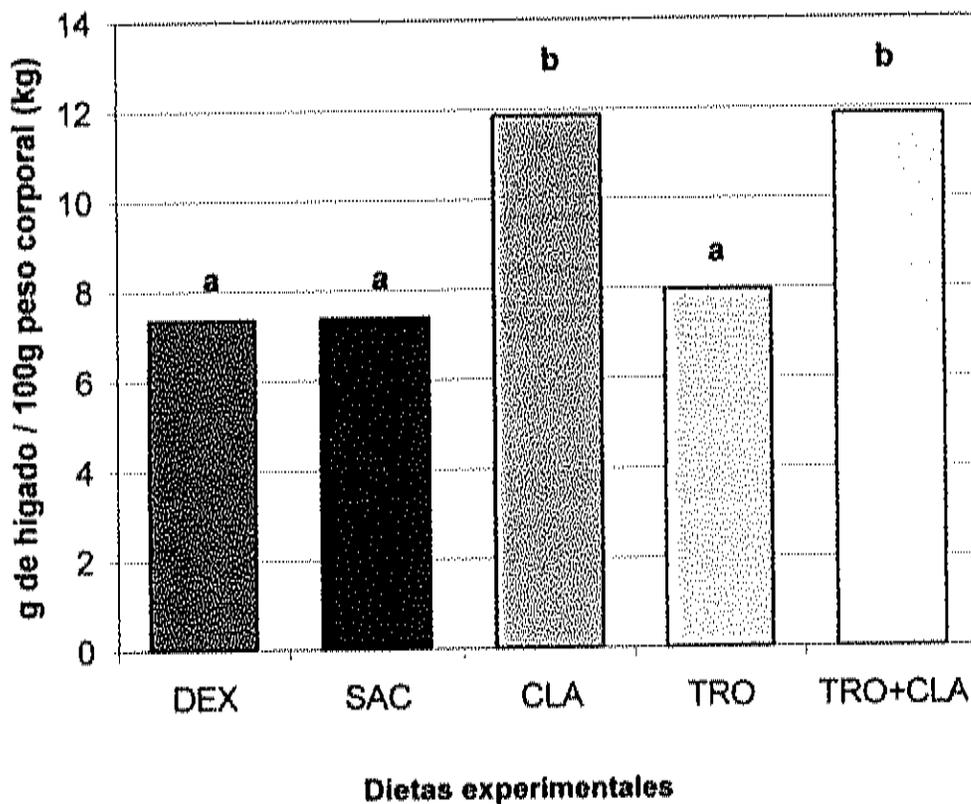


Figura 17. Efecto de las dietas experimentales sobre el peso del hígado. Los ratones fueron alimentados durante 3 semanas con las dietas experimentales: a) SAC: 65% sacarosa, b) CLA: 65% sacarosa y 1% CLA, c) TROG: 65% sacarosa y 0.2% troglitazona, d) CLA-TRO: 65% sacarosa, 1% CLA y 0.2% troglitazona y e) DEX: 65% dextrosa como control. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

En la presente investigación, el CLA indujo un aumento en los niveles de mRNA de la LPL y disminución de la apo C-III en músculo. En cambio, en tejido adiposo, los transcritos de la LPL se redujeron por acción del CLA. Estos resultados sugieren que el CLA promueve una repartición de los triglicéridos a tejidos con mayor actividad oxidativa, evitando su almacenamiento en los adipocitos. Por otro lado, los tejidos que se observó el efecto del CLA en la regulación de la apo C-III y LPL, son los que expresan el subtipo PPAR γ (tejido adiposo y muscular). Esto sugiere, que el CLA puede estar regulando estos genes por un mecanismo mediado por PPAR γ .

El CLA y la TRO presentaron un efecto similar al inducir la disminución de la apo C-III en músculo y LPL en tejido adiposo. Sin embargo, esta disminución fue mayor en los ratones alimentados con CLA (97% vs 45% para apo C-III y 97% vs 57% para LPL). Además, la TRO no tuvo efecto sobre la acumulación de la LPL en músculo, en contraste con el aumento del 240% inducido por el CLA. Estos resultados sugieren que los efectos hipotriglicéridémicos del CLA y TRO pudieran estar mediados por mecanismos diferentes.

ANEXO 1

Síntesis de estándar interno

La síntesis del estándar interno tuvo como primer paso la amplificación del gen espaciador (β -globina) a partir de DNA genómico con los iniciadores específicos antes mencionados (cuadro 3). Las reacciones para PCR se hicieron en un volumen final de 50 μ L que contenía una solución amortiguadora para PCR (22 g de sulfato de amonio, 1M Tris, pH 8.8, 25 mg EDTA, 80 mg BSA, β -mercapentanol), 25 mM $MgCl_2$, 100 mM de deoxinucleótidos trifosfatos, 10 pmol/ μ L de iniciadores sentido y antisentido para el estándar interno, 100 ng de DNA genómico y 10 unidades de DNA polimerasa Taq. La amplificación se llevó a cabo en una termocicladora (GeneAmp® PCR System 9700, PE Biosystems). Las reacciones fueron calentadas a 85°C durante 30 s, 94°C por 3 min para después pasar por 35 ciclos que incluyen 94°C por 10 s, la temperatura óptima de alineación del gen por 30 s, 72°C por 45 s para terminar con 72°C por 5 min y enfriamiento a 4°C. Los productos finales fueron diluidos 1:10 en agua deionizada estéril para realizar una segunda amplificación en las mismas condiciones antes mencionadas. Los productos de la primera amplificación fueron purificados para remover los iniciadores no incorporados, utilizando el sistema Wizard™ PCR Preps (Promega Corp., Madison WI).

De los productos obtenidos en la segunda amplificación, se procedió a la purificación de los fragmentos con el fin de adquirir el templado específico para cada gen. La técnica utilizó geles de agarosa con bajo punto de fusión al 1.5% (Promega Corp., Madison WI), la cual fue fundida 10 min a 70°C, y diluida en un volumen final de 1% con 1/10 de

solución amortiguadora. A la mezcla anterior, se le agregó 100 unidades de beta-agarasa (Biolabs, New England, USA), para después incubar por 1 hr a 40°C. Lo obtenido se puso en hielo y se le añadió 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M, incubando en el hielo por 10 min y se centrifugó por 10 min a 12 000 g. Se agregó un volumen igual de isopropanol, se lavó con etanol al 80%, para después resuspenderlo en 25 μ L de agua deionizada.

Del producto obtenido de la purificación en geles de bajo punto de fusión se hizo la transcripción *in vitro* por el método Riboprobe® Gemini II (Promega Corp., Madison WI). Se incubó por dos horas una mezcla que contenía una solución amortiguadora 20 mM (1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0.1 M NaCl, 50% (v/v) glicerol y 0.1% Triton X-100), 100 mM DTT, 2.5 unidades de rRNasin, 10 mM de rATP/rCTP/rGTP/rUTP, 500 unidades de RNA polimerasa T7 y 45 μ L del producto purificado del estándar interno. Posteriormente, se incubó por 2 h después de agregar 110 unidades de RQ1 RNasas-DNasas a 37°C con el fin de digerir DNA contaminante. Se adicionó posteriormente 100 μ L de fenol (Sigma-Aldrich Inc, S.L., Missouri) con un pH 7.9, agitándolo por 1 min., para después añadir 100 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La fase que quedó en la parte superior, se transfirió a un tubo nuevo, agregando 50 μ L de acetato de amonio 10 N (pH 4.0) y 500 μ L de etanol, para después precipitar 30 min. a -20°C. El pellet formado en la etapa anterior, se lavó con etanol al 75% centrifugando a 12, 000 x g 10 min. La concentración de rcRNA fue calculada mediante la lectura de absorbancia a 260 nm, utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU 530). El cálculo del número de moléculas de estándar interno (rcRNA) obtenido de la transcripción *in vitro*, fue con la siguiente fórmula:

moléculas/ μ L de E.I. =

$$\frac{\text{Concentración de rcRNA } (\mu\text{g/mL})}{(330 \text{ mg/ } \mu\text{mol} \times \text{peso molecular del gen de interés} \times \text{peso molecular del E.I.})} \times 6.02 \times 10^{17} \text{ moléculas/}\mu\text{L}$$

ANEXO 2

Método Gilliland

- 1.-Se determina la densidad del mRNA y del estándar interno para la curva estándar y para las muestras.
- 2.-Se calcula la relación de las densidades del (mRNA/E.I)
- 3.-Se calcula el logaritmo de la división del (mRNA/E.I)
- 4.-Para la curva estándar: se gráfica el log (mRNA/E.I) VS log (IS) y se hace una regresión lineal para determinar el intercepto y la pendiente.

$$\text{Log (mRNA/E.I)} = \text{pendiente (log E.I)} + \text{intercepto}$$

Para calcular la cantidad de mRNA acumulado de las muestras a partir de la curva estándar se procede a:

- 5.- Graficar el logaritmo el cociente de la densidad de la división del E.I / mRNA contra el log del cociente actual y con esto hacer una regresión lineal.
- 6.- Para obtener la cantidad de mRNA

$$\text{Log (mRNA/E.I)} = \text{pendiente} \times \text{log (actual mRNA/ actual E.I)} + \text{intercepto}$$

BIBLIOGRAFIA

- Aarsland A., Chinkes D., Wolfe R. 1996. Contributions of de novo synthesis of fatty acids to total VLDL-triglyceride secretion during prolonged hyperglycemia/hyperinsulinemia in normal man. *J Clin Invest.* 98(9): 2008-2017.
- Andersson Y., Majd Z., Lefebvre AM., Martin G., Sechkin AV., Kosykh V., Fruchart JC., Najib J., Staels B. 1998. Developmental and pharmacological regulation of apolipoprotein C-II gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:115-121.
- Austin M., McKnight B., Edwards K., Bradley CM., McNeely MJ., Psaty BM., Brunzell JD., Motulsky AG. 2000. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: a 20-year prospective study. *Circulation.* 101:2777-2782.
- Auwerx J., Schooijans K., Fructart J., Staels B. 1996. Transcription control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the lpl and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis.* 124 (1): s29-s37.
- Ayala MJ. 2002. Estudio de las propiedades hipolipemiantes del ácido linoleico conjugado, en ratones albino. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Son.
- Bar-Tana J. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR) activation and its consequences in humans. *Toxicology Letters.* 120:9-19.
- Belury MA. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr.* 22:505-31.
- Belury MA., Kempa-Stecko A. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids.* 37:199-204.

- Belury MA., Moya-Camarena SY., Lu M, Shi L., Leesnitzer LM., Blanchard SG. 2002. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma(PPAR γ). *Nutr Res* 22:817-824.
- Benito P., Nelson GJ., Kelley DS. 2001. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*. 36(3):229-236.
- Bocher V., Pineda-Torra I., Fruchart J.C., Staels B. 2002. PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *New Y Academ Sci*.967:7-18.
- Burant C., Sreenan S., Hirano K., Tai T-AC., Lohmiller J., Lukens J., Davidson NO., Ross S., Graves RA. 1997. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest*. 100:2900-2908.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem*, 162, 156-159.
- Chao L., Marcus-Samuels B., Mason M., Moltra J., Vinson C., Arioglu E., Gavrilova O., Reitman ML. 2000. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 106(10):1221-1228.
- De Beer F., Hendriks WL., Van Vark LC., Kamerling SWA., Van Dijk KW., Hofker MH., Smelt AHM., Havekes LM. 1999. Binding of β -VLDL to heparan sulfate proteoglycans requires lipoprotein lipase, whereas apo E only modulates binding affinity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:633-637.
- Deckere EA., Van Amelsvoort JM., McNeil GP., Jones P. 1999. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Brit J Nutr*. 82:309-317.

- Desvergne B., Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20(5):649-688.
- Dreyer C., Keller H., Mahfoudi A., Laudet V., Krey G., Wahli W. 1993. Positive regulation of the peroxisomal β -oxidación pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) *Biol Cell.* 337:67-76.
- Evans ME., Brown JM., McIntosh MK. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 13:508-516.
- Flier JS. 1989. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic disease. Lipoprotein lipase. *New Engl J Med.* 20:1060-1067.
- Gilliland G., Perrin S., Bunn F. 1990. Competitive PCR for quantitation of mRNA. In: Innis M.A. y col. (editorial). *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* San Diego, Cal. Pág. 60-66.
- Ginsberg HN., Le NA., Goldberg IJ., Gibson JC., Rubinstein A., Wand-Iverson P., Norum R., Brown W. 1986. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI: evidence that apolipoprotein CIII catabolism of triglyceride rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest.* 78:1287.
- Glass C. K., Rosenfeld M.G. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14:121-141.
- González G., Guevara M. 1998. Programas educativos especiales "presencia UPR en la reforma de salud y educación continua para el médico primario. <http://www.iladiba.com/upr/1998/>. (12/may/ 2001).
- Goldberg J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37:693-707.
- Ginsberg HN., Goldberg IJ. 1998. *Principios de medicina interna.* 14^ª ed. México, D.F: Mc Graw-Hill; p.2439-2443.

- Grundy SM. 1990. Atlas de las alteraciones de los lípidos New York: Merck Sharp&Dohme. Vol1. p. 4.2-4.6.
- Halabe J., Lifshitz A., López J. El internista "medicina para internistas". México, D.F: Mc Graw-Hill interamericana; 1997.p.238-242.
- Herakles A., García P., Mendoza-León A. 2000. Diagnóstico molecular en protozoarios kinetoplastida principios y aplicaciones. Rev Fac Cs Vets. 41(4):109-130.
- Hertz R., Bishara-Shieban J., Bar-Tana J. 1995. Mode action of peroxisome proliferator as hypolipidemic drug. J Biol Chem. 270:13470-13475.
- Houseknecht KL., Vanden-Heuvel JP., Moya-Camarena SY., Portocarrero CP., Peck LW., Nickel KP., Belury MA. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty rat. Biochem Biophys Res Commun. 244:678-682.
- Ito Y., Azrolan N., O'Connell A., Walsh A., Breslow JL. 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human apo C-III gene expression in transgenic mice. Science.249:790-793
- Jong MC., Marten H., Hofker LM., Havekes LM. 1999. Role of apoCs in lipoprotein metabolism functional differences between apoC1, apo C2 and apoC3. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19:472-484.
- Kelly GS. 2001. Conjugated linoleic acid: a review. Altern Med Rev. 6(4):367-382.
- Kersten S., Desvergne B., Wahli W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. Nature. 405: 421-424.
- Khosla P., Fungwe TV. 2001. Conjugated Linoleic acid: effects on plasma lipids and cardiovascular function. Curr Opin Lipidol. 12:31-34.
- Kritchevsky D. 2000. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. Br J Nutr.83:459-465.

- Ladias JA., Hadzopolou-Cladaras M., Kardassis D., Cardot P., Cheng J., Zannis V., Cladaras C. 1992. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apo B, apo C-III, and apo AII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3. *J Biol Chem.* 267(22):15849-15860.
- Lee KN., Kritchevsky D., Pariza MW. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atheroscler.* 108:19-24.
- Lehman JM., Moore LB., Smith-Oliver TA., Wilkinson WO., Wilson TM., Kliewer SA. 1995. An Antidiabetic is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem.* 270(2):12953-12956.
- Lefevre AM., Peinado-Onsurbe J., Iris L., Briggs MR., Paterniti JR., Fruchart JC., Fievet C., Auwerx J., Staels B. 1997. Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1756-1764.
- Lemberger T., Desvergne B., Wahli W. 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:335-363.
- Lewin B. 1997. *Genes VI.* Edit Oxford New York. Págs 36-37.
- Lin Y., Schuurbiens E., Van der Veen S., De Deckere E. 2001. Conjugated linoleic acid isomers have differential effects on triglyceride secretion in Hep G2 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1533:38-46.
- Lin Y., Kreeft A., Shuurbiens JA., Draaijier R. 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem.* 12(3):183-189.
- Maeda N., Li H., Lee D., Oliver P., Quarfordt SH., Osada J. 1994. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in

- hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypotriglyceridemia *J Biol Chem.* 269(38):23610-23616.
- Mancini FP., Lanni A., Sabatino L., Moreno M., Giannino A., Contaldo F., Colantuoni V., Goglia F. 2001. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *Federation Eu Bioch Soc.* 491:154-158.
- McKenna NJ., Lanz RB., O'Malley BO. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 20(3):321-344.
- Moya-Camarena SY., Vanden-Heuvel JP., Blanchard SG., Leesnitzer LA., Belury MA. 1999. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J Lipid Res.* 40:1426-1433.
- Munday JS., Thompson KG., James K. 1999. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr.* 81:251-255.
- National Cholesterol Education Program. 2001. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on. NIH. Pub 01-3670.
- Olefsky JM. 2000. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist. *J Clin Inv* 106(4): 467-472.
- Olivercrona T., Chernick SS., Bengtsson-Olivercrona G., Garrison M., Scow RO. 1987. Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes demonstration of inactive forms of lipase in cells. *J Biol Chem.* 262:10748-10759.
- Ong JM., Kircheggessner TG., Schota MC., Kern PA. 1988. Insulin increases the sintetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 263:12933-12938.

- Park Y., Albright KJ., Liu W., Storkson JM., Cook ME., Pariza MW. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*. 32:853-858.
- Park Y., Storkson JM., Albright KJ., Liu W., Pariza MW. 1999. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*. 34(3):235-241.
- Pariza MW., Park Y., Cook ME. 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 223: 8-13.
- Pariza MW., Park Y., Cook ME. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*. 40:283-298
- Peters JM., Hennyuyers N., Staels B., Fruchart JC., Fievet C., Gonzalez FJ., Auwerx J. 1997. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Biol Chem*. 272(43):27307-27312.
- Peters JM., Park Y., Gonzalez FJ., Pariza MW. 2001. Influence of conjugated linoleic acid on body and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice. *Biochim Biophys Acta*. 1533:233-242.
- Rahman SM., Wang YM., Yotsumoto H., Cha J-Y., Han S-Y., Inoue S., Yanagita T. 2001. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and β -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition*. 17:385-390.
- Ranganathan S., Kern PA. 1998. Thiazolidinediones inhibit lipoprotein lipase activity in adipocytes. *J Bio Chem*. 273(40):26117-26122.
- Raspe E., Duez H., Gervois P., Fiévet C., Fruchart JC., Besnard S., Mariani J., Tedgui A., Staels B. 2001. Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by orphan nuclear receptor ROR α . *J Biol Chem*. 276(49):2865-2871.

- Ronald C., Chen L., Cohen SE. 2000. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 106 (11):1305-1307.
- Schachter NS. 2001. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipid.* 12:297-304.
- Scheorain V.S., Mattock MB., Subrahmanyam D. 1980. Mechanism of carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: plasma lipid metabolism in mice. *Metabolism.* 29(10): 924-929.
- Smedman A., Vessby B. 2001. Conjugated linoleic acid supplementation in humans-metabolic effects. *Lipids.* 36:773-781.
- Schoonjans R., Staels B., Auwerx J. 1996. Role of the peroxisome proliferator- activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 37:907-925.
- Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefevre AM., heyman RA., Briggs M., Deeb S., Staels B., Auwerx J. 1996. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15:5336-5348.
- Shachter NS. 2001. Apolipoproteins CI and CIII as important modulators of lipoprotein metabolism. *Current Opi Lipi.* 12:297-304.
- Stangl G.I. 2000. Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. *J Nutr* 130:1140-1146.
- Szymczyk B., Pisulewski P., Szczurekw W., Hanczakowski P. 2000. The effect of feeding conjugated linoleic acid (CLA) on rat growth performance, serum lipoproteins and subsequent lipid composition of selected rat tissue. *J Sci Food Agric.* 80:1553-1558.
- Vanden-Heuvel J., Tyson FL., Bell DA. 1993. Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *BioTechniques.* 14(3):395-398.

- Vanden-Heuvel J., Clark GC., Kohn MC., Tritscher AM., Lucier GW., Bell DA. 1994. Dioxin-responsive gene: examination of dose response relationships using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 54:62-68.
- Yamamoto KL., Zamora J., Huerta S. 1996. High blood pressure and cardiovascular risk factors in an adult population of México city. characteristics of the studied population. *Arch Med Res.* 27: 213-222.
- Yamasaki M., Mansho K., Mishima H., Kimura G., Sasaki M., Kasai M., Tachibana H., Yamada K. 2000. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *J Agric Food Chem.* 48:6367-6371.
- Yamasaki M., Mansho K., Mishima H., Kasai M., Sugano M., Tachibana H., Yamada K. 1999.
- Whigham L.D., Cook M.E., Atkinson R.L. 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacological Res.* 42(6):503-510.
- Wood A. 1999. Drug treatment of lipid disorders. *New Eng J Med.* 341: 498-511.
- Zhang Y., Repa JY., Gauthier K., Mandelsdorf DJ. 2001. Regulation of lipoprotein by lipase by oxysterol receptors, LXRA and LXRb. *J Biol Chem.* 46(16):43018-43024.