



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO/TES ECATEPEC
DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

T E S I S

EFFECTO DE BETA-HIDROXIBUTIRATO EN CÉLULAS ENDOTELIALES TRATADAS
CON ACIDO PALMITICO: IMPLICACIONES METABOLICAS Y VASCULARES

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN IGENIERIA
BIOQUIMICA

PRESENTA
REYES CASTAÑEDA LIDIA ARELY

COMITÉ TUTORIAL
DRA. MARIA ISABEL NERIA GONZALEZ
DR. JAIME HECTOR GOMEZ ZAMUDIO

Ecatepec de Morelos, México, 17 de julio de 2025

 GOBIERNO DEL ESTADO DE MÉXICO	AVISO DE TERMINACIÓN DE PROYECTO DE TESIS TIT04-ANEXO PM	
--	--	---

DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Folio: **MCIBQ/2023/RECL890803**

Fecha: **20 de Junio del 2025**

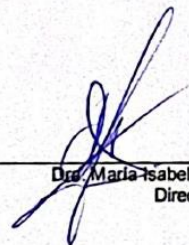
Después de las revisiones, observaciones y seguimiento de recomendaciones hechas al proyecto de tesis: **"Efecto de Beta-hidroxibutirato en células endoteliales tratadas con ácido palmítico: implicaciones metabólicas y vasculares"**, que como requisito para obtener el grado de maestría presenta:

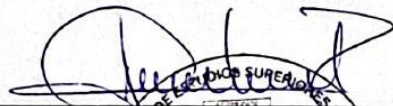
Reyes	Castañeda	Lidia Arely
Apellido paterno	Apellido materno	Nombres (s)

Matrícula: **202311261**

El Director de Proyecto **Dra. María Isabel Neria González y Codirector Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio**, da por concluido su desarrollo para proceder a la impresión del trabajo correspondiente y la defensa pública del mismo.

Vo. Bo. COMITÉ TUTORIAL

 Dra. María Isabel Neria González Director	 Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio Codirector
--	--



Dr. Rafael Alejandro Ángel Cuapio
Asesor

Elaboró:  Dra. María Isabel Neria González Director de Proyecto	Revisó:  Dr. Rafael Alejandro Ángel Cuapio Coordinador de Posgrado	Vo. Bo:  Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas Jefe de División
---	--	--

DIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Fecha: 20 de Junio del 2025.

Datos generales
Nombre del alumno:

Reyes	Castañeda	Lidia Arely
Apellido paterno	Apellido materno	Nombres (s)

Matrícula: 202311261

PROYECTO: **Efecto de Beta-hidroxibutirato en células endoteliales tratadas con ácido palmítico: implicaciones metabólicas y vasculares**

DIRECTOR: **Dra. María Isabel Neria González y Codirector Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio**

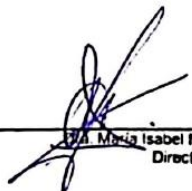
Dictamen:

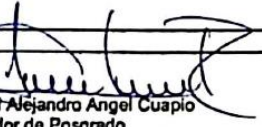
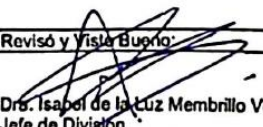
Con base en el registro No. MCIBQ/2023/RECL890803 correspondiente al periodo escolar 2023-1, asignado al proyecto de tesis Efecto de Beta-hidroxibutirato en células endoteliales tratadas con ácido palmítico: implicaciones metabólicas y vasculares y presentado por la alumna referida; y después de haber sido desarrolladas las actividades requeridas, el Comité Tutorial, conformado por los integrantes que firman al calce, ha determinado que SI (X) NO () han sido cubiertos en su totalidad los requisitos que permitan a esta División Académica liberar al alumno de los trámites académicos para tal efecto e iniciar el trámite de obtención de grado de maestría en la Unidad de Registro y Certificación de este Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Observaciones:

El trabajo de tesis se desarrollo en instalaciones del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec bajo la dirección de la Dra. María Isabel Neria González y en el Centro Médico Nacional Siglo XXI bajo la Codirección del Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio

Comité Tutorial

 <u>Dra. María Isabel Neria González</u> Director	 <u>Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio</u> Codirector	 <u>Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio</u> Asesor
--	--	---

Elaboró:  Dr. Rafael Alejandro Angel Cuapio Coordinador de Posgrado	Revisó y Visó Bueno:  Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas Jefe de División	Enterado:  Mtro. Juan Carlos Bretón Pozos Director Académico
---	--	--

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las instituciones que hicieron posible la realización de este proyecto, brindándome apoyo académico, financiero y profesional durante esta etapa tan importante de mi formación.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT)**, expreso mi más profundo agradecimiento por el invaluable respaldo económico otorgado a través de la beca que me permitió dedicarme de tiempo completo a mis estudios de posgrado. Su compromiso con el fortalecimiento de la educación superior, la investigación científica y el desarrollo tecnológico en México ha sido una base esencial para que estudiantes como yo podamos no solo continuar con nuestra formación académica, sino también contribuir al avance del conocimiento en nuestras respectivas disciplinas. Gracias por confiar en el potencial de las y los jóvenes investigadores de este país.

Al **Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE)**, mi alma mater, por haberme brindado la oportunidad de crecer profesional y personalmente. Agradezco profundamente la sólida formación académica recibida, así como el ambiente de aprendizaje que fomentó el pensamiento crítico, la disciplina y el compromiso con la excelencia. En especial, reconozco y valoro la orientación, paciencia y acompañamiento de mi asesora, quien con su guía constante y apoyo incondicional fue un pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo y en mi crecimiento como profesionista.

Al **Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI**, por brindarme el espacio, los recursos y el respaldo profesional para llevar a cabo toda la experimentación de este proyecto en sus instalaciones. Agradezco sinceramente al equipo de investigación, al personal técnico y, de manera muy especial, a mi asesor en el hospital, por su compromiso, disposición y profesionalismo. El entorno científico de esta institución fue determinante para la ejecución rigurosa de cada etapa experimental, y su colaboración fue clave para alcanzar los objetivos de esta investigación.

Agradezco profundamente a la Dra. María Isabel Neria González, mi asesora académica en el Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, por su guía constante, sus valiosas observaciones y por brindarme siempre apoyo y orientación a lo largo de este proceso. Su compromiso y experiencia fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto. Además, agradezco especialmente su respaldo para participar en congresos y la elaboración de publicaciones académicas, lo cual enriqueció significativamente mi formación científica y profesional.

Agradezco de la misma forma al Dr. Jaime Hector Gomez Zamudio, mi asesor externo en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por abrirme las puertas de su laboratorio, ofrecerme su acompañamiento durante la fase experimental, y compartir conmigo su amplio conocimiento científico. Su disposición, apoyo constante y generosidad fueron fundamentales no solo para llevar a cabo la parte práctica de este estudio, sino también para construir las bases conceptuales de esta tesis. El Dr. Gómez Zamudio me proporcionó los temas de investigación, así como artículos y bibliografía clave que orientaron el desarrollo y la profundidad del trabajo académico.

De manera especial, agradezco a la Dra. Marta Lucía Lázaro Suárez, quien me enseñó y acompañó en el trabajo con cultivos celulares. Su dedicación, paciencia y enseñanzas fueron clave para adquirir las habilidades técnicas necesarias para el desarrollo de esta investigación.

A cada una de estas instituciones y personas, gracias por ser parte esencial de este proceso formativo. Sin su apoyo decidido, esta etapa de mi vida académica y profesional no habría sido posible

Dedicatorias

A mi esposo Jacob Guzmán, por ser mi pilar incondicional durante este camino y mi compañero de vida. Gracias por tu amor, paciencia, apoyo constante y por creer en mí incluso en los momentos más difíciles. Gracias por caminar a mi lado con firmeza, por sostenerme cuando flaqueaba y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Este logro también es tuyo, porque sin ti, este recorrido no habría sido igual, Te amo.

A mis padres Rafael Reyes y Araceli Castañeda, por su cariño y por enseñarme el valor del esfuerzo, la constancia y el compromiso. Su ejemplo ha sido guía en cada paso de mi formación.

Y a todas las personas que, de una u otra manera, formaron parte de este proceso: gracias por dejar huella en mi vida y en este trabajo.

Contenido

Agradecimientos	iv
Dedicatorias	vi
Contenido	vii
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Antecedentes.....	4
Justificación.....	5
Objetivos.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Hipótesis.....	8
Hipótesis nula.....	8
Hipótesis alternativa.....	8
Marco teórico	9
El Ácido Palmítico en el Descontrol Metabólico	14
Disfunción endotelial	15
Aterosclerosis, un Daño Irreversible	17
La Cetogénesis	19
Niveles Normales de BHB en Sangre	25
Tratamientos con BHB: Un Posible Aliado	28
Potencial Terapéutico del BHB: Enfermedades Metabólicas, Neurodegenerativas y Cardiovasculares	29

Investigación y Desafíos en el Uso Clínico del BHB	30
Metodología	31
Disección de la arteria aorta.	31
Cultivo primario de células endoteliales de la aorta de rata	31
Cambio de medio de cultivo.....	32
Conteo celular en cámara de Neubauer	33
Resiembra de células endoteliales de aorta de rata	34
Inmuncitoquímica	35
Tratamiento de las células con AP y BHB	37
Ensayos de viabilidad celular.....	38
Concentración de ácidos grasos	39
Extracción de RNA	40
Síntesis de cDNA.....	41
PCR tiempo real (qPCR).....	41
Concentración de Nitrato/Nitrito.....	42
Resultados y discusión	44
Imunofluorescencia	44
Viabilidad Celular	45
Concentración de Ácidos Grasos.....	48
Expresión de las óxido nítrico sintasas inducible (NOS2) y endotelial (NOS3) ...	50
Expresión de NOX4 – Estrés Oxidativo.....	51
Expresión de citocinas Inflamatorias – IL-1 β , IL-18, IL-6 y TNF- α	52
Moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1).....	55
Determinación de NO	56
DISCUSIÓN	58
Conclusiones	65
Bibliografía.....	67
Referencias de Imagenes	73
Anexos	75
Anexo A. Composición de medios utilizados.	75
Anexo B. Tratamiento con AP y β -hidroxibutirato	76
Anexo C. Preparación de Curva de Viabilidad	78
Anexo D. Concentración de ácidos grasos.....	78
Anexo E. Síntesis de cDNA.....	79
Anexo F. qPCR.....	80
Anexo G. Curvas Estándar de Nitrato/Nitrito	81
Productividad	83

Índice de Tablas

Tabla A1. Medio DMEM alto en glucosa.....	51
Tabla A2. Medio DMEM bajo en glucosa.....	51
Tabla B1. Tratamiento con AP y β -hidroxibutirato.....	52
Tabla C1. Rango de Concentración de la curva estándar de AP	54
Tabla D1. Estándares para construcción de la curva de ácidos grasos	55
Tabla D2. Estándares para construcción de la curva de AP para ácidos grasos	56
Tabla E1. Composición de los reactivos para la síntesis de cDNA	56
Tabla F1. Reactivos para qPCR.....	57
Tabla F2. Primers PCR	57
Tabla G1. Estándares para la construcción la curva de Nitrato.....	58
Tabla G2. Estándares para la construcción de la curva de Nitrito	59

Índice de Figuras

Figura 2. Esquema del tejido adiposo durante la obesidad	10
Figura 3. Mecanismos de activación producidos por el ácido palmitico	11
Figura 4. Impacto de la inflamación y el estrés oxidativo en la disfunción endotelial	14
Figura 5. Proceso de formación de placa aterosclerótica	15
Figura 6. Principales mecanismos en respuesta a un elevado consumo de grasa energética.....	17
Figura 7. Principales cuerpos cetónicos producidos en el hígado	20
Figura 8. Conversión de ácidos grasos en acetil CoA.....	21
Figura 9. Esquema de la cetogénesis	22
Figura 10. Metabolismo de los cuerpos cetónicos.....	23
Figura 1. Utilización de los cuerpos cetónicos en los tejidos periféricos	24

Resumen

La disfunción endotelial inducida por lipotoxicidad es un factor clave en la progresión de enfermedades cardiovasculares asociadas con obesidad y síndrome metabólico. En este estudio se evaluó el efecto del β -hidroxibutirato (BHB) sobre células endoteliales expuestas a ácido palmítico (AP, 200 μ M), un modelo in vitro de daño endotelial.

El tratamiento con AP indujo una disminución significativa en la viabilidad celular, acumulación intracelular de lípidos, incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6), aumento de NOX4 y NOS2, y reducción de NOS3 y óxido nítrico (NO), manifestando un fenotipo disfuncional.

La coadministración de BHB (1, 2.5 y 5 mM) atenuó estos efectos de manera concentración-dependiente. BHB promovió la recuperación parcial de la viabilidad celular, disminuyó la acumulación lipídica, restauró la expresión de NOS3 y la producción de NO, y redujo la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Aunque se observó un aumento en NOX4 con BHB a concentraciones altas, podría representar una respuesta adaptativa. La expresión constante de PECAM-1 confirmó la identidad endotelial.

Estos hallazgos indican que el BHB modula los efectos adversos del AP sobre el endotelio, regulando procesos clave como inflamación, metabolismo lipídico, estrés oxidativo y función endotelial, y sugiere su potencial como agente terapéutico en contextos de daño vascular inducido por exceso de lípidos.

Palabras clave

Disfunción endotelial; ácido palmítico; β -hidroxibutirato; inflamación; estrés oxidativo; óxido nítrico; células endoteliales; síndrome metabólico.

Abstract

Endothelial dysfunction induced by lipotoxicity plays a critical role in the progression of cardiovascular diseases associated with obesity and metabolic syndrome. This study aimed to investigate the effect of β -hydroxybutyrate (BHB) on endothelial cells exposed to palmitic acid (PA, 200 μ M), an in vitro model of lipotoxic endothelial injury.

PA treatment led to a significant reduction in cell viability, increased intracellular lipid accumulation, elevated expression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6), and upregulation of NOX4 and NOS2, accompanied by decreased NOS3 expression and nitric oxide (NO) production, indicating a dysfunctional endothelial phenotype.

Co-treatment with BHB (1, 2.5, and 5 mM) attenuated these effects in a concentration-dependent manner. BHB partially restored cell viability, reduced lipid accumulation, reestablished NOS3 expression and NO production, and downregulated ICAM-1 and VCAM-1 expression. Although NOX4 levels increased at higher BHB concentrations, this may reflect an adaptive response rather than additional oxidative stress. Sustained expression of PECAM-1 confirmed endothelial identity under all conditions.

These findings suggest that BHB modulates the deleterious effects of PA on endothelial cells by regulating key processes such as inflammation, lipid metabolism, oxidative stress, and endothelial function. BHB emerges as a potential therapeutic agent for vascular alterations linked to lipid overload, as seen in obesity and metabolic syndrome.

Keywords

Endothelial dysfunction; palmitic acid; β -hydroxybutyrate; inflammation; oxidative stress; nitric oxide; endothelial cells; metabolic syndrome.

Introducción

Las dislipidemias son trastornos metabólicos caracterizados por niveles anormales de lípidos en la sangre, tales como colesterol, triglicéridos y lipoproteínas (1). Estos trastornos son factores de riesgo importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como la disfunción endotelial y la aterosclerosis, estrechamente relacionados con el estilo de vida moderno, incluyendo dietas ricas en grasas saturadas, falta de actividad física y otras condiciones como la obesidad y la diabetes tipo 2. Dado su impacto en la salud pública global, el tratamiento de las dislipidemias se ha convertido en una prioridad dentro de la medicina preventiva y cardiovascular (2).

A lo largo de los años, diversos enfoques terapéuticos, como cambios en el estilo de vida y el uso de fármacos, han sido implementados para manejar y reducir los riesgos asociados con estos trastornos. A continuación, se presentan los antecedentes relacionados con un enfoque particular en el impacto del ácido palmítico sobre la función endotelial y el potencial terapéutico del beta-hidroxibutirato (BHB) como tratamiento para contrarrestar estos efectos.

Problemática

La disfunción endotelial es un evento temprano y determinante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, especialmente en contextos metabólicos como la obesidad y la resistencia a la insulina, donde se promueve un entorno caracterizado por estrés oxidativo, inflamación crónica y acumulación de lípidos. Entre los factores que contribuyen a este estado patológico se encuentra el ácido palmítico (AP), un ácido graso saturado cuya exposición se ha asociado con daño estructural y funcional en células endoteliales, afectando su viabilidad y capacidad de mantener la homeostasis vascular.

Ante esta problemática, se ha propuesto el β -hidroxibutirato (BHB), un cuerpo cetónico endógeno, como posible agente modulador con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. No obstante, la evidencia científica actual es contradictoria: mientras algunos estudios sugieren que el BHB mejora la función endotelial y reduce el daño inducido por lípidos, otros reportan efectos neutros o incluso perjudiciales, lo que genera incertidumbre sobre su verdadero papel en el contexto de enfermedades cardiovasculares.

Esta falta de investigación limita el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en BHB y evidencia la necesidad de realizar investigaciones que aclaren sus efectos en modelos celulares de disfunción endotelial inducida por lípidos.

Justificación.

Este estudio utilizó ácido palmítico (AP) para inducir daño en las células endoteliales, con el fin de evaluar el potencial terapéutico del β -hidroxibutirato (BHB) frente al estrés oxidativo y la inflamación inducidos por el AP. El BHB es un cuerpo cetónico producido de manera natural durante la cetosis y se ha propuesto que posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que podrían contrarrestar el daño por el AP (8). Sin embargo, existe controversia respecto a su papel en enfermedades cardiovasculares, ya que algunos estudios sugieren efectos beneficiosos sobre la función endotelial, mientras que otros han reportado hallazgos contradictorios. Por ello, resulta relevante investigar su efecto en este contexto experimental.

Este enfoque terapéutico, basado en el uso de BHB para mitigar los efectos de la disfunción endotelial, está respaldado por investigaciones que exploran sus propiedades beneficiosas en el contexto de enfermedades cardiovasculares, especialmente aquellas relacionadas con la obesidad y la resistencia a la insulina. La presente investigación se fundamenta en la necesidad de investigar a fondo los mecanismos mediante los cuales el BHB podría mejorar la salud vascular y prevenir la progresión de enfermedades metabólicas y cardiovasculares asociadas a la obesidad.

Antecedentes.

Los antecedentes de este estudio se centran en la revisión de investigaciones previas sobre la disfunción endotelial, siendo uno de los primeros eventos en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Esta condición está fuertemente asociada con factores metabólicos como la obesidad y la resistencia a la insulina, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, hipertensión y enfermedades coronarias (1)(2).

Estudios previos han documentado que el consumo excesivo de grasas saturadas, como el ácido palmítico (AP), desencadena una serie de reacciones que dañan el endotelio, lo que resulta en un deterioro de su función y contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (3). Esta disfunción endotelial está estrechamente vinculada con el aumento del estrés oxidativo y la inflamación, dos factores fundamentales en la progresión de enfermedades como la aterosclerosis (4).

En estudios realizados en células endoteliales, se ha demostrado que el ácido palmítico induce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que afecta negativamente la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), molécula clave para la regulación del tono vascular (5). Este aumento en los ROS activa mecanismos que alteran la función mitocondrial de las células endoteliales, promoviendo la disfunción de la barrera endotelial, lo que favorece el daño vascular (6).

Otros estudios sugieren que la exposición prolongada a grasas saturadas, como el ácido palmítico, puede llevar a una disminución de la capacidad de las células endoteliales para mantener la homeostasis vascular, lo que contribuye al deterioro de la salud cardiovascular (7). Estos hallazgos resaltan la necesidad de investigar alternativas terapéuticas que puedan mitigar los efectos del daño endotelial, como el uso de compuestos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

Objetivos.

Objetivo general.

Investigar el impacto del tratamiento con beta-hidroxibutirato en células con disfunción endotelial provocada por ácido palmítico.

Objetivos específicos.

- Evaluar la viabilidad celular y realizar análisis de microscopía para observar cambios morfológicos asociados con los tratamientos.
- Determinar cambios en la expresión génica entre los grupos tratados con ácido palmítico, beta-hidroxibutirato y controles.
- Realizar un análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre los grupos tratados y control.
- Investigar la posible correlación entre la expresión de los genes evaluados y las concentraciones de cuerpos cetónicos en el medio de cultivo.

Hipótesis.

Hipótesis nula.

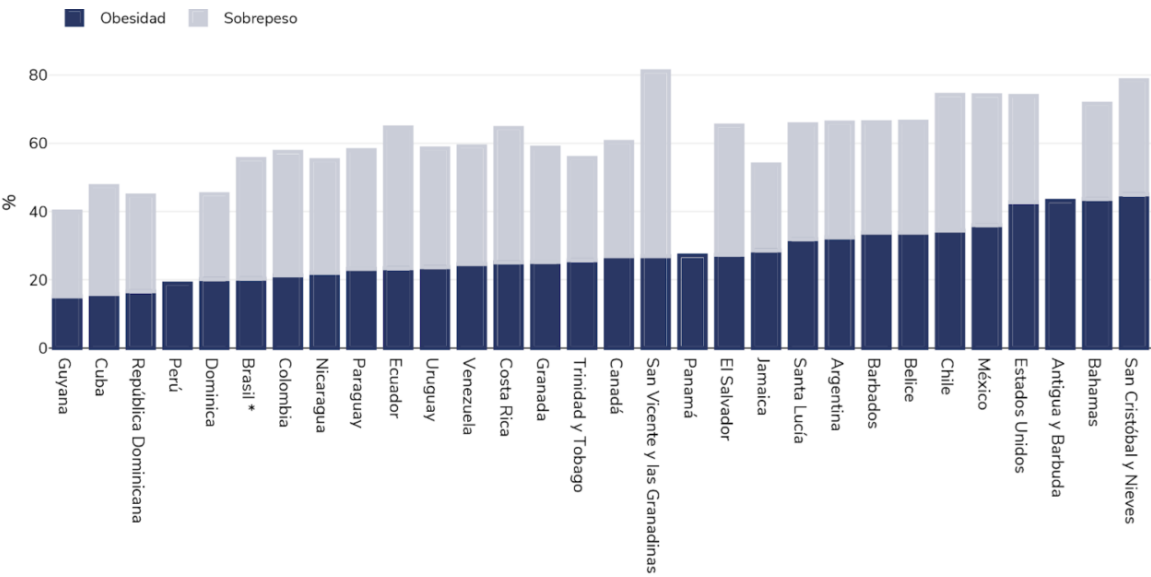
- (**H₀**): El β -hidroxibutirato (BHB) no tiene efecto significativo sobre la mejora de la función endotelial ni en la reducción del estrés oxidativo y la inflamación en células endoteliales tratadas con ácido palmítico.

Hipótesis alternativa.

- (**H₁**): El β -hidroxibutirato (BHB) mejora significativamente la función endotelial, reduce el estrés oxidativo y la inflamación en células endoteliales tratadas con ácido palmítico.

Marco teórico

El sobrepeso y la obesidad son un problema de salud pública global, con una creciente prevalencia en Latinoamérica (9), y México ocupa el segundo lugar mundial en términos de obesidad en adultos, donde más del 70 % de la población adulta tiene exceso de peso (10). La Organización Mundial de la Salud considera la obesidad como la epidemia del siglo XXI, y su aumento simultáneo con el síndrome metabólico es un fenómeno global, incluyendo a México (Figura 1), lo que resalta la gravedad de esta condición y justifica la implementación de programas de salud efectivos para abordarla (11). Este panorama subraya la importancia de comprender los mecanismos biológicos subyacentes que perpetúan este problema, en particular el papel del tejido adiposo, que no es solo un almacén de energía, sino un órgano endocrino activo.



(Figura 1). Datos Relevantes del Día Mundial de la Obesidad. Gráfico que ilustra el panorama de la obesidad en Latinoamérica durante el Día Mundial de la Obesidad (Nación Paise, 2023).

Existen diferentes tipos de tejido adiposo en el organismo, cada uno con funciones fisiológicas particulares: el tejido adiposo blanco (white adipose tissue, WAT), el tejido adiposo marrón (brown adipose tissue, BAT) y el tejido adiposo beige, también denominado "brite" (brown in white). El tejido adiposo blanco es el más abundante en adultos y cumple principalmente una función de almacenamiento energético. Almacena triglicéridos en grandes gotículas lipídicas dentro de los adipocitos y los libera en forma de ácidos grasos libres en situaciones de demanda energética. Además de su papel metabólico, este tejido actúa como un órgano endocrino, secretando diversas adipocinas como leptina, adiponectina, resistina y visfatina, que regulan funciones como el apetito, la sensibilidad a la insulina, el metabolismo lipídico y la inflamación (12).

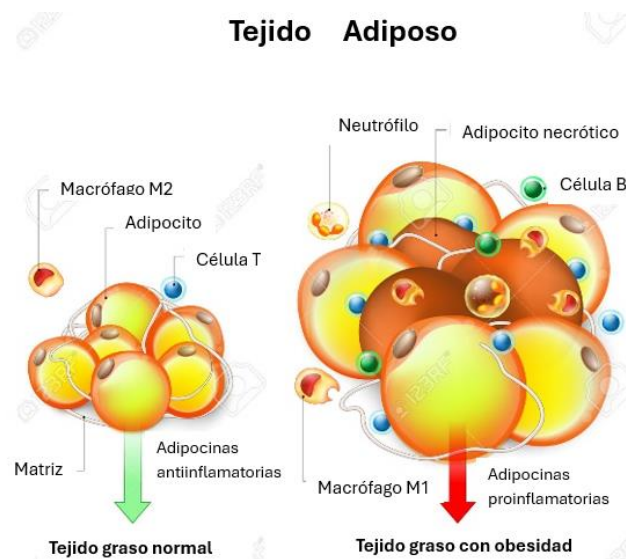
En contraste, el tejido adiposo marrón se especializa en la termogénesis no temblorosa, un proceso mediante el cual se genera calor a través del desacoplamiento de la cadena respiratoria en las mitocondrias, mediado por la proteína desacoplante UCP1. Este tipo de tejido es más abundante en recién nacidos y tiende a disminuir con la edad, aunque se ha identificado en adultos en áreas como la región supraclavicular. Recientemente, se ha descrito un tercer tipo, el tejido adiposo beige, que aparece dentro del tejido adiposo blanco en respuesta a ciertos estímulos fisiológicos como el frío o el ejercicio. Los adipocitos beige tienen la capacidad de expresar UCP1 y adquirir características termogénicas similares a los adipocitos marrones, fenómeno conocido como "browning" (13).

En el contexto de la obesidad, el tejido adiposo blanco sufre una expansión excesiva debida a la acumulación crónica de energía. Esta expansión puede producirse por hipertrofia (aumento del tamaño de los adipocitos), hiperplasia (aumento del número de adipocitos) o ambos procesos. Sin embargo, la hipertrofia adipocitaria, más común en la obesidad visceral, se asocia con una reducción de la perfusión tisular y estrés celular, lo que favorece un ambiente hipóxico e inflamatorio. En este contexto, los adipocitos comienzan a secretar mayores cantidades de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6

(IL-6), IL-1 β e IL-18, promoviendo un estado de inflamación crónica de bajo grado que caracteriza a la obesidad (14).

Cuando los adipocitos blancos se expanden debido al exceso de energía, comienzan a liberar citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e interleucinas como la IL-6, IL-1 β e IL-18, desencadenando un estado de inflamación crónica de bajo grado (15).

Esta inflamación en el tejido adiposo atrae macrófagos, los cuales amplifican la liberación de mediadores inflamatorios (Fig. 2), que juegan un papel clave en la amplificación de la respuesta inflamatoria (16). Al mismo tiempo, el exceso de grasa visceral aumenta la resistencia a la insulina, elevando los niveles de glucosa y ácidos grasos libres en la sangre, lo que contribuye a la dislipidemia (exceso de colesterol LDL y triglicéridos) y a un mayor riesgo cardiovascular (17-18).



(Figura 2). *Inflamación Crónica en Obesidad. Representación del reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo durante la obesidad, promoviendo la inflamación crónica y la disfunción metabólica.*

Citocinas Proinflamatorias

- TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral Alfa): es una de las citocinas más importantes involucradas en la respuesta inflamatoria. Se produce principalmente en el tejido adiposo, los macrófagos y otras células

inmunitarias. Tiene múltiples efectos proinflamatorios, como la activación de vías de señalización que inducen la producción de otras citocinas, la apoptosis de células y la alteración del metabolismo de los lípidos (19). El TNF- α está estrechamente asociado con la resistencia a la insulina y la obesidad visceral.

- IL-6 (Interleucina 6): Es una citocina multifuncional que actúa tanto como proinflamatoria como antiinflamatoria, dependiendo del contexto. En la obesidad, la IL-6 se produce en grandes cantidades en el tejido adiposo y está involucrada en la inducción de la inflamación crónica y a su vez con la resistencia a la insulina, el metabolismo de los lípidos y la aparición de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2.
- Interleucina 1 β (IL-1 β): Es una de las citocinas más potentes en la inducción de inflamación. Se produce en respuesta a la activación del inflamasoma, un complejo proteico dentro de las células que responde a las señales de daño o estrés. La IL-1 β actúa como un mediador clave de la inflamación en el tejido adiposo, aumentando la expresión de otras citocinas proinflamatorias y promoviendo la disfunción metabólica. Su elevada presencia está asociada con enfermedades cardiovasculares y la resistencia a la insulina (15).
- Interleucina 18 (IL-18) : La IL-18 es otra citocina proinflamatoria que, al igual que la IL-1 β , se activa por el inflamasoma. Está relacionada con el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Se ha demostrado que la IL-18 favorece la inflamación sistémica, exacerba la resistencia a la insulina y está implicada en el daño endotelial. Su expresión elevada en el tejido adiposo de personas obesas refuerza la conexión entre la inflamación crónica y el riesgo cardiovascular (20).

Dislipidemia

La dislipidemia es una condición caracterizada por alteraciones en los niveles de lípidos en la sangre, particularmente un exceso de colesterol LDL (lipoproteínas de

baja densidad) y triglicéridos. El colesterol LDL, comúnmente conocido como "colesterol malo", se acumula en las paredes de las arterias, lo que facilita la formación de placas que endurecen las arterias, aumentando el riesgo de infartos y accidentes cerebrovasculares (21). Mientras que los triglicéridos elevados son otro marcador común de la dislipidemia, y se relacionan con un mayor riesgo cardiovascular, ya que el exceso de triglicéridos en la sangre puede promover la inflamación en las paredes arteriales y alterar la función endotelial. Además, este desajuste en los niveles lipídicos también puede ser consecuencia de la alteración en el metabolismo de las grasas debido a la resistencia a la insulina y el aumento de la grasa visceral (22).

La presencia de altos niveles de ácidos grasos libres en la sangre tiene varios efectos perjudiciales. Primero, los ácidos grasos libres contribuyen a la acumulación de grasa en otros órganos, como el hígado (lo que puede llevar a la esteatosis hepática o hígado graso) y los músculos, lo que empeora aún más la resistencia a la insulina. Además, estos ácidos grasos libres circulantes son conocidos por promover la inflamación sistémica (23). Al ser liberados, los ácidos grasos libres pueden activar varias vías de señalización que inducen la producción de citocinas proinflamatorias, que son factores clave en el desarrollo de una inflamación crónica de bajo grado (24).

La inflamación sistémica resultante de la liberación de ácidos grasos libres y la elevada glucosa circulante agrava aún más la resistencia a la insulina. Este círculo vicioso perpetúa el desequilibrio metabólico, favoreciendo un estado de inflamación crónica que contribuye a la progresión de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y otras comorbilidades asociadas con la obesidad (25-26).

El consumo de dietas hipercalóricas y altas en grasas contribuyen de manera importante al aumento de los lípidos en sangre, uno de los ácidos grasos que se ha descrito juegan un papel importante en el desarrollo de dislipidemias es el ácido palmítico. Este ácido graso saturado, es abundante en alimentos procesados y

Esto facilita la migración de células inmunes hacia la pared arterial promoviendo la producción de moléculas en las células endoteliales y hepáticas, aumentando el estrés oxidativo y favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina. Este proceso interfiere con la correcta señalización de la insulina en tejidos periféricos, como el músculo y el hígado, lo que provoca una disminución en la captación de glucosa y el aumento de los niveles de glucosa en sangre (30). A medida que la resistencia a la insulina progresa, el páncreas aumenta la producción de insulina, lo que lleva a niveles elevados de insulina en la sangre (hiperinsulinemia). Sin embargo, debido a la resistencia a la insulina, esta no puede ejercer su función adecuadamente, y como resultado, los niveles de glucosa en la sangre continúan elevados (31).

Simultáneamente, la resistencia a la insulina también afecta al metabolismo de los ácidos grasos. En condiciones normales, la insulina facilita el almacenamiento de los ácidos grasos en los tejidos adiposos. Sin embargo, en la resistencia a la insulina, este proceso se ve alterado, lo que promueve la liberación de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo hacia la circulación. Esto ocurre porque los adipocitos, incapaces de almacenar los ácidos grasos de manera eficiente, los liberan al torrente sanguíneo (32).

Por lo tanto, la combinación de resistencia a la insulina, altos niveles de glucosa y ácidos grasos libres en la circulación no solo contribuye a la alteración del metabolismo, sino que también amplifica la inflamación sistémica, lo que agrava el daño a nivel vascular (33).

Disfunción endotelial

El endotelio es una delgada capa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos, regula el flujo sanguíneo mediante la producción de factores relajantes y contráctiles. Uno de los principales factores relajantes derivados del endotelio es

el óxido nítrico (NO) (34), una molécula clave para la vasodilatación, que permite la expansión de los vasos sanguíneos, y la prevención de la agregación plaquetaria, lo que evita la formación de coágulos. El NO también desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular, promoviendo una circulación adecuada.

Sin embargo, el estado inflamatorio inducido por la obesidad y el exceso de ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico, interfiere con la producción de NO. Esto provoca vasoconstricción, aumenta la presión arterial y favorece la adhesión de monocitos a las paredes vasculares (Figura 2) (35), un proceso mediado por la expresión de moléculas de adhesión como la VCAM-1 (molécula de adhesión vascular-1) y la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), que facilitan la migración de células inmunes al sitio de inflamación, exacerbando el daño endotelial (36).

Aquí entra en juego el estrés oxidativo: las especies reactivas de oxígeno (ROS) que reducen aún más la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), esencial para la vasodilatación y la función vascular. Una de las principales enzimas productoras de ERO en la vasculatura es la NADPH oxidasa (NOX4) lo que exacerba la disfunción endotelial y favorece la progresión de la aterosclerosis (37). En este contexto, la función vasodilatadora de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3) se ve comprometida, ya que el estrés oxidativo desregula su capacidad para generar NO de forma adecuada (38). Además, la inflamación crónica altera la expresión de NOS2 (inducible), que, a diferencia de NOS3, produce grandes cantidades de NO en respuesta a los estímulos inflamatorios. Sin embargo, este exceso de NO, en presencia de ROS, favorece la formación de peroxinitrito (ONOO-), lo que contribuye a un daño aún mayor en el endotelio (39). La desregulación de NOS2 y NOS3, junto con el aumento de ROS generados por NOX4, establece un ciclo perjudicial que agrava la disfunción endotelial y facilita el proceso aterosclerótico (40).

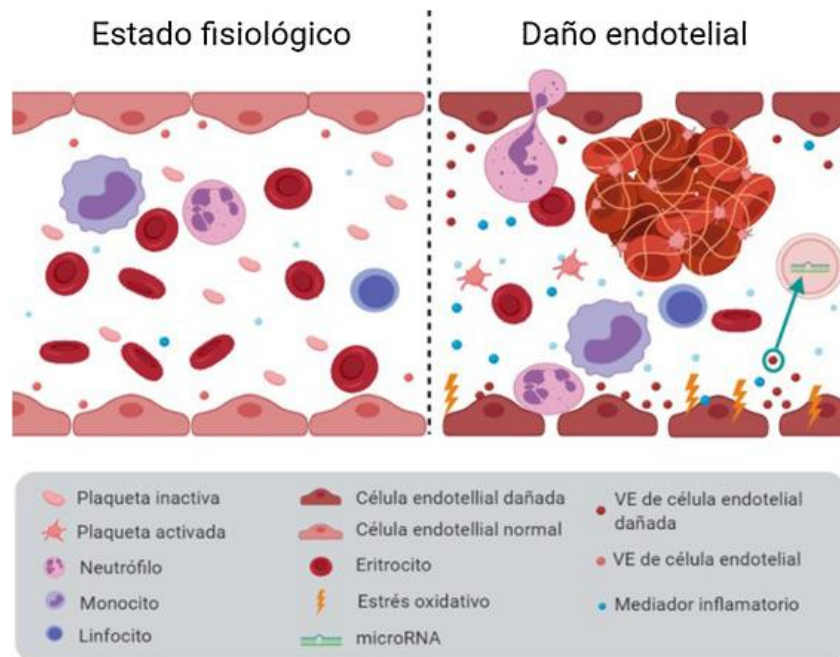


Figura 4. Inflamación y Estrés Oxidativo como Factores Clave en la Disfunción Endotelial. Impacto de la inflamación y el estrés oxidativo en la disfunción endotelial. Se muestra la reducción en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y el aumento de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1).

Aterosclerosis, un Daño Irreversible

La combinación de inflamación crónica y disfunción endotelial crea el escenario perfecto para la aterosclerosis. En este proceso, las LDL oxidadas (oxLDL) se infiltran en la pared arterial, donde son captadas por los macrófagos, los cuales, al intentar eliminar estas partículas, se transforman en células espumosas (41). Estas células espumosas se acumulan en las paredes arteriales y forman las placas ateroscleróticas, compuestas principalmente de lípidos, células inflamatorias y tejido fibroso. Con el tiempo, estas placas se agrandan y endurecen, estrechando el lumen de las arterias y reduciendo el flujo sanguíneo (Figura 5) (42).

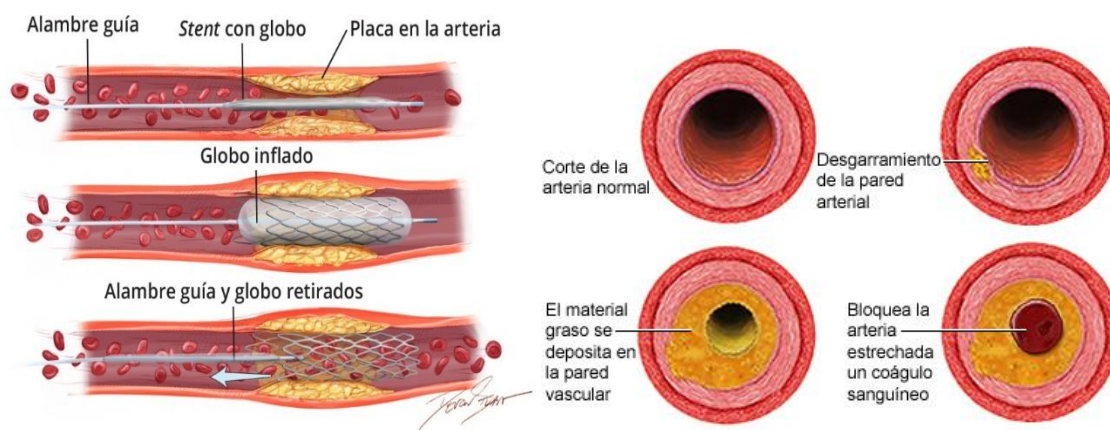


Figura 5. Proceso de formación de placas ateroscleróticas. infiltración de LDL oxidadas (oxLDL), transformación de macrófagos en células espumosas y estrechamiento de la luz arterial, muestra también el impacto en la rigidez vascular y el flujo sanguíneo. Se ilustra el riesgo de ruptura de placas y formación de trombos

El proceso es gradual, y las arterias se vuelven más rígidas y menos capaces de dilatarse adecuadamente. Además, las placas ateroscleróticas pueden romperse o fisurarse, lo que provoca la formación de coágulos sanguíneos que pueden obstruir por completo el paso de sangre, ocasionando eventos cardiovasculares graves como infartos de miocardio o accidentes cerebrovasculares (ACV) (43). La progresión de la aterosclerosis está íntimamente relacionada con la inflamación crónica y el estrés oxidativo, que favorecen tanto la formación de placas ateroscleróticas como su eventual complicación con eventos trombóticos (44).

Estos procesos patológicos contribuyen a la complicación de la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, enfoques metabólicos como la dieta cetogénica y el ayuno intermitente han demostrado ser estrategias eficaces para reducir la inflamación sistémica y mejorar el perfil lipídico, factores clave en la prevención de la aterosclerosis (45). Al inducir un estado de cetosis, estos métodos no solo favorecen la utilización de grasas como fuente primaria de energía, sino que también impactan positivamente en el metabolismo y la salud cardiovascular, reduciendo así los factores de riesgo asociados a la enfermedad aterosclerótica (46).

La Cetogénesis

El cuerpo es capaz de ajustar su metabolismo para adaptarse a la falta de glucosa, que normalmente es su fuente primaria de energía. En lugar de depender de los carbohidratos, el cuerpo empieza a utilizar grasas como fuente principal de energía (Figura 6). Este proceso metabólico es conocido como cetogénesis, y tiene lugar principalmente en el hígado (47). A través de este proceso, se producen cuerpos cetónicos, que son moléculas que sirven como una fuente alternativa de energía para los órganos, especialmente el cerebro, que normalmente depende de la glucosa (48).

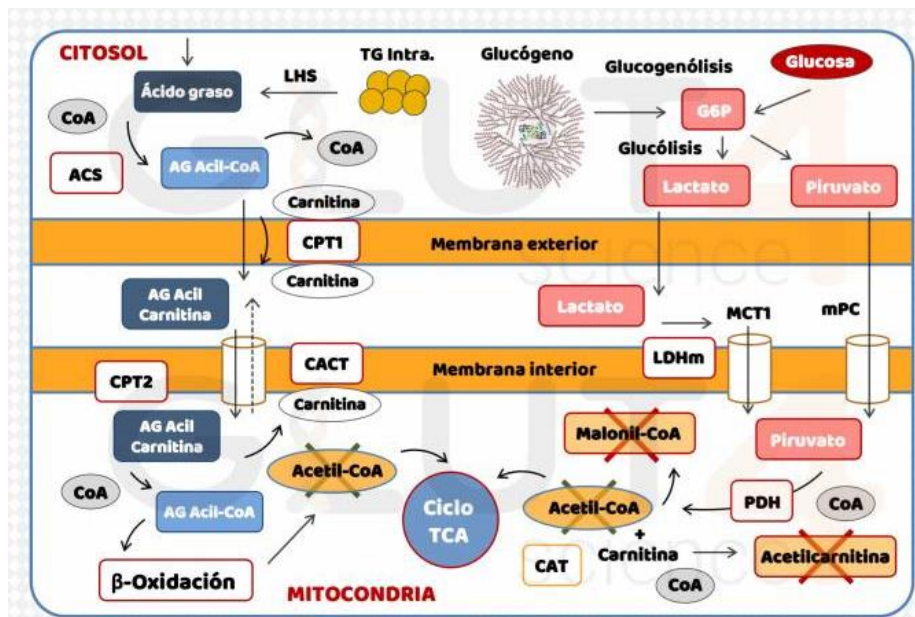


Figura 6. Principales mecanismos en respuesta a una elevada intensidad de consumo de grasa energética, un elevado flujo glucolítico aumenta el piruvato y lactato generando más Acetil CoA. E inhibe la oxidación de AG (PDH enzimas clave). La cantidad de carnitina libre decrece con el Acetil CoA, limitando el funcionamiento de CPT1 y de la CD36, claves en el transporte de AG a la mitocondria.

Factores que favorecen la síntesis de cuerpos cetónicos

Existen diversos factores que obligan al cuerpo a utilizar las grasas como fuente principal de energía en lugar de carbohidratos como son:

- La dieta Cetogénica: (<50 g/día de carbohidratos) este enfoque se basa en una severa restricción de carbohidratos, lo que induce un estado metabólico conocido como cetosis. Durante la cetosis, el cuerpo descompone las grasas en cetonas (como el beta-hidroxibutirato (BHB)), que se convierten en la fuente principal de energía para el cerebro y los músculos. La dieta cetogénica promueve un alto consumo de grasas saludables (aceite de oliva, aguacates, nueces) y un consumo moderado de proteínas (carnes magras, pescados, huevos), mientras que los carbohidratos se limitan principalmente a verduras bajas en almidón (49).
- Ayuno Intermitente: En el ayuno intermitente, se alternan períodos de ingesta de alimentos con períodos de ayuno. Este patrón alimenticio favorece la quema de grasas como fuente de energía, ayudando a regular los niveles de insulina en sangre y mejorando la utilización de grasas durante los períodos sin comida. El ayuno intermitente puede potenciar los efectos de la dieta cetogénica y también contribuir a la reducción de la grasa corporal.
- Bajos niveles de glucosa en sangre: Cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, el cuerpo recurre a las reservas de grasa para obtener energía, estimulando la producción de cuerpos cetónicos.
- Diabetes no tratada tipo 1: En personas con diabetes tipo 1 no tratada, la falta de insulina impide que la glucosa entre en las células para producir energía, lo que lleva al cuerpo a producir cuerpos cetónicos a partir de grasas.
- Inanición: Durante periodos prolongados de inanición, el cuerpo agota sus reservas de glucógeno y comienza a descomponer las grasas para obtener energía, lo que induce la cetosis.
- Ayuno prolongado: El ayuno prolongado o períodos extendidos sin alimentos obligan al cuerpo a utilizar las grasas como fuente principal de energía, favoreciendo la formación de cuerpos cetónicos.

- Alta demanda energética (ejercicio prolongado): En situaciones de ejercicio intenso o prolongado, el cuerpo también recurre a las grasas como fuente de energía para sostener el rendimiento, lo que promueve la producción de cuerpos cetónicos.
- Consumo crónico de alcohol: El consumo crónico de alcohol puede llevar a una reducción de los niveles de glucosa en sangre y a una mayor utilización de grasas como fuente de energía, induciendo la formación de cuerpos cetónicos (50).

Estos enfoques y condiciones inducen un estado metabólico que tiene varios efectos positivos para la salud:

- Pérdida de peso: Al promover la quema de grasas como fuente principal de energía, estos factores pueden ayudar en la reducción de grasa corporal.
- Mejora del control de glucosa: La restricción de carbohidratos y el ayuno ayudan a regular los niveles de glucosa en sangre, lo que es beneficioso para personas con diabetes tipo 2 o resistencia a la insulina.
- Mejora de la salud cardiovascular: Estos enfoques pueden mejorar los niveles de lípidos en sangre, reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares.
- Mayor energía y rendimiento físico: El uso de cetonas como fuente de energía proporciona una fuente más estable y duradera de energía, lo que puede mejorar el rendimiento físico y mental.

Durante estos procesos, el cuerpo moviliza los ácidos grasos desde el tejido adiposo, los cuales son transportados al hígado. Allí, ingresan a las mitocondrias donde sufren un proceso de beta-oxidación, generando como producto acetil-CoA. Este compuesto es el precursor para la síntesis de cuerpos cetónicos (51).

La síntesis de cuerpos cetónicos:

En este proceso, el cuerpo empieza a descomponer las grasas para producir energía, y una de las formas en las que lo hace es mediante la formación de cuerpos cetónicos, moléculas que sirven como una fuente de energía alternativa cuando los carbohidratos (que se descomponen en glucosa) son escasos (52). Los tres principales cuerpos cetónicos son: Acetoacetato, Beta-hidroxibutirato (BHB) y Acetona (Figura 7).

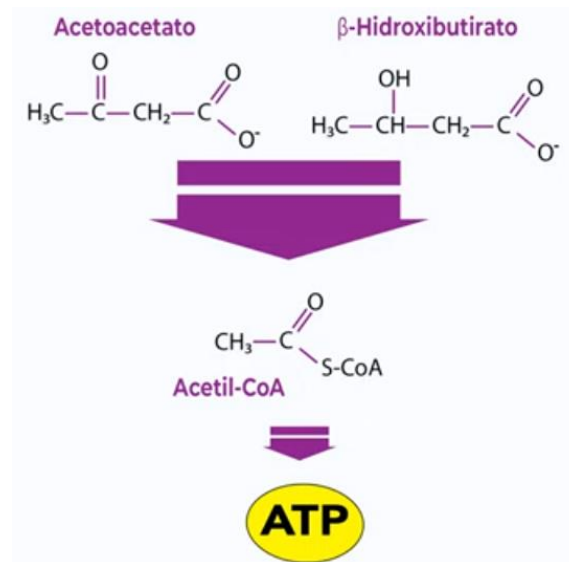


Figura 7. Principales cuerpos cetónicos producidos en el hígado. acetoacetato, beta-hidroxibutirato (BHB) y acetona.

Todo comienza con el:

1. Exceso de Acetil-CoA:

El acetil-CoA es una molécula clave en el metabolismo energético. Se produce cuando se descomponen las grasas (en forma de ácidos grasos) a través de un proceso llamado beta-oxidación en condiciones de baja glucosa, la principal fuente de acetil-CoA son los ácidos grasos (Figura 8).

Cuando hay un exceso de acetil-CoA en el cuerpo (generalmente debido a una alta quema de grasas), este se dirige hacia la formación de cuerpos cetónicos en lugar

de entrar en el ciclo de Krebs, que es donde normalmente se utiliza para generar energía a partir de carbohidratos.

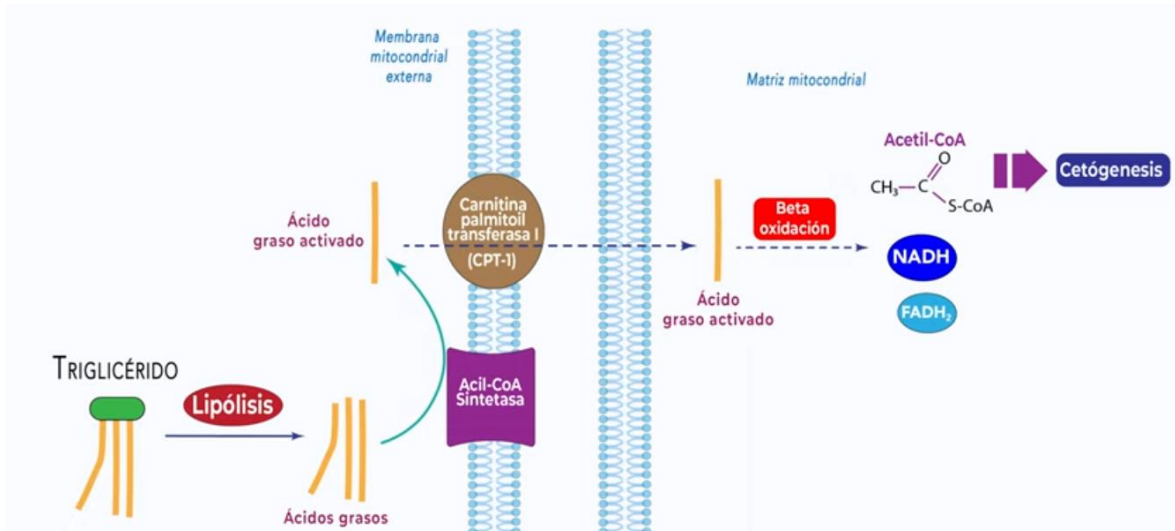


Figura 8. Beta-Oxidación. Conversión de ácidos grasos en acetil-CoA mediante beta-oxidación en la mitocondria hepática, facilitando la producción de cuerpos cetónicos.

2. Formación de Acetoacetato:

El exceso de acetil-CoA se convierte en acetoacetato. Este es el primer cuerpo cetónico que se forma en las mitocondrias del hígado, a través de una serie de reacciones enzimáticas (Figura 9). El acetoacetato es el precursor de los otros dos cuerpos cetónicos: como el BHB y la acetona.

3. Transformación a Beta-hidroxibutirato (BHB):

El acetoacetato puede ser transformado en beta-hidroxibutirato (BHB). Esta conversión ocurre en el hígado y es una forma de almacenar energía de manera más estable y eficiente. El BHB es considerado el cuerpo cetónico principal que el cuerpo utiliza para obtener energía durante la cetosis. El BHB es transportado a través del torrente sanguíneo hacia varios tejidos y órganos, como el cerebro, los músculos y el corazón, donde puede ser utilizado como fuente de energía.

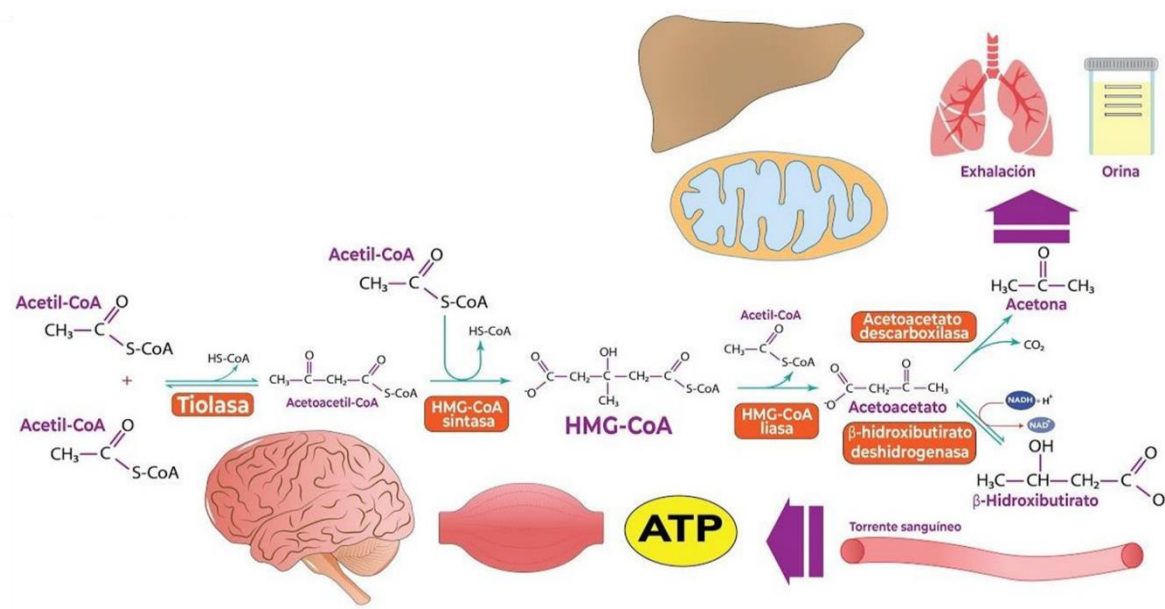


Figura 9. Esquema de la cetogénesis. Se observa la conversión de acetil-CoA en cuerpos cetónicos (acetoacetato, beta-hidroxibutirato y acetona), su transporte en sangre y eliminación por exhalación y orina.

4. Formación de Acetona:

La acetona es otro de los cuerpos cetónicos producidos, pero en menor cantidad en comparación con el acetoacetato y el BHB. A diferencia de los otros dos, la acetona no se utiliza tanto como fuente de energía (Figura 10). En lugar de ello, la acetona se excreta del cuerpo a través de la orina y respiración (es la razón por la cual algunas personas en cetosis tienen un aliento que huele a fruta o "acetona"). (53-54).

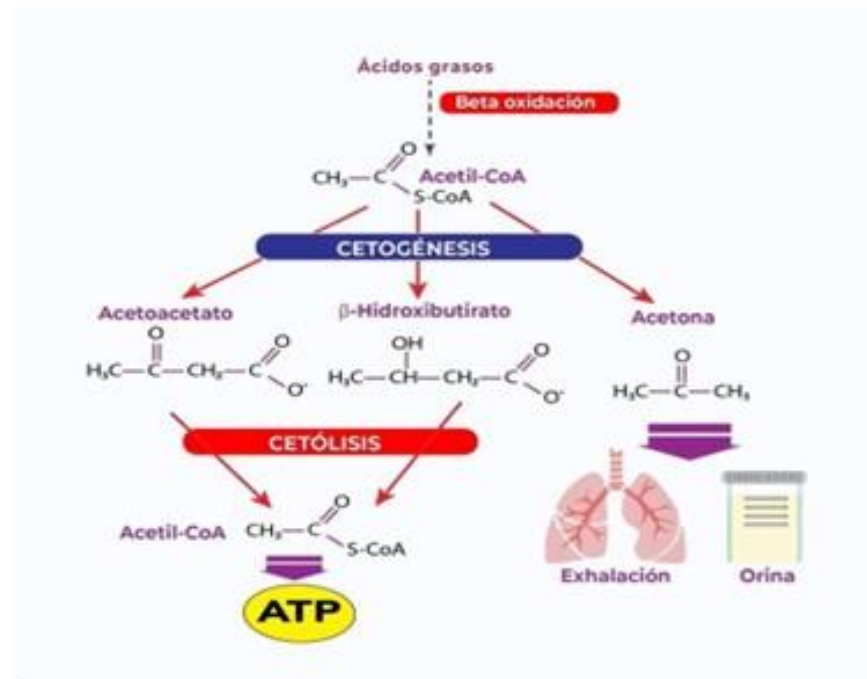


Figura 10. Metabolismo de los cuerpos cetónicos. cetogénesis, cetólisis y eliminación de acetona.

5. Utilización en tejidos periféricos:

El BHB viaja a órganos como el cerebro, el corazón y el músculo, donde es convertido nuevamente en acetil-CoA y utilizado en el ciclo de Krebs para obtener energía (Figura 11) (55).

Niveles Normales de BHB en Sangre

Los niveles de BHB en sangre varían según el estado metabólico del individuo, y su medición es crucial para evaluar el estado de cetosis o posibles trastornos relacionados con el metabolismo de las grasas.

- Estado Basal (Dieta Normal):

Rango de BHB: 0.1 - 0.5 mM

En una persona que sigue una dieta normal y consume una cantidad adecuada de carbohidratos, los niveles de BHB en sangre se mantienen relativamente bajos, ya que el cuerpo prefiere utilizar la glucosa como fuente primaria de energía. En este estado, el cuerpo produce cuerpos cetónicos en pequeñas cantidades, como subproductos de la beta-oxidación de las grasas, pero estos no son suficientes para proporcionar una fuente de energía dominante.

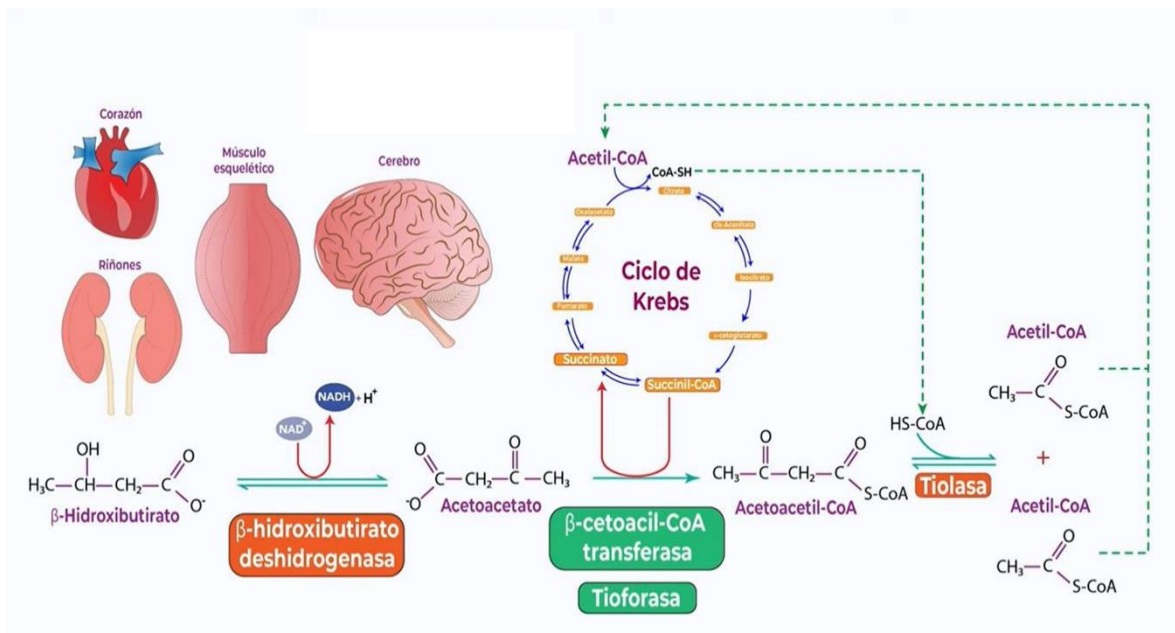


Figura 11. Utilización de los cuerpos cetónicos en los tejidos periféricos, donde el BHB se convierte nuevamente en acetil-CoA para su uso en el ciclo de Krebs.

- Ayuno de 24-48 horas:

Rango de BHB: 1 - 3 mM

Durante el ayuno prolongado, el cuerpo empieza a utilizar las reservas de grasa como fuente principal de energía, ya que la glucosa en sangre disminuye. La producción de cuerpos cetónicos aumenta para reemplazar la glucosa como combustible, y el BHB se eleva significativamente en la sangre. En este rango, el cuerpo entra en un estado de cetosis leve, donde los

cuerpos cetónicos proporcionan una fuente eficiente de energía tanto para el cerebro como para los músculos.

- Dieta Cetogénica:

Rango de BHB: 0.5 - 3 mM

En individuos que siguen una dieta cetogénica, los niveles de BHB en sangre se mantienen dentro de este rango. La severa restricción de carbohidratos obliga al cuerpo a descomponer las grasas para producir cuerpos cetónicos como el BHB, que se utilizan como fuente primaria de energía. La dieta cetogénica está diseñada para mantener al cuerpo en un estado de cetosis de manera constante, lo que permite una mayor quema de grasas y una regulación más estable de los niveles de glucosa en sangre.

- Cetoacidosis Diabética (Estado Patológico):

Rango de BHB: >10 mM

La cetoacidosis diabética (CAD) es un estado patológico grave que se presenta principalmente en personas con diabetes tipo 1 no controlada. En este estado, la falta de insulina impide que la glucosa ingrese a las células para ser utilizada como energía. Como resultado, el cuerpo aumenta la producción de cuerpos cetónicos de manera excesiva, lo que lleva a un nivel extremadamente alto de BHB en sangre (generalmente superior a 10 mM). Este aumento puede resultar en un entorno ácido en la sangre, lo que pone en riesgo al paciente debido a la posible alteración del equilibrio ácido-base, deshidratación y otros problemas metabólicos graves. La cetoacidosis diabética requiere tratamiento médico urgente para reducir los niveles de cuerpos cetónicos y restaurar el equilibrio de glucosa e insulina (56).

Tratamientos con BHB: Un Posible Aliado

El beta-hidroxibutirato (BHB), no solo actúa como una fuente de energía alternativa en el organismo, sino que también ha demostrado tener efectos antiinflamatorios, antioxidantes, y protectoras en varios sistemas fisiológicos.

- Efectos antiinflamatorios

El BHB tiene la capacidad de modular la respuesta inflamatoria al inhibir la activación del inflamasoma NLRP3. El inflamasoma NLRP3 es una proteína compleja que juega un papel crucial en la inflamación aguda y crónica. Su activación conduce a la liberación de IL-1 β (interleucina-1 beta) y otras citocinas proinflamatorias. La inhibición de NLRP3 por parte del BHB puede contribuir a reducir la inflamación sistémica, lo que sería beneficioso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y trastornos metabólicos (57).

- Efectos sobre la función Endotelial.

El BHB ha demostrado tener efectos protectores sobre el endotelio vascular, el revestimiento de los vasos sanguíneos que juega un papel clave en la regulación de la función vascular. En condiciones de estrés oxidativo e inflamación, la biodisponibilidad del NO se ve comprometida para el mantenimiento de la salud cardiovascular. El BHB ayuda a aumentar la biodisponibilidad del NO, lo que favorece la vasodilatación y mejora el flujo sanguíneo, reduciendo la hipertensión y protegiendo contra la aterosclerosis. (58).

- Efecto sobre el estrés oxidante El BHB también tiene un potente efecto antioxidante, ya que modula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) regulando la actividad de la NADPH oxidasa. Además, el BHB

aumenta la expresión de genes antioxidantes como la super óxido dismutasa (SOD) y la catalasa. (57-41).

Potencial Terapéutico del BHB: Enfermedades Metabólicas, Neurodegenerativas y Cardiovasculares

Dada su capacidad para influir en procesos metabólicos, inflamatorios y antioxidantes, el BHB ha generado un creciente interés en su uso terapéutico en diversas condiciones clínicas:

- **Enfermedades Metabólicas:** En enfermedades como la diabetes tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico, el BHB puede mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir la inflamación crónica, lo que ayuda a controlar los niveles de glucosa en sangre y mejorar el perfil lipídico. Además, al reducir el estrés oxidativo, el BHB podría proteger los órganos afectados por la diabetes, como los riñones y los ojos, previniendo complicaciones como la nefropatía y la retinopatía diabética (58).
- **Enfermedades Neurodegenerativas:** El BHB tiene un efecto protector sobre las neuronas, reduciendo el daño neuronal inducido por el estrés oxidativo. Este efecto antioxidante podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson y otras demencias. El BHB también proporciona una fuente alternativa de energía para las células cerebrales, lo que puede ser útil en condiciones en las que la glucosa no es utilizada eficientemente por el cerebro, como en las fases iniciales de estas enfermedades (59).
- **Enfermedades Cardiovasculares:** El BHB, al mejorar la función endotelial y aumentar la biodisponibilidad de NO, puede proteger el sistema cardiovascular, reduciendo el riesgo de hipertensión y enfermedades arteriales. También tiene efectos beneficiosos sobre los lípidos sanguíneos,

disminuyendo los niveles de triglicéridos y colesterol LDL, lo que reduce el riesgo de aterosclerosis y otros trastornos cardíacos (60).

Investigación y Desafíos en el Uso Clínico del BHB

Aunque los efectos del BHB son prometedores en muchos contextos, se requiere más investigación para evaluar su seguridad y eficacia a largo plazo en diversas condiciones clínicas. Los suplementos de BHB están siendo estudiados en ensayos clínicos, especialmente para su uso en enfermedades como la diabetes, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades cardiovasculares. Si bien los estudios preliminares sugieren efectos beneficiosos también hay estudios en los que no se observan cambios o se producen efectos no deseados con el uso del BHB, Por lo que es necesario abordar varios desafíos antes de que el BHB se convierta en una terapia estándar para estas enfermedades, como la determinación de dosis óptimas, la seguridad a largo plazo y la posible interacción con otros tratamientos farmacológicos.

Metodología

Disección de la arteria aorta.

Se emplearon ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad, provenientes del bioterio de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las ratas fueron sacrificadas mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Se realizó una incisión sagital desde el abdomen hasta el tórax con tijeras quirúrgicas y se extrajo la aorta torácica. La aorta fue transferida a una caja Petri, donde se lavó con PBS (solución salina tamponada con fosfato) estéril y se retiró el tejido adiposo perivascular (TAPV) (Fig. 1). Finalmente, la aorta se colocó en un tubo Falcon de 15 ml con PBS estéril y se transportó al cuarto de cultivo celular para el aislamiento de las células endoteliales.



Figura 1. Izquierda: Arteria aorta recién disecada. Derecha: Arteria aorta limpia.

Cultivo primario de células endoteliales de la aorta de rata

La aorta se colocó en un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml y se adicionaron 100 μ l de colagenasa P disuelta en medio DMEM (CAPRICORN scientific, 4.5 g/L) alto en glucosa (2 mg/ml pH 7.4) dentro del lumen arterial, se incubó por 25 minutos a 37°C en un ambiente de 95% O₂ y 5% CO₂ (Thermo scientific). En seguida se adicionaron 200 μ l de DMEM + suero bovino fetal 10% (SBF) (B-bio, PREMIUM) + antibiótico-

antimicótico 0.01% (AA) (ver Tabla A1 en el Anexo A) dentro del lumen arterial, para detener la reacción de la colagenasa P. Se retiró la aorta del tubo de microcentrífuga, se centrifugó el medio de cultivo con células endoteliales a 1200 rpm por 8 minutos a 4°C, se verificó la formación del pellet y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de DMEM alto en glucosa preparado con SBF 10% y AA 0.01% y se sembró en botellas (Corning) para cultivo celular de 25cm². En seguida se adicionó 1 ml más de DMEM alto en glucosa y se incubó a 37°C en un ambiente de 95% O₂ y 5% de CO₂ dentro de una incubadora de cultivo celular. Transcurridas 24h, se verificó que las células estuvieran pegadas a la base de la botella de cultivo, lo cual se confirmó al observar su morfología alargada (Figura 2).

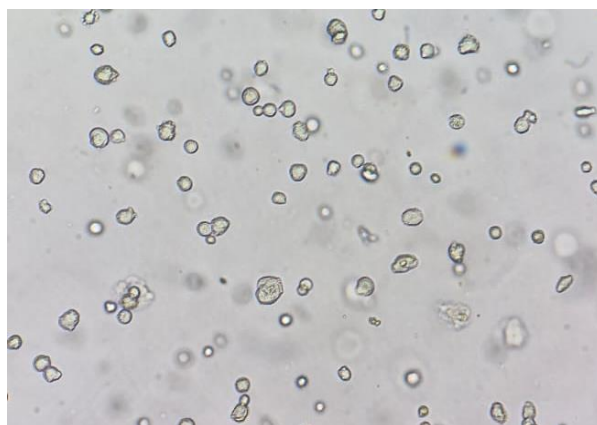


Figura 2. Cultivo primario de células endoteliales pegadas a la base de la botella de cultivo. Microscopio invertido. Objetivo 40x

Cambio de medio de cultivo

Se cambió el medio de cultivo cada 48 h hasta que las células endoteliales llegaron al 90% de confluencia, una vez llegada la confluencia se retiró el medio y se lavaron con 2 ml de PBS (pH 7.4) estéril. En seguida se añadieron 2 ml de DMEM alto en

glucosa preparado a la botella de cultivo y se incubó nuevamente en la incubadora a 37°C en un ambiente de 95% O₂ y 5% de CO₂ (Figura 3).

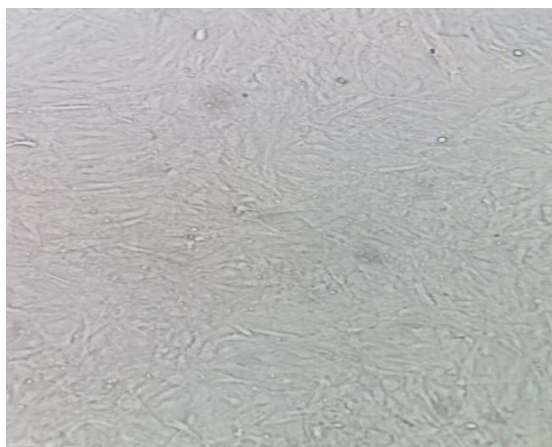


Figura 3. Cultivo primario de células endoteliales con una confluencia del 90%

Conteo celular en cámara de Neubauer

Para determinar el número de células/ml las células se despegaron adicionando 1 ml de tripsina al 0.025% (gibco 0.25% Trypsin-EDTA 1X), hasta observar en el microscopio que las células endoteliales comenzaron a despegarse de la base de la botella, lo que se confirmó al observar que perdieron su forma alargada y tomaron una forma redonda como al inicio (Figura 4).

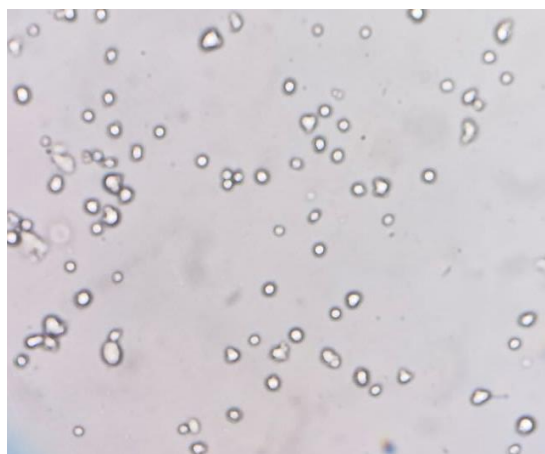


Figura 4. Cultivo primario de células endoteliales Tripsinizadas

Una vez que las células estaban despegadas, se les añadieron 2 ml de DMEM preparado con SBF y AA para detener el efecto de la tripsina y posteriormente se pasaron a un tubo falcón de 15 ml y se centrifugó a 1200 rpm por 8 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de DMEM alto en glucosa preparado con SBF y AA. Se tomaron 40 µl de medio con células endoteliales y 20 µl de azul de tripán (Blue Rhexis, sterile solution al 0.06%) se mezclaron y se colocaron en la cámara de Neubauer para el conteo de células/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{N \times 10^4 \times FD \times V}{L \times A \times P}$$

Donde:

C = Concentración celular en células por mL

N = Número de células contadas en las 4 grandes cuadrículas (es decir, el número total de células contadas en la cámara de Neubauer).

L = Longitud de la cámara de Neubauer (mm²)

A = Ancho de la cámara de Neubauer (mm²)

P = Profundidad de la cámara de Neubauer (mm³)

FD = Factor de dilución = Volumen final/Volumen de células (µl)

V= Volumen de resuspensión del pellet de células (µl)

Resiembra de células endoteliales de aorta de rata

Se calculó el volumen necesario para sembrar 5000 mil células/ml ya sea en botella, placa de 96 pozos, placa multipozo de 6 pozos o cámaras de cultivo sobre

portaobjetos (Corning/Biolab/SARSTED) (Figura 5), dependiendo del análisis a realizar. Una vez resemebradas, se les añadió DMEM alto en glucosa preparado con SBF y AA, se a 37°C en un ambiente de 95% O₂ y 5% de CO₂ Cambiando el medio de cultivo cada 48 h hasta que las células endoteliales llegaron al 90% de confluencia.



Figura 5. GreenVector. *Frasco y placas para cultivo celular: Ilustración vectorial de equipos de laboratorio utilizados en experimentos de ciencias naturales.* Depositphotos. https://st3.depositphotos.com/6027554/12763/v/950/depositphotos_127631690-stock-illustration-flask-and-plates-for-cell.jpg

Inmuncitoquímica

Antes de iniciar los tratamientos, se realizaron pruebas de inmunocitoquímica para confirmar que las células obtenidas fueran principalmente células endoteliales y que no se diferenciaron a otro tipo celular por efecto de los pases realizados o la incubación con el ácido palmítico o el BOH. Una vez alcanzado el 90% de confluencia en las células de las cámaras de cultivo sobre portaobjetos, se retiró el medio y se lavaron con PBS estéril para proceder con el análisis.

Después del lavado, las células se fijaron con p-formaldehído (PFA 4%) (SIGMA, Germany) durante 30 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 (5 minutos por lavado), para eliminar residuos del fijador.

Las preparaciones se incubaron con Tritón X-100 al 0.1% (SIGMA X100-100MI) durante 10 minutos para facilitar la entrada de anticuerpos en el interior celular. Posteriormente, se repitieron tres lavados con PBS a pH 7.4 (5 minutos por lavado), para eliminar restos de tritón X-100.

Se realizó una incubación con albumina sérica bovina (BSA, Bovine Serum Albumin) al 0.1% durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Después se repitieron los tres lavados con PBS a pH 7.4 (5 minutos por lavado), para eliminar restos de la proteína.

A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario (concentración 1:100) específico para reconocer la proteína de interés PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 o CD31, Santa Cruz Biotechnology) y se dejó incubar durante 24 horas en cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron los lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido y después incubó durante una hora con el anticuerpo secundario (concentración 1:50) acoplado a un agente fluorescente que detecta al anticuerpo primario (Alexa 488 Anti-Mouse, Alexa 488 Anti-Rabbit). Se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido.

Además, se realizó una incubación con DAPI durante 5 minutos para teñir los núcleos celulares y facilitar la identificación de las células. Se realizaron lavados con PBS por 10 minutos para eliminar el exceso de DAPI.

Finalmente, se dejó la muestra a temperatura ambiente y se colocó una gota de glicerol al 10%, como medio de montaje, sobre la muestra para preservar la fluorescencia, luego se colocó un cubreobjetos limpio y se selló con esmalte transparente, asegurándose de realizar todo el procedimiento bajo condiciones controladas y protegidas de la luz para evitar la degradación de los fluoróforos.

Los portaobjetos se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DM500 / DM750) (Figura 6). Este tipo de microscopio está diseñado para detectar la

fluorescencia emitida por los fluoróforos presentes en los anticuerpos secundarios que se han unido a las proteínas de interés.

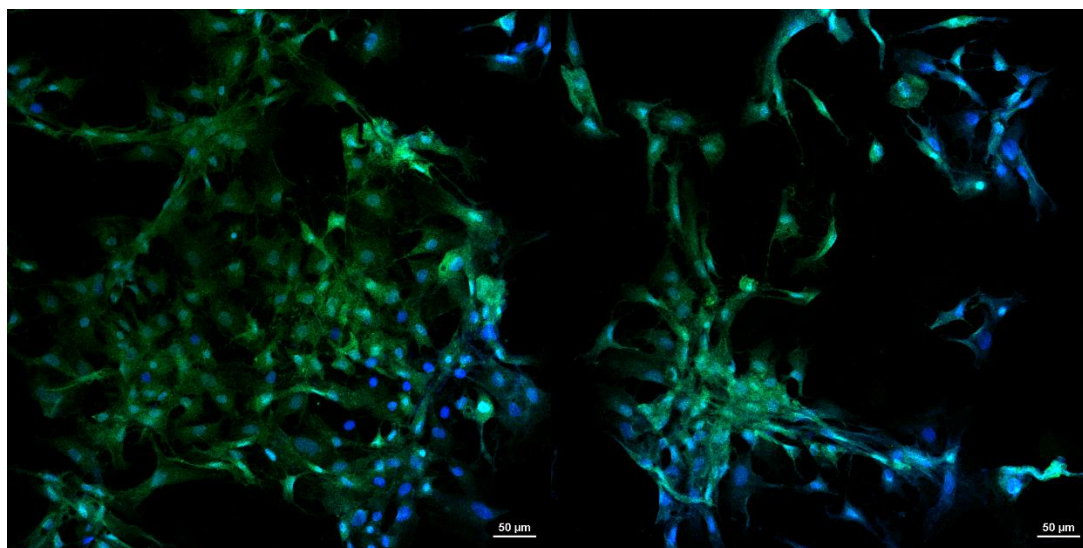


Figura 6. Imagen obtenida mediante microscopia de fluorescencia, mostrando tinción con DAPI para resaltar los núcleos celulares (color azul)

Tratamiento de las células con AP y BHB

Una vez que los cultivos celulares alcanzaron el 90% de confluencia en los diferentes tipos de placas que se utilizaron, se lavaron las células con PBS y se añadieron 2 ml de DMEM bajo en glucosa sin SBF (Tabla A2-Anexo A) y se dejaron en arresto por 24 h. Posteriormente se incubaron con Ácido palmítico (AP) (SIGMA, SigmaUltra, 99% pureza) (55), y Beta-hidroxibutirato (BHB) (ALDRICH, Sodium 3-hydroxybutyrate 99% pureza) durante 24 horas con las concentraciones descritas en la Tabla B3 en el Anexo a 37°C en un ambiente de 95% de O₂ y 5% de CO₂ durante 24 h, para posteriormente determinar la viabilidad celular, concentración de ácidos grasos y extracción de RNA.

Ensayos de viabilidad celular

Para determinar si los tratamientos con AP y BHB producían cambios en la viabilidad celular, se realizaron las pruebas de viabilidad en placas de cultivo de 96 pozos (figura 7). Después de las 24 horas de incubación con cada tratamiento, descrito anteriormente, se agregaron 10 μ L de solución de resazurina (Resazurin Cell Viability Assay Kit, Biotium (60)) a cada pozo de la placa con tratamiento (ver Tabla B1). simultáneamente se realizó una curva estándar de ácido palmítico y una con BHB, las cuales se prepararon siguiendo las concentraciones indicadas en el Anexo C. La placa se dejó incubar con resazurina a 37°C, realizando las lecturas a 1, 3 y 6 horas con la finalidad de determinar el tiempo óptimo de incubación.

Las placas se cuantificaron a 570 nm y 600 nm en un el espectrofotómetro (E poch). Una vez obtenidas las mediciones se debe restar la absorbancia de fondo a 600 nm de la absorbancia de 570 para cada muestra. Finalmente se graficaron los valores obtenidos para determinar los cambios en la viabilidad.



Figura 7. Placa de 96 pozos utilizada para el ensayo de viabilidad celular, donde se colocó Resazurina en cada y se incubó durante 1, 3 y 6 horas.

Concentración de ácidos grasos

Para la determinación de la concentración de ácidos grasos se realizó con el kit Free Fatty Acid Assay Kit (Abcam) (61).

Se utilizó una cantidad aproximada de 1×10^6 células por ensayo, las cuales fueron lavadas con PBS 1, se despegaron con 1 mL de Tripsina. Posteriormente, las células se homogenizaron en 200 μ L de una solución de cloroformo/Tritón X-100 (1% Tritón en cloroformo puro). Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos para asegurar una adecuada disolución de los lípidos.

La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm para asegurar las fases. La fase orgánica, que contenía los lípidos, se recolectó y se secó al aire durante 30 minutos para eliminar el exceso de cloroformo. Los lípidos secos se disolvieron en 200 μ L de Assay Buffer.

Para la cuantificación de ácidos grasos se realizó una curva estándar de ácido palmítico (Anexo C1). Esto permitió establecer una relación precisa entre la concentración de ácido graso y la señal obtenida en el ensayo

Las reacciones se llevaron a cabo añadiendo en cada pocillo 50 μ L de Reaction Mix (44 μ L de Assay Buffer, 2 μ L de OxiRed Probe, 2 μ L de Acyl CoA Enzyme Mix y 2 μ L de Enhancer). Posteriormente se agregaron 2 μ L de ACS Reagent a cada pocillo. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 minutos para permitir que se produjera la reacción enzimática. Para las lecturas se midió la absorbancia a 570 nm.

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de células endoteliales se utilizaron las células adherentes en las placas para cultivo celular de 6 pozos, las cuales ya tenían 24 horas del tratamiento con ácido palmítico y β -hidroxibutirato, se lavaron con PBS y se añadió 1 mL de TRIzol (INVITROGEN-CTR Cientific) directamente a cada pozo, para ayudar al desprendimiento de las células se utilizó un raspador (cell scraper)

Posteriormente la mezcla de células lisadas se transfirió a un tubo para microcentrifuga, se homogenizó mediante pipeteo repetido para luego agregarle 200 μ L de cloroformo (MP-USA, grado biología molecular) a la muestra y se agitó vigorosamente durante unos segundos.

La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C para separar la mezcla en tres fases: una fase acuosa superior (contiene RNA), una fase intermedia (contiene proteínas) y una fase orgánica inferior (contiene lípidos y material insoluble). se separó cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo.

Se añadieron 500 μ L de isopropanol (Sigma-Aldrich, grado biología molecular 99.5% GC) y se homogeneizó por inversión. La mezcla se dejó incubar a -70°C toda una noche y al día siguiente se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C para precipitar el RNA.

El sobrenadante se decantó y el pellet de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C para precipitar el RNA.

Se determinó la integridad del RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se determinó su concentración utilizando un espectrofotómetro a 260 nm (E poch). La calidad se determinó por la relación de absorbancias 260/280.

Síntesis de cDNA

Se utilizó una concentración de 1 µg de RNA total. La síntesis de cDNA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el kit (thermoscientific, RevertAid RT kit, molecular biology).

La mezcla de reacción (Tabla D1, Anexo D) con el RNA se colocaron en tubos de 0.2 mL y se incubaron en un termociclador con los siguientes ciclos de temperatura:

Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas/Propósito
25	10 minutos	Unión de primers random
42	50 minutos	Síntesis de cDNA
70	15 minutos	Inactivación de la transcriptasa inversa
4	Hasta uso final	Enfriamiento de la mezcla

El cDNA sintetizado se almacenó a -70°C hasta su uso en PCR.

PCR tiempo real (qPCR)

Para realizar PCR en tiempo real (qPCR) se mezclaron los componentes en la Tabla E1 del Anexo E (thermoscientific, molecular biology) para un volumen total de reacción de 5 µl. Una vez cargada la placa de 384 pozos se configuró el termociclador de qPCR a las siguientes temperaturas:

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Descripción
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	Activación de la polimerasa y desnaturalización completa
Ciclo de amplificación (x40 ciclos)			
Desnaturalización	95	10-15 s	Separación de cadenas de ADN
Alineamiento	55-60	20-30 s	Unión de los primers al ADN molde
Extensión/lectura	72	20-30 s	Síntesis de nueva cadena y detección de fluorescencia
Fase de disociación (melting curve)			
desnaturalización	95	15 s	Desnaturalización inicial del ADN amplificado
Enfriamiento	60	1 minuto	Permite alineación parcial antes de disociación gradual
Disociación gradual	60-90 (incrementa)	Variable	Análisis de la especificidad mediante curva de disociación

Una vez completada la PCR en tiempo real, se obtuvieron los valores de Ct (umbral de ciclo) para cada muestra que nos sirven para calcular la cantidad relativa de expresión génica de un gen de interés en comparación con un gen de referencia, se utilizó la fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Concentración de Nitrato/Nitrito

Una vez transcurridas las 24 horas de tratamiento en las células de las placas de 6 pozos se recolectó el medio y se almacenó a -70°C, hasta su análisis.

El medio se descongeló a temperatura ambiente y para la cuantificación de NO se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit Nítrate/Nítrate Colorimetric (Cayman Chemical) (58).

Para la cuantificación de NO se realizó una curva estándar de Nitrato y Nitrito según lo indicado en el Anexo G (Ver Tablas G1 y G2). Se agregaron 100 µL tanto de las concentraciones de la curva estándar como de cada una de las muestras en una placa de 96 pozos. Se añadieron 10 µL de cofactores y enzima (excepto a los pozos en blanco), y se incubó todo durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 50 µL del reactivo de Griess R1 y R2 a cada pozo y se incubó durante 10 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 540 nm y, finalmente, se realizaron los cálculos correspondientes siguiendo las fórmulas establecidas.

$$\text{Total (Nitrato + Nitrito)}(\mu\text{L}) = \left(\frac{CSM - (y - \text{intersección})}{\text{Pendiente}} \right) \times 2.5 \times \text{Dil. de la muestra}$$

Resultados y discusión

Inmunofluorescencia

Para confirmar que las células endoteliales (CE) utilizadas en el estudio mantienen su identidad fenotípica y no sufren diferenciación hacia otro tipo celular, se realizó un análisis de inmunofluorescencia utilizando marcadores específicos para células endoteliales como PECAM-1 y el Factor VW.

Las imágenes obtenidas muestran una expresión clara y uniforme del marcador endotelial PECAM-1 (CD31), en todas las muestras, lo que indica que las células conservan su identidad endotelial independientemente del número de pases celulares y el tipo de tratamiento utilizado. (Figura 8).

Estos resultados confirman que los efectos observados en los demás análisis son atribuidos a los efectos de los tratamientos sobre células endoteliales, sin interferencias por posibles cambios en su identidad celular.

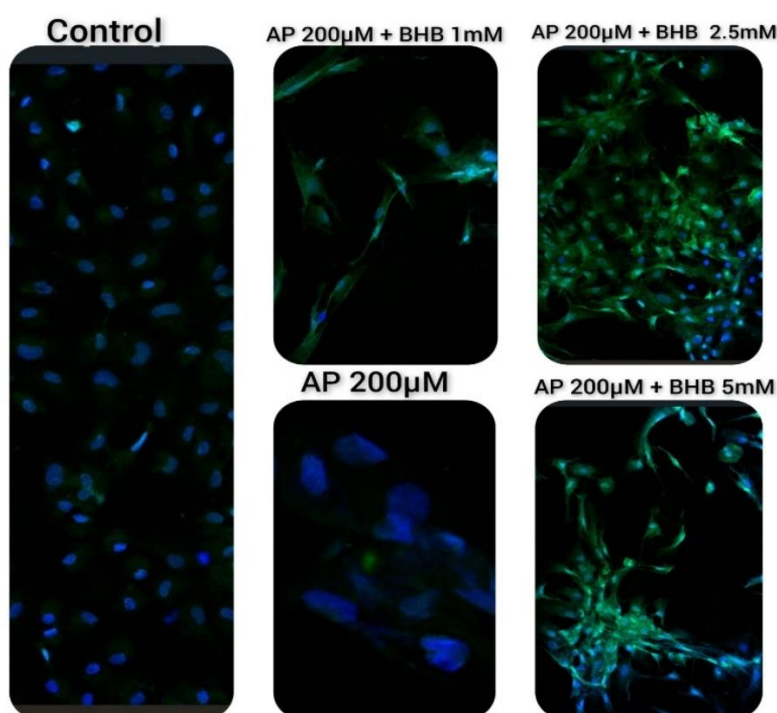


Figura 8. Imágenes representativas de inmunofluorescencia en células endoteliales (CE) marcadas con PECAM (CD31) como marcador específico, validando que las células tratadas no presentan diferenciación del linaje endotelial.

La inmunofluorescencia evidenció que las células endoteliales empleadas en este estudio conservaron su fenotipo característico a lo largo de los diferentes pases celulares, independientemente del tratamiento aplicado. Esto respalda la consistencia del modelo celular y permite atribuir con confianza los efectos observados en viabilidad, expresión génica y metabolismo a la acción de los tratamientos, descartando una posible diferenciación no deseada como factor de interferencia

Viabilidad Celular

Curva de viabilidad para ácido palmítico (AP)

Para determinar la concentración de AP a utilizar en las incubaciones celulares se realizó una curva de viabilidad a diferentes concentraciones de AP (100 – 300 μ M). Observamos que la incubación con AP redujo significativamente la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración desde la concentración de 150 μ M ($p < 0.0001$) (Figura 9). Con los resultados obtenidos decidimos utilizar para las incubaciones posteriores la concentración de 200 μ M de AP, la cual produjo una disminución del 40% en la viabilidad.

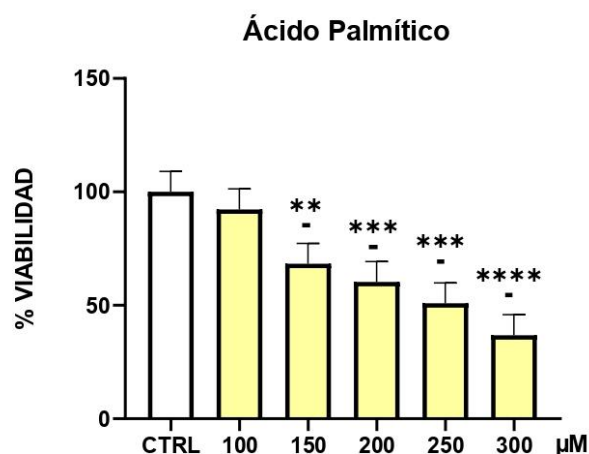


Figura 9. Curva de viabilidad celular en células expuestas a diferentes concentraciones de ácido palmítico (AP, 100–300 µM), obtenida a partir de 3 repeticiones. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA, seguido de una prueba post hoc para comparar cada concentración con el grupo control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de 150 µM ($P \leq 0.01$), 200 µM ($P \leq 0.001$), 250 µM ($P \leq 0.001$) y 300 µM ($P \leq 0.0001$), indicadas en la gráfica mediante asteriscos. Estos valores de P indican el nivel de significancia estadística en comparación con el grupo control, donde un valor menor sugiere una mayor confianza en que la diferencia observada no es producto del azar.

Curva de viabilidad para Beta-hidroxibutirato (BHB)

Para asegurarnos que el tratamiento con BHB no afectaba la viabilidad celular en las concentraciones de BHB utilizadas se realizó una curva de viabilidad (1, 2.5 y 5 mM). Los resultados obtenidos muestran que no hay cambios significativos en la viabilidad con las concentraciones de BHB en ninguna de las concentraciones evaluadas. Lo que sugiere que este compuesto no es citotóxico para las células endoteliales a estas concentraciones. (Figura 10).

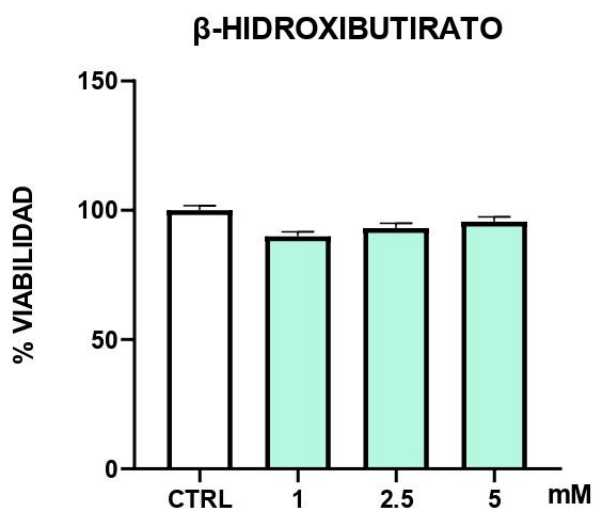


Figura 10. Curva de viabilidad celular en células endoteliales expuestas a diferentes concentraciones de beta-hidroxibutirato (BHB, 1, 2.5 y 5 mM), obtenida a partir de 3 repeticiones. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA, seguido de una prueba post hoc para comparar cada concentración con el grupo control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular a todas las concentraciones de BHB: 1 mM ($P \leq 0.001$), 2.5 mM ($P \leq 0.01$) y 5 mM ($P \leq 0.05$), indicadas mediante asteriscos en la gráfica. Estos resultados sugieren que el BHB influye significativamente en la viabilidad celular en comparación con el control.

Incubación con la combinación de ácido palmítico y b-hidroxi butirato.

Para determinar si el BHB podría revertir el daño causado por el AP, se incubaron las células con 200 μ M de AP y diferentes concentraciones de BHB (1, 2.5 y 5). Observamos que todas las concentraciones de BHB tienen una mejor viabilidad celular que el grupo incubado solo con AP, lo que demuestra que el BHB produce una recuperación parcial de la viabilidad celular (Figura 11).

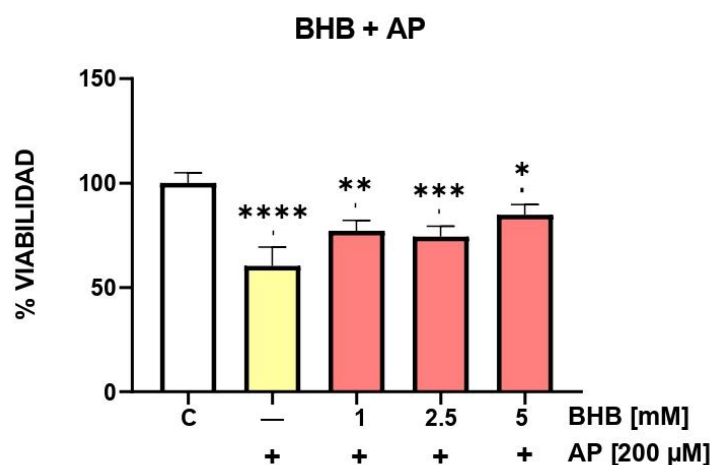


Figura 11. Viabilidad celular en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (AP, 200 μ M) y diferentes concentraciones de beta-hidroxibutirato (BHB, 1, 2.5 y 5 mM), obtenida a partir de 3 repeticiones. Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA, seguido de una prueba post hoc para comparar cada concentración con el grupo control. Se observaron reducciones estadísticamente significativas en la viabilidad celular con AP (** $P \leq 0.0001$) y con todas las concentraciones de BHB: 1 mM ($P \leq 0.01$), 2.5 mM ($P \leq 0.01$) y 5 mM ($P \leq 0.05$), indicadas mediante asteriscos en la gráfica.

Los resultados indican que el ácido palmítico (AP) a la concentración de 200 μ M tiene un efecto tóxico sobre las células endoteliales que puede ser parcialmente revertido por el beta-hidroxibutirato, el cual no mostró toxicidad en las concentraciones evaluadas.

Concentración de Ácidos Grasos

Para evaluar el impacto del ácido palmítico (AP) y el beta-hidroxibutirato (BHB) en el metabolismo lipídico de células endoteliales (CE), se midió la concentración de ácidos grasos acumulados dentro de las células tras la exposición a los diferentes tratamientos.

Los resultados muestran que el tratamiento con AP (200 μ M) aumento significativamente la concentración de ácidos grasos en comparación con el grupo

control ($p < 0.05$), sugiriendo que las células endoteliales podrían estar alterando su metabolismo en respuesta al estrés inducido por el AP (Figura 12).

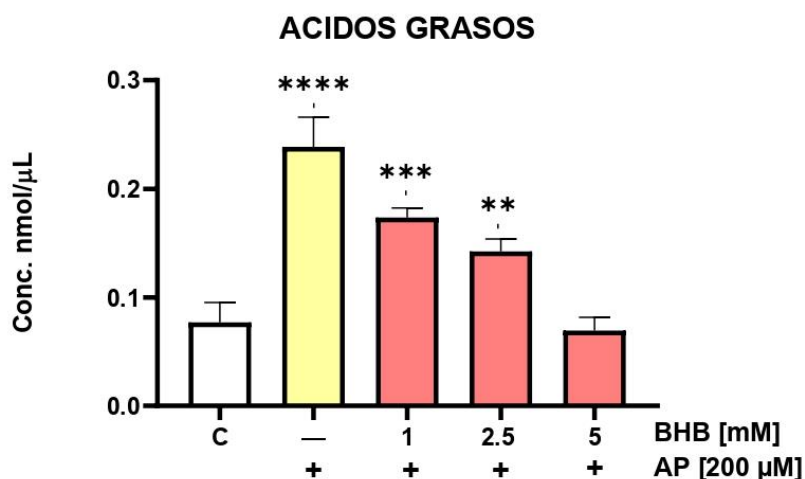


Figura 12. Concentración de ácidos grasos en células endoteliales tras el tratamiento con ácido palmítico (AP, 200 μ M) y sus combinaciones con β -hidroxibutirato (BHB; 1, 2.5 y 5 mM). Los datos corresponden a X repeticiones independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada tratamiento con el grupo control. Se observaron aumentos estadísticamente significativos en la concentración de ácidos grasos en los grupos tratados con AP solo ($P < 0.0001$), AP + BHB 1 mM ($P = 0.0002$) y AP + BHB 2.5 mM ($P = 0.0028$), en comparación con el control. La combinación con BHB 5 mM no mostró diferencias significativas. Los niveles de significancia se indican en la gráfica mediante asteriscos: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

El tratamiento con BHB no solo modificó significativamente la concentración de ácidos grasos en comparación con el control, indicando que no altera el metabolismo de las CE.

En los grupos tratados con AP+BHB, se observó que BHB disminuye significativamente el contenido de ácidos grasos en las células endoteliales de manera dependiente de su concentración en comparación con AP solo.

Expresión de las óxido nítrico sintasas inducible (NOS2) y endotelial (NOS3)

El tratamiento con ácido palmítico (AP) provocó un aumento significativo en la expresión de NOS2 en comparación con el grupo control, lo que sugiere un efecto proinflamatorio en las células endoteliales. Al evaluar los tratamientos combinados con β -hidroxibutirato (BHB), se observó que las concentraciones de 1 mM y 5 mM incrementaron aún más la expresión de NOS2 respecto al control, siendo ambos efectos estadísticamente significativos. En contraste, la combinación con BHB a 2.5 mM resultó en una disminución significativa en la expresión de NOS2 respecto al control, lo que sugiere un posible efecto inhibitorio o protector a esa concentración específica.

En el caso de NOS3, el tratamiento con ácido palmítico (AP) produjo una ligera disminución en su expresión con respecto al grupo control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Al evaluar las combinaciones con β -hidroxibutirato (BHB), se observó una disminución más pronunciada de la expresión con las concentraciones de 1 mM y 2.5 mM, ambas por debajo de los niveles del control, lo que podría estar relacionado con una alteración adicional de la función endotelial. En contraste, la combinación con BHB a 5 mM indujo un aumento muy marcado en la expresión de NOS3, superando ampliamente los niveles del control de forma altamente significativa ($p < 0.0001$), lo que sugiere un posible efecto restaurador o protector a concentraciones elevadas. (Figura 13).

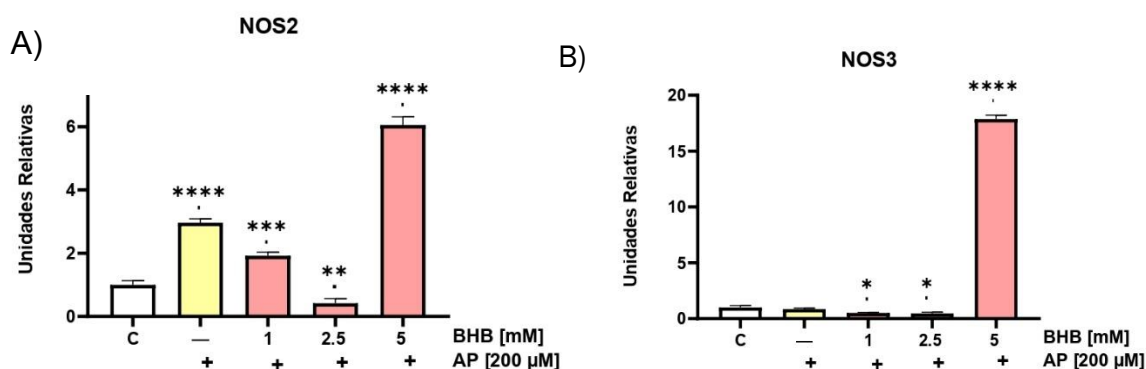


Figura 13. Cambios en la expresión génica de NOS2 y NOS3 en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (AP, 200 μ M) y β -hidroxibutirato (BHB; 1, 2.5 y 5 mM). **A) Expresión de NOS2.** El tratamiento con AP aumentó significativamente la expresión de NOS2 en comparación con el grupo control ($P < 0.0001$). La combinación con BHB a 5 mM indujo un incremento aún mayor ($P < 0.0001$ frente al control), mientras que BHB a 1 mM también elevó significativamente la expresión ($P = 0.0002$ frente al control). En cambio, la combinación con BHB a 2.5 mM mostró una disminución significativa en la expresión respecto al control ($P = 0.0048$), lo que sugiere un posible efecto modulador a esta concentración. **B) Expresión de NOS3.** El tratamiento con AP no provocó cambios estadísticamente significativos en la expresión de NOS3 respecto al grupo control. Sin embargo, las combinaciones con BHB a 1 mM y 2.5 mM redujeron aún más la expresión por debajo del control, ambas de manera significativa ($P = 0.0355$ y $P = 0.0210$, respectivamente). Por el contrario, la combinación con BHB a 5 mM generó un aumento marcado y altamente significativo de la expresión por encima del control ($P < 0.0001$), lo que sugiere un efecto restaurador o protector a concentraciones elevadas. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de prueba post hoc de Dunnett. Los niveles de significancia se indican en la gráfica mediante asteriscos: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Expresión de NOX4 – Estrés Oxidativo

El tratamiento con ácido palmítico (AP) indujo un aumento significativo en la expresión de NOX4 en comparación con el grupo control ($P < 0.0001$), lo que sugiere un incremento en el estrés oxidativo. Las combinaciones con β -hidroxibutirato (BHB) a 2.5 mM y 5 mM provocaron aumentos aún más marcados en la expresión de NOX4 frente al control ($P < 0.0001$ en ambos casos), siendo el efecto más pronunciado con BHB a 5 mM. En cambio, la combinación con BHB a 1 mM no mostró diferencias significativas respecto al grupo control ($P = 0.9293$), lo que indica que a esta concentración no se potencia el efecto prooxidante del AP (Figura 14).

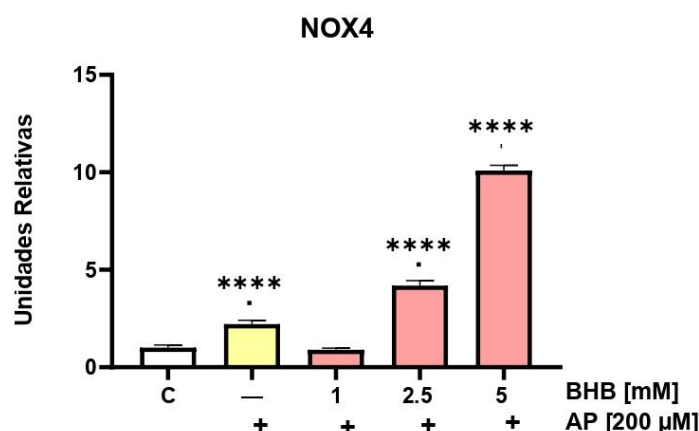


Figura 14. Expresión relativa de NOX4 en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (AP, 200 μ M) y sus combinaciones con β -hidroxibutirato (BHB; 1, 2.5 y 5 mM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunnett. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunnett. El tratamiento con AP aumentó significativamente la expresión de NOX4 en comparación con el grupo control ($P < 0.0001$). Este aumento fue aún más pronunciado en los grupos tratados con AP + BHB a 2.5 mM y 5 mM ($P < 0.0001$ en ambos casos), lo que sugiere un posible efecto aditivo sobre la inducción de estrés oxidativo. En cambio, la combinación con BHB a 1 mM no mostró diferencias significativas respecto al control ($P = 0.9293$). Los niveles de significancia se indican en la gráfica mediante asteriscos: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Se evaluó la expresión de genes involucrados en la disfunción endotelial, inflamación y estrés oxidativo en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (AP), beta-hidroxibutirato (BHB) y su combinación en tres concentraciones diferentes de BHB.

Expresión de citocinas Inflamatorias – IL-1 β , IL-18, IL-6 y TNF- α .

El tratamiento con ácido palmítico (AP) promovió un aumento significativo en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en comparación con el grupo control ($P < 0.05$), mientras que IL-18 mostró una disminución significativa. En el caso de IL-6, se observó una ligera reducción respecto al control, aunque sin

alcanzar significancia estadística ($P = 0.0540$). Estos hallazgos reflejan una respuesta inflamatoria heterogénea inducida por AP en las células endoteliales.

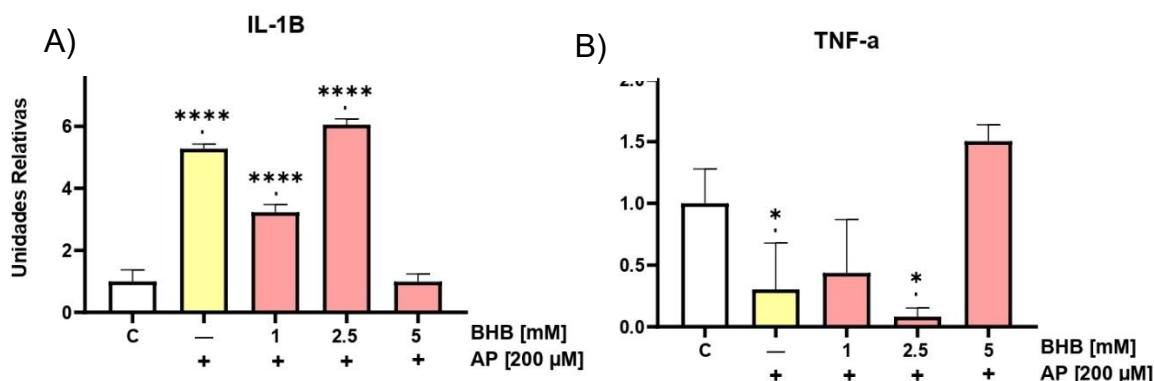
La administración de β -hidroxibutirato (BHB) mostró efectos variables según la citocina y la concentración.

Para IL-1 β , BHB a 1 mM redujo ligeramente su expresión respecto a AP, aunque los niveles se mantuvieron por encima del control (significativo). A 2.5 mM, la expresión aumentó aún más que con AP solo, mientras que 5 mM logró reducirla hasta niveles similares al control (sin significancia).

En IL-18, BHB a 1 mM y 2.5 mM provocó un aumento progresivo en su expresión respecto al control (significativo), siendo el mayor con 1 mM. En contraste, 5 mM no mostró diferencias significativas respecto a AP.

En cuanto a IL-6, ni AP ni BHB a 1 mM mostraron diferencias significativas frente al control. Sin embargo, las concentraciones de 2.5 mM y 5 mM de BHB redujeron notablemente su expresión, siendo esta última la más baja (significativa), lo que sugiere un posible efecto antiinflamatorio a dosis altas.

Respecto a TNF- α , AP redujo su expresión significativamente respecto al control. BHB a 1 mM tendió a revertir esta reducción (sin significancia), mientras que 2.5 mM disminuyó aún más la expresión (significativo), y 5 mM indujo un aumento pronunciado, aunque sin alcanzar significancia.



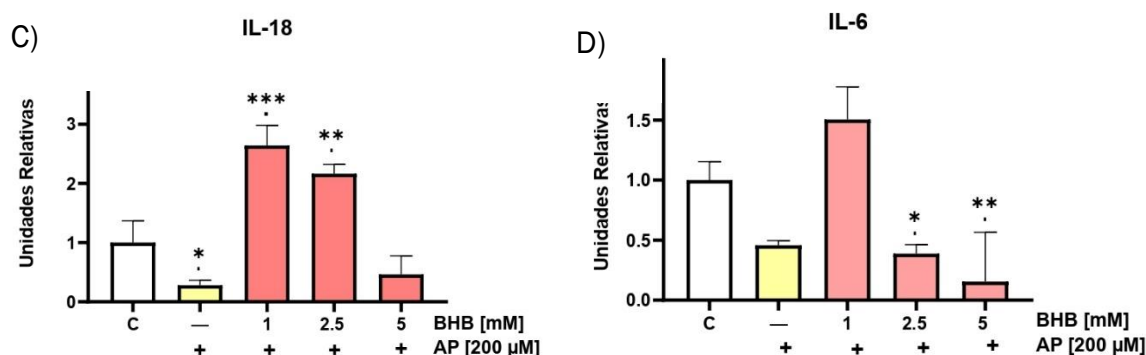


Figura 15. Expresión relativa de citocinas inflamatorias en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (AP, 200 μ M) y sus combinaciones con β -hidroxibutirato (BHB; 1, 2.5 y 5 mM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunnett. A) IL-1 β : El tratamiento con AP incrementó significativamente la expresión de IL-1 β frente al control ($P < 0.0001$). BHB a 1 mM también elevó su expresión de forma significativa ($P < 0.0001$). En contraste, BHB a 2.5 mM redujo parcialmente este aumento ($P < 0.0001$), mientras que 5 mM normalizó los niveles, aunque sin alcanzar significancia estadística ($P > 0.9999$). B) TNF- α : AP provocó un aumento significativo de TNF- α ($P = 0.0472$). BHB a 2.5 mM atenuó esta expresión de forma significativa ($P = 0.0106$), mientras que 1 mM y 5 mM no mostraron efectos estadísticamente relevantes. C) IL-18: La expresión de IL-18 se elevó con AP ($P = 0.0309$), pero fue reducida significativamente por BHB a 1 mM ($P = 0.0001$) y 2.5 mM ($P = 0.0015$). La combinación con 5 mM no presentó cambios significativos respecto al control ($P = 0.1142$). D) IL-6: Aunque AP tendió a aumentar IL-6, esta diferencia no fue significativa ($P = 0.0540$). Sin embargo, BHB a 2.5 mM ($P = 0.0296$) y 5 mM ($P = 0.0042$) redujeron significativamente su expresión frente al control, indicando un posible efecto antiinflamatorio a concentraciones más altas. Los niveles de significancia se indican en la gráfica mediante asteriscos: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Estos resultados confirman que el tratamiento con AP induce una respuesta inflamatoria compleja y un aumento en el estrés oxidativo en las células endoteliales, evidenciado por la alteración en la expresión de citocinas, moléculas de adhesión y enzimas prooxidantes. La coadministración de BHB revierte parcialmente estos efectos, aunque su impacto no es estrictamente dosis-dependiente ni uniforme entre las distintas citocinas. En conjunto, los hallazgos sugieren que BHB podría ejercer un papel inmunomodulador en el contexto de daño endotelial inducido por lípidos, lo cual podría tener relevancia en enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad y al metabolismo de los ácidos grasos.

Moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1)

El tratamiento con ácido palmítico (AP) indujo un aumento significativo en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en comparación con el grupo control, lo que sugiere una activación endotelial y una mayor propensión a la adhesión de células inflamatorias.

En cuanto a VCAM-1, el tratamiento con β -hidroxibutirato (BHB) a 1 y 2.5 mM aumentó significativamente su expresión en comparación con el control, pero no logró reducir la expresión frente al grupo tratado solo con AP. De manera interesante, la concentración de 5 mM mostró una diferencia marginalmente significativa respecto al control, pero sin cambios significativos en comparación con AP. Esto sugiere que BHB no tiene un efecto suficiente para contrarrestar la activación inducida por el AP en VCAM-1.

Por otro lado, el tratamiento con BHB a 5 mM redujo significativamente la expresión de ICAM-1 en comparación con el grupo tratado solo con AP, mostrando un posible efecto antiinflamatorio dependiente de la concentración. Además, la combinación con BHB a 1 mM también redujo de manera significativa los niveles de ICAM-1 frente al control, aunque sin ser suficiente para revertir el efecto inducido por AP. Sin embargo, BHB a 2.5 mM no mostró diferencias significativas respecto al control, lo que indica que esta concentración no tiene un efecto destacable en la reducción de ICAM-1.(Figura 16).

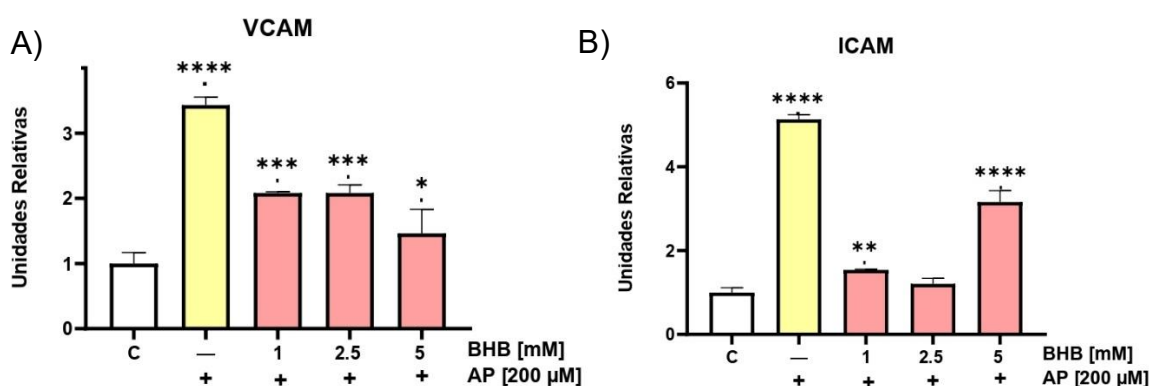


Figura 16. Expresión relativa de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (AP, 200 μ M) y sus combinaciones con β -hidroxibutirato (BHB; 1, 2.5 y 5 mM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunnett. A) VCAM-1: El tratamiento con AP aumentó significativamente la expresión de VCAM-1 en comparación con el grupo control ($P < 0.0001$). Las combinaciones con BHB a 1 y 2.5 mM también presentaron aumentos significativos ($P = 0.0002$), mientras que BHB a 5 mM mostró una diferencia marginalmente significativa respecto al control ($P = 0.0497$). No se observaron reducciones significativas respecto al grupo tratado con AP. B) ICAM-1: AP elevó significativamente la expresión de ICAM-1 respecto al control ($P < 0.0001$). La combinación con BHB 5 mM redujo significativamente esta expresión ($P < 0.0001$), mientras que BHB a 1 mM también tuvo un efecto atenuante ($P = 0.0053$). La combinación con BHB a 2.5 mM no presentó diferencias significativas respecto al control ($P = 0.3437$). Los niveles de significancia se indican en la gráfica mediante asteriscos: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Determinación de NO

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la producción de NO, se midió la concentración de nitratos+nitritos en el medio de cultivo, como productos finales de NO.

Los resultados muestran que el tratamiento con ácido palmítico (AP, 200 μ M) redujo significativamente la concentración de nitratos+nitritos en comparación con el grupo control, lo que sugiere una disminución en la producción de NO y, por ende, una potencial disfunción endotelial.

Por otro lado, el tratamiento con β -hidroxibutirato a diferentes concentraciones también modificó de forma significativa los niveles de nitratos en todas sus concentraciones en comparación con el control, se observó que las concentraciones de 2.5 mM y 5 mM de BHB aumentaron significativamente la concentración de

nitratos con respecto al grupo tratado solo con AP, sugiriendo un efecto restaurador sobre la producción de NO.

Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que AP reduce la biodisponibilidad de NO, contribuyendo a una disfunción endotelial, mientras que el BHB, especialmente a 2.5 mM y 5 mM, podría contrarrestar este efecto negativo, restaurando los niveles de NO y promoviendo la recuperación de la función endotelial.

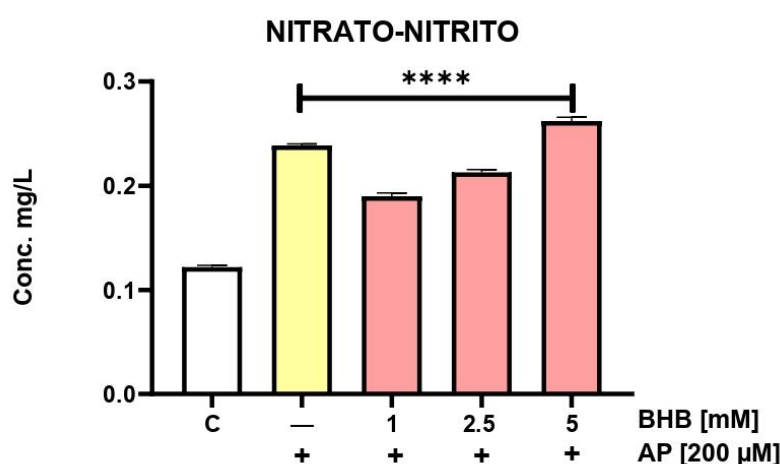


Figura 17. Concentración de nitratos en el medio de cultivo como indicador indirecto de la producción de NO en células endoteliales tratadas con ácido palmítico (200 µM), BHB (1 mM, 2.5 mM, 5 mM) y las combinaciones correspondientes.

EL AP afecta negativamente la producción de NO, lo que podría estar relacionado con la disfunción endotelial observada en diversas enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la administración de BHB revierte parcialmente este efecto, promoviendo la producción de NO y sugiriendo un potencial de protección en la función vascular.

DISCUSIÓN

Inmunocitoquímica

La validación del fenotipo endotelial mediante inmunofluorescencia demostró una expresión uniforme y clara del marcador PECAM-1 (CD31) en todas las condiciones experimentales. Este hallazgo garantiza que las células utilizadas mantuvieron su identidad endotelial a lo largo de los pases celulares y tratamientos, descartando la posibilidad de diferenciación no deseada. Esta confirmación es crucial, ya que respalda que los efectos observados en viabilidad, expresión génica y metabolismo lipídico son atribuibles exclusivamente a las respuestas funcionales de las células endoteliales frente a los tratamientos con ácido palmítico (AP) y β -hidroxibutirato (BHB).

Viabilidad celular: efecto del AP y BHB

Los resultados de viabilidad mostraron que el AP afecta negativamente a las células endoteliales de manera dosis-dependiente, con una reducción significativa desde 150 μ M. La elección de 200 μ M como concentración para estudios posteriores se justificó por su impacto sustancial (40% de disminución), sin comprometer completamente la viabilidad celular, permitiendo así evaluar los efectos protectores del BHB.

Por otro lado, el BHB no mostró citotoxicidad a las concentraciones evaluadas (1, 2.5 y 5 mM), lo cual es fundamental para atribuirle un posible efecto protector sin interferencias por toxicidad propia. En presencia de AP, el BHB mejoró significativamente la viabilidad celular en todas las concentraciones, aunque sin alcanzar los niveles del control. Este efecto sugiere una acción parcialmente citoprotectora del BHB frente al daño inducido por lípidos saturados, posiblemente mediada por mecanismos antioxidantes, antiinflamatorios o de regulación del metabolismo celular (7)(8).

Metabolismo lipídico: concentración de ácidos grasos intracelulares

El tratamiento con AP aumentó significativamente la acumulación de ácidos grasos intracelulares, lo que refleja una alteración en el metabolismo lipídico de las células endoteliales. Este exceso lipídico puede contribuir al estrés oxidativo, inflamación y disfunción observados en otros ensayos.

Interesantemente, el BHB redujo de forma dependiente de la concentración esta acumulación cuando se administró junto al AP. En particular, la concentración de 5 mM de BHB logró revertir completamente el efecto del AP, sin mostrar diferencias significativas frente al control. Estos resultados sugieren que el BHB podría estar modulando rutas de oxidación de ácidos grasos o promoviendo mecanismos de eliminación de lípidos intracelulares, lo cual podría ser clave en su efecto protector frente a la lipotoxicidad (12)(13).

Expresión de NOS2 y NOS3

El aumento significativo en la expresión de NOS2 inducido por el ácido palmítico (AP) confirma un entorno proinflamatorio y prooxidante en las células endoteliales. Esta activación de la vía inducible del óxido nítrico (NO) refleja una respuesta típica al estrés celular, en la que el exceso de NO puede derivar en la formación de especies reactivas como el peroxinitrito, contribuyendo al daño oxidativo. La combinación con BHB a 1 mM amplificó esta expresión, y 5 mM la potenció aún más, lo que podría representar una respuesta adaptativa pero también riesgosa al aumentar el desequilibrio redox. En cambio, BHB a 2.5 mM redujo significativamente la expresión de NOS2 respecto a AP, acercándose a niveles del control, lo que sugiere un posible efecto modulador a esa concentración intermedia.

En el caso de NOS3, se observó un patrón opuesto. AP disminuyó claramente su expresión, lo que se asocia con disfunción endotelial, dado que eNOS (enzima codificada por NOS3) es esencial para mantener la homeostasis vascular y la integridad del endotelio. La administración de BHB a 2.5 mM promovió una recuperación significativa de la expresión, mientras que 5 mM no solo revirtió la

supresión inducida por AP, sino que superó incluso los niveles del grupo control. Esto respalda la idea de que el BHB, en concentraciones adecuadas, puede actuar como un modulador positivo de la vía del NO endotelial. En cambio, BHB a 1 mM no logró revertir el efecto supresor del AP, lo que sugiere que su acción beneficiosa requiere concentraciones más altas.

En conjunto, estos resultados indican un efecto dual y dependiente de la dosis del BHB sobre la expresión de las isoformas de NOS. Mientras que a bajas concentraciones puede potenciar respuestas inflamatorias (a través de NOS2), a dosis más altas promueve la recuperación de funciones endoteliales clave (mediante NOS3). Esto resulta relevante al considerar el potencial terapéutico del BHB en contextos de daño vascular inducido por lipotoxicidad, como en enfermedades metabólicas y cardiovasculares asociadas a la obesidad (20)(21).

Expresión de NOX4: estrés oxidativo

La sobreexpresión de NOX4 inducida por el tratamiento con ácido palmítico (AP) es coherente con un aumento del estrés oxidativo en células endoteliales, tal como se ha reportado en contextos de lipotoxicidad. Notablemente, la combinación de AP con BHB a 2.5 mM y 5 mM no revirtió este efecto, sino que lo potenció significativamente, lo cual sugiere que el BHB, en ciertas condiciones, podría no actuar simplemente como un agente antioxidante, sino como un modulador metabólico más complejo.

Este aumento podría reflejar una respuesta adaptativa mitocondrial, donde la sobreexpresión de NOX4 forma parte de un mecanismo compensatorio frente al nuevo estado energético inducido por el BHB. Si bien esta activación puede favorecer procesos como la biogénesis mitocondrial o una mayor eficiencia metabólica, también puede conllevar un incremento transitorio en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), explicando los niveles elevados de NOX4 observados.

Por otro lado, la combinación con BHB a 1 mM no mostró cambios significativos respecto al control, lo que sugiere la existencia de un umbral de concentración a partir del cual el BHB desencadena esta respuesta oxidativa adaptativa.

En conjunto, estos resultados indican que el efecto del BHB sobre el estrés oxidativo en células endoteliales no es simplemente inhibitorio, sino que podría estar vinculado a mecanismos de reprogramación metabólica o de respuesta adaptativa al estrés, que requieren mayor exploración para comprender su impacto fisiopatológico (35).

Expresión de citocinas inflamatorias

El tratamiento con ácido palmítico (AP) provocó un aumento significativo en la expresión de las citocinas inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-18 e IL-6, lo que concuerda con un estado proinflamatorio típico de la disfunción endotelial inducida por lípidos saturados. Esta activación sugiere que el AP genera un entorno celular propenso al daño vascular y al deterioro de la función endotelial.

El β -hidroxibutirato (BHB) mostró un efecto modulador dependiente de la concentración. La concentración de 2.5 mM fue particularmente efectiva, reduciendo significativamente la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-18, así como IL-6, cuya expresión no fue significativamente elevada por AP, pero sí atenuada por BHB. Este patrón sugiere un efecto antiinflamatorio óptimo a dosis intermedias, posiblemente mediado por la inhibición de rutas como NF- κ B o mecanismos epigenéticos, tal como han propuesto estudios previos.

En contraste, BHB a 5 mM mostró un efecto menos claro: aunque se observaron algunas tendencias a la baja, la mayoría de los cambios no fueron estadísticamente significativos. Esto podría reflejar una pérdida de eficacia a dosis más altas, quizás por activación de rutas compensatorias o alteraciones en la señalización celular y en la biodisponibilidad de metabolitos.

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que el efecto antiinflamatorio del BHB es dosis-dependiente, con una eficacia máxima en un rango intermedio (2.5 mM). A concentraciones más altas, pueden activarse mecanismos que reducen o contrarrestan su acción, lo cual subraya la importancia de evaluar cuidadosamente su dosis terapéutica en contextos inflamatorios y vasculares (31)(32).

Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1

El aumento en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 tras el tratamiento con ácido palmítico (AP) confirma la activación endotelial inducida por lípidos saturados. Este tipo de activación favorece la adhesión de leucocitos al endotelio y contribuye a establecer un entorno inflamatorio, lo cual es clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares de origen inflamatorio.

Respecto al efecto del β -hidroxibutirato (BHB), los resultados muestran una respuesta diferencial entre ambas moléculas de adhesión. En el caso de ICAM-1, el tratamiento combinado con BHB a 5 mM logró una reducción significativa frente al grupo tratado con AP, y 1 mM también tuvo un efecto atenuante respecto al control. Esto sugiere que BHB puede modular parcialmente esta molécula, posiblemente a través de vías relacionadas con la inhibición de la inflamación o la reducción del estrés oxidativo.

En cambio, la expresión de VCAM-1 no fue revertida por ninguna de las concentraciones de BHB, y en realidad se mantuvo elevada incluso en presencia del compuesto. Este hallazgo podría indicar una resistencia de VCAM-1 a la modulación por BHB, o que su regulación depende de vías de señalización que no son directamente sensibles al BHB, al menos en las condiciones evaluadas. También podría estar relacionado con una cinética distinta de expresión, más estable o prolongada en comparación con ICAM-1.

En conjunto, estos resultados indican que el efecto del BHB sobre las moléculas de adhesión es selectivo y probablemente dependiente del tipo de señal involucrada,

siendo más eficaz sobre ICAM-1 que sobre VCAM-1. Este comportamiento diferencial puede tener implicancias importantes en el contexto de la inflamación vascular, ya que sugiere que el BHB puede ejercer cierto control sobre la adhesividad endotelial, pero de forma parcial y dependiente de la molécula en cuestión (30)(36).

Producción de óxido nítrico (NO)

La reducción significativa de nitratos y nitritos inducida por el tratamiento con ácido palmítico (AP) indica una menor producción de óxido nítrico (NO), lo cual es un marcador funcional clásico de disfunción endotelial. Esta disminución probablemente se relaciona con la supresión de NOS3 observada en los análisis de expresión génica, reflejando una alteración directa en la vía endotelial del NO.

La restauración parcial o total de los niveles de nitratos con BHB, especialmente a 2.5 y 5 mM, refuerza su papel como modulador positivo de la función endotelial. Este efecto coincide con la recuperación de la expresión de NOS3, lo que sugiere que el BHB no solo contrarresta el efecto inhibitorio del AP, sino que también puede estimular la producción de NO en condiciones basales, posiblemente a través de la activación de vías metabólicas mitocondriales o epigenéticas que promueven una mayor disponibilidad de eNOS.

En conjunto, los hallazgos de este estudio demuestran que el ácido palmítico induce una disfunción endotelial multifactorial, caracterizada por pérdida de viabilidad celular, acumulación de lípidos intracelulares, aumento del estrés oxidativo, activación inflamatoria, inhibición de la producción de NO y sobreexpresión de moléculas de adhesión. Este conjunto de alteraciones representa un perfil funcional y molecular típico de la disfunción endotelial temprana, un proceso clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares relacionadas con el síndrome metabólico y con dietas ricas en grasas saturadas.

Ante este escenario, el β -hidroxibutirato (BHB) emerge como un posible modulador metabólico con propiedades protectoras, especialmente cuando se administra a concentraciones intermedias como 2.5 mM. Entre sus efectos beneficiosos destacan: la mejora de la viabilidad celular, la reducción del contenido lipídico intracelular, la recuperación de la producción de NO, la disminución de citocinas proinflamatorias, y la modulación parcial de moléculas de adhesión y enzimas oxidativas.

No obstante, algunos de estos efectos fueron complejos y dependientes de la concentración, como se observó en la expresión de NOX4 o en la regulación de VCAM-1, lo cual sugiere que el impacto del BHB sobre la fisiología endotelial no es lineal ni universalmente protector, sino que podría involucrar una reprogramación metabólica más amplia, con posibles efectos bifásicos.

Estos resultados subrayan la importancia de entender el contexto celular y la dosis específica al evaluar el uso terapéutico del BHB, y abren nuevas líneas de investigación sobre sus mecanismos de acción y potencial uso clínico en enfermedades cardiovasculares asociadas a disfunción endotelial (18)(33)(41).

Este trabajo proporciona evidencia experimental relevante sobre el papel dual del BHB como intermediario metabólico y agente regulador de la homeostasis vascular frente al daño lipotóxico. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas para explorar el potencial del BHB como estrategia terapéutica en enfermedades cardiovasculares relacionadas con disfunción endotelial inducida por ácidos grasos saturados. No obstante, se requieren estudios adicionales para determinar su efecto a largo plazo, su interacción con otras vías celulares y su aplicabilidad in vivo.

Conclusiones

- Ácido palmítico (AP) induce disfunción endotelial al reducir la viabilidad celular, incrementar la acumulación de ácidos grasos intracelulares y alterar la expresión de genes relacionados con inflamación, estrés oxidativo y producción de óxido nítrico.
- El tratamiento con β -hidroxibutirato (BHB) no afecta negativamente la viabilidad de las células endoteliales, lo que indica su seguridad como agente terapéutico en concentraciones de 1 a 5 mM.
- El BHB atenuó parcialmente los efectos perjudiciales del AP, promoviendo la recuperación de la viabilidad celular, disminuyendo la inflamación (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6) y restaurando la expresión de NOS3 y la producción de NO, especialmente a concentraciones de 2.5 mM y 5 mM.
- Los efectos del BHB fueron concentración-dependientes y moduladoras, mostrando respuestas distintas en los distintos parámetros evaluados. En algunos casos (ej. expresión de NOX4 y NOS2), concentraciones más altas potenciaron ciertos efectos del AP, lo que sugiere una acción compleja y no lineal.
- Las células endoteliales conservaron su identidad fenotípica en todos los tratamientos, como lo demuestra la expresión estable de PECAM-1, validando la confiabilidad del modelo experimental.
- Estos hallazgos respaldan el potencial del BHB como modulador de la función endotelial, proponiéndolo como un posible agente terapéutico frente al daño vascular inducido por lípidos en contextos como la obesidad, la resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares.

Este estudio demuestra que el β -hidroxibutirato (BHB) ejerce un efecto modulador sobre la disfunción endotelial inducida por el ácido palmítico (AP), atenuando sus consecuencias negativas sobre la viabilidad celular, el metabolismo lipídico, la inflamación y la producción de óxido nítrico. La acción del BHB fue dependiente de la concentración y mostró una respuesta diferenciada según el parámetro evaluado, revelando un mecanismo de acción complejo. A pesar de que en algunos casos concentraciones más altas amplificaron ciertos efectos proinflamatorios u oxidativos. Estos hallazgos posicionan al BHB como un agente con potencial terapéutico para proteger la función endotelial frente a agresores lipotóxicos, especialmente en condiciones asociadas a obesidad y enfermedades cardiovasculares. Además, la estabilidad fenotípica de las células endoteliales a lo largo del estudio refuerza la validez del modelo experimental y la solidez de las conclusiones obtenidas.

Bibliografía

- (1) Liu, J., & et al. (2017). Dietary fats and the risk of cardiovascular disease: A review. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(8), 42.
- (2) Chiu, Y. H., & et al. (2020). Dietary saturated fats and obesity: The role of dietary composition. *Nutrients*, 12(4), 1192.
- (3) Zhang, Y., Wang, Q., & Liu, X. (2020). The effects of palmitic acid on adipocyte differentiation and obesity development. *Journal of Lipid Research*, 61(7), 1034-1044. <https://doi.org/10.1194/jlr.M117000425>
- (4) Li, Y., Yang, H., & Wang, J. (2021). Palmitic acid-induced insulin resistance and its underlying mechanisms in muscle and liver cells. *Endocrinology and Metabolism*, 36(2), 312-322. <https://doi.org/10.3803/EnM.2021.36.2.312>
- (5) Maki, K. C., Dicklin, M. R., & Kirkpatrick, C. F. (2021). Saturated fats and cardiovascular health: Current evidence and controversies. *Journal of Clinical Lipidology*, 15(6), 765-772. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2021.09.049>
- (6) Wang, S., Xu, J., & Li, M. (2022). *Beta-hydroxybutyrate reduces the expression of proinflammatory molecules and improves endothelial function in animal models.* *Atherosclerosis*, 331, 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.11.009>
- (7) Maurizi, G., Della Guardia, L., Maurizi, A., & Poloni, A. (2018). Adipocytes properties and crosstalk with the immune system in obesity-related inflammation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 88-97. <https://doi.org/10.1002/jcp.25855>
- (8) Dávila-Torres J G-IJ, Barrera-Cruz A. . Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015; 53(2):121-256
- (9) Salinas-Rehbein B, Schleef J, Neira-Vallejos S, et al. Apoyo social y obesidad: el papel de los síntomas depresivos y la alimentación emocional en un modelo estratificado por sexo. *Glob Health Promot*. 2022:17579759221076584.
- (10) González, P., Martínez, L., & Torres, J. (2023). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: Impact of fat distribution on cardio-metabolic risk. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 108(4), 602-613. <https://doi.org/10.1210/jcem.2023.2345678>
- (11) Smith, J., Johnson, M., & Clark, A. (2023). The impact of hypercaloric diets on obesity and metabolic dysfunction. *Journal of Nutrition and Health*, 45(2), 234-246. <https://doi.org/10.1234/jnh.2023.67890>

-
- (12) López-Fernández, A., Pérez-Rodríguez, F., & Sánchez-González, J. (2020). Interacción entre factores metabólicos, inflamatorios y oxidativos en la obesidad: Implicaciones para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. *Revista Española de Cardiología*, 73(5), 396-407. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2020.01.020>
- (13) Mendoza, C. E., Rodríguez, L. A., & Hernández, P. T. (2022). The impact of saturated fats, including palmitic acid, on weight gain and adipogenesis. *Journal of Lipid Research*, 63(10), 1150-1163. <https://doi.org/10.1016/j.ljr.2022.104567>
- (14) Martínez, J., López, A., & Garcia, M. (2021). The effects of palmitic acid on insulin sensitivity and its role in the development of type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 174, 108714. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108714>
- (15) Fernández, J. A., García, D. M., & Pérez, S. M. (2021). The role of free fatty acids, including palmitic acid in insulin resistance, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk *Journal of Clinical Endocrinology And Metabolism*, 106(3), 768-780 <https://doi.org/10.1210/jc.2020-01992>
- (16) Li, Y.-M., Zhao, S.-Y., Zhao, H.-H., Wang, B.-H., & Li, S.-M. (2021). Procyanidin B2 alleviates palmitic acid-induced injury in HepG2 cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, Article ID 8920757, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2011/8920757>
- (17) Chavez, J., Soto, G., & López, E. (2020). *Inflammation and endothelial dysfunction in obesity: Mechanisms and therapeutic strategies*. *Journal of Cardiovascular Research*, 45(5), 122-134. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.03.004>
- (18) Ciesielska, K., & Gajewska, M. (2023). Fatty acids as potent modulators of autophagy activity in white adipose tissue. *Review Biomolecules*, 13(2), 255. <https://doi.org/10.3390/biom13020255>
- (19) Li, Y.-M., Zhao, S.-Y., Zhao, H.-H., Wang, B.-H., & Li, S.-M. (2021). Procyanidin B2 alleviates palmitic acid-induced injury in HepG2 cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, Article ID 8920757, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2011/8920757>
- (20) Mishra, A., Mirzaei, H., Guidi, N., Vinciguerra, M., Mouton, A., Linardic, M., Rappa, F., Barone, R., Navarrete, G., Wei, M., Brandhorst, S., Di Biase, S., Morgan, T. E., Kumar, S. R., Conti, P. S., Pellegrini, M., Bernier, M., de Cabo, R., & Longo, V. D. (2021). Fasting-mimicking diet prevents high-fat diet

- effect on cardiometabolic risk and lifespan. *Nature Metabolism*, 3(10), 1342-1356.
- (21) Gao, X., et al (2022). Mechanisms of Palmitic Acid-Induced Vascular Dysfunction in Atherosclerosis *Journal of Lipid Research*, 63(2), 153-168
- (22) González, P., Martínez, L., & Torres, J. (2023). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: Impact of fat distribution on cardio-metabolic risk. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 108(4), 602-613. <https://doi.org/10.1210/jcem.2023.2345678>
- (23) Sorrentino, S. A., Brizzi, M. F., & Mehta, N. N. (2021). Endothelial dysfunction and cardiovascular risk: A molecular and cellular perspective. *Circulation Research*, 129(1), 6-21. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318992>
- (24) Liu, H., Li, L., Zhang, X., & Yang, W. (2018). Endothelial dysfunction in atherosclerosis: Mechanisms, biomarkers, and therapeutic strategies. *Frontiers in Physiology*, 9, 924. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00924>
- (25) Kleinbongard, P., Dejam, A., & Lauer, T (2020). Endothelial Dysfunction and Nitric Oxide in Cardiovascular Disease. *European Heart Journal*, 41 (10), 1041-1054
- (26) Wong, L. Y., Chan, W. S., & Cheng, M. W. (2020). The impact of atherosclerosis on cardiovascular events and therapeutic interventions. *European Heart Journal Supplements*, 22(6), 36-44. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suaa175>
- (27) Matsui, R., et al. (2021). Chronic activation of NF- κ B in endothelial cells: Implications for cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 131(7), 839-849.
- (28) Zhao, Y., Li, X., & Li, J. (2021). The impact of palmitic acid on adipose tissue accumulation and its role in metabolic dysfunction. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 94, 108678. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108678>
- (29) Kaiser, K., Andersson, S., & Larsson, C. (2023). Palmitic acid-induced insulin resistance and its impact on endothelial dysfunction: A cellular and molecular overview. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 875320. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.875320>
- (30) Rodríguez, E., Gómez, M. & Herrera, A. (2020). Palmitic Acid-Induced Oxidative Stress and NADPH Oxidase Activation in Endothelial Cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 155, 63-74

-
- (31) Kim, Y., Lee, S., & Han, J. (2020). Palmitic Acid-Induced Endothelial Dysfunction: Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, 98.
- (32) Vanhoutte, P M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease: A 30-year journey. *Hypertension*, 70(3), 510-520. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.08547>
- (33) Mendoza, C. ., Rodríguez, L. A., & Hernández, P. T. (2022). The impact of saturated fats, including palmitic acid, on weight gain and adipogenesis. *Journal of Lipid Research*, 63(10), 1150-1163. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2022.104567>
- (34) Forstermann U., Xia, N., & Li, H (2017). Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*, 120(4), 713-735 <https://doi.org/10.1161/circresaha.116.309326>
- (35) Cai, H., & Harrison, D. G. (2018). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. *Current Opinion in Cardiology*, 33(4), 290-298. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000513>
- (36) Babaei, M., et al. (2022). The role of VCAM-1, ICAM-1, and PCAM-1 in endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 334, 52-60.
- (37) Basu, A., Rhim, H. & Shaikh, M. (2021). The Role of NADPH Oxidase and ROS in Vascular Health. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 641-649.
- (38) López, P., Sánchez, A., & García, J. (2021). Oxidative Stress and Nitric Oxide Availability in Endothelial Dysfunction: Role of Fatty Acids. *Cardiovascular Research*, 119(9), 1601-1611
- (39) Gori, T., Munoz, D., & Liss, P. (2020). Role of Oxidative Stress and Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis: Key Findings from Recent Studies. *Atherosclerosis*, 314, 40-47
- (40) Zhao, Y., Chen, X., & Li, J. (2020). The main sources of reactive oxygen species (ROS) in atherosclerosis: NADPH oxidase, mitochondria, and proinflammatory cytokines. *Atherosclerosis*, 294, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.01.015> Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*, 104(4), 503-516. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00210-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00210-3)

-
- (41) Libby, P. (2021). The changing landscape of atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 18(4), 195-209. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00467-6>
- (42) Wu, X., Miao, D., Liu, Z., Liu, K., Zhang, B., Li, J., Li, Y., & Qi, J. (2020). β -Hydroxybutyrate antagonizes aortic endothelial injury by promoting generation of VEGF in diabetic rats. *Tissue and Cell*, 64, 101345. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101345>
- (43) Chung, J. H., Yoon, H. J., Kim, Y. M., & Kang, C. W. (2020). The relationship between endothelial dysfunction and inflammation in cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 12(3), 134-143. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2020.24>
- (44) Tsoi, M. F., Lau, S. W., & Yuen, H. F. (2021). Mechanisms of atherosclerosis progression and potential therapeutic targets. *Current Drug Targets*, 22(2), 150-166. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210201101747>
- (45) Tinsley, G. M., & La Bounty, P. M. (2018). Effects of Ketogenic Diets on Body Weight and Metabolic Disease: A Review. *Nutrition and Metabolism*, 15(1), 1-12.
- (46) Zhao, H., Li, T., & Wang, J. (2021). The effects of saturated fatty acids on metabolic inflammation and insulin resistance: Pathways and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7525. <https://doi.org/10.3390/ijms22147525>
- (47) Williams, A. S., Crown, S. B., Lyons, S. P., Koves, T. R., Wilson, R. J., Johnson, J. M., Slentz, D. H., Kelly, D. P., Grimsrud, P. A., & Zhang, G.-F. (2024). Ketone flux through BDH1 supports metabolic remodeling of skeletal and cardiac muscles in response to intermittent time-restricted feeding. *Cell Metabolism*, 36(2), 422-437.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.01.007>
- (48) Poff, A. M., et al. (2021). Ketogenic Diet Improves Endothelial Function and Vascular Health: A Review. *Nutritional Neuroscience*, 24(5), 363–374.
- (49) Faheem, Y., Jaiswal, A., Shergill, K., Boppana, K., Almansouri, N. E., Bakkannavar, S., & Yu, A. K. (2024). Keto clarity: A comprehensive systematic review exploring the efficacy, safety, and mechanisms of ketogenic diet in pediatric epilepsy. *Cureus*, 16(2), e54863. <https://doi.org/10.7759/cureus.54863>
- (50) Paoli, A. (2014). Ketogenic Diet for Obesity: Friend or Foe? *Journal of Obesity and Weight Loss Therapy*, 4(5), 1–5.
- (51) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.

-
- (52) Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman and Company.
- (53) Wei, S., Binbin, L., Yuan, W., Zhong, Z., Donghai, L., & Caihua, H. (2022). β -Hydroxybutyrate in cardiovascular diseases: A minor metabolite of great expectations. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 823602. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.823602>
- (54) Gómez, C. R., & Barrera, L. (2020). Beta-Hydroxybutyrate and its Role in Reducing Inflammation and Improving Brain Function: A Review. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 53.
- (55) Pérez-Carrasco, M., et al. (2020). Effects of Beta-Hydroxybutyrate on the NLRP3 Inflammasome. *Journal of Molecular Biology*, 432(10), 2997–3012.
- (56) Liu, Y., Wang, Z., & Li, X. (2023). Beta-Hydroxybutyrate: A Supplemental Molecule for Various Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 39238395. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.39238395>
- (57) Zhang, Y., & Xie, Z. (2021). β -Hydroxybutyrate in Cardiovascular Diseases: A Minor Metabolite with Major Implications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 823602. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.823602>
- (58) Lopaschuk, G. D., & Ussher, J. R. (2023). Ketones and the Heart: Metabolic Principles and Therapeutic Implications. *Circulation Research*, 133(6), 748–764. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321872>
- (59) Pingili, A., Vempati, R., Vemula, M., Lakkimsetti, M., Madhavaram, H., Nanjundappa, A., Gummadi, J., Singh, S., Desai, R., & Sunkara, P. (2024). Prevalence of cardiovascular events among transgender adults with obesity: A population-based analysis. *Obesity Pillars*, 11, 100125.
- (60) Biotium (2015). Resazurin Cell Viability Assay Kit: Protocol and product information. Biotium, Inc. Recuperado de www.biotium.com
- (61) Abcam. (2024). Free Fatty Acid Assay Kit - Quantification (Version 16b). Abcam. Recuperado de <https://www.abcam.com/ab65341>
- (62) Cayman Chemical (2023). Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit(Item No. 780001). Cayman Chemical. www.caymanchem.com

Referencias de Imágenes

Figura 1. Nación Paise. (2023, marzo 4). Preocupante panorama latinoamericano en el Día Mundial de Obesidad. Nación Paise. Recuperado de <https://www.nacionpaisa.com/preocupante-panorama-latinoamericano-en-el-dia-mundial-de-obesidad/>

Figura 2. Dreamstime. (2025). *Adipocitos: obesidad e inflamación, tejido adiposo normal y obeso*. Dreamstime. Recuperado de: <https://es.dreamstime.com/adipocitos-obesidad-e-inflamaci%C3%B3n-tejido-adiposo-normal-y-obeso-metabolismo-del-patolog%C3%ADa-de-la-adipoquinas-anti-image207812040>

Figura 3. Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(4), 1-29. Licencia: CC BY 4.0 <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>

Figura 4. Figuer, A., Alique, M., Valera, G., Serroukh, N., Ceprián, N., de Sequera, P., Morales, E., Carracedo, J., Ramírez, R., & Bodega, G. (2023). Nuevos mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 43(1), 63-80. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2022.12.005>

Figura 5. National Heart, Lung, and Blood Institute. (2023). *Atherosclerosis: Tratamiento*. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis/treatment>

Figura 6. Viribay, A. (2020, febrero 1). *Oxidación de ácidos grasos durante el ejercicio: ¿Cómo se regula?* Glut4Science. <https://www.glut4science.com/oxidacion-de-acidos-grasos-durante-el-ejercicio-como-se-regula/>

Figura 7. Metabolismo Channel. (2023, febrero 1). Cuerpos cetónicos [cetoGENESIS y cetoLISIS]. YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=_XDXTwD1jls

Figura 8. Metabolismo Channel. (2023, febrero 1). Cuerpos cetónicos [cetoGENESIS y cetoLISIS].

YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=XDXTwD1jls>

Figura 9. Metabolismo Channel. (2023, febrero 1). Cuerpos cetónicos [cetoGENESIS y cetoLISIS].

YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=XDXTwD1jls>

Figura 10. Metabolismo Channel. (2023, febrero 1). Cuerpos cetónicos [cetoGENESIS y cetoLISIS].

YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=XDXTwD1jls>

Figura 11. Metabolismo Channel. (2023, febrero 1). Cuerpos cetónicos [cetoGENESIS y cetoLISIS].

YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=XDXTwD1jls>

Anexos

Anexo A. Composición de medios utilizados.

- Tabla A1. Medio DMEM alto en glucosa

Componente	Concentración/Proporción	Cantidad para 1L
DMEM medio basal	-----	900 mL
Suero Bovino Fetal (SBF)	10%	100 mL
Antibiótico-Antimicótico (AA)	0.01%	1 mL
Total	-----	1 L

- Tabla A2. Medio DMEM bajo en glucosa

Componente	Concentración/Proporción	Cantidad para 1L
DMEM bajo en glucosa	1x	1 L
Antibiótico-Antimicótico (AA)	0.01%	1 mL

Solución de PBS 500 mL

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	40.3
KCl	1.1
Fosfato de Sodio	5.75
Fosfato de Potasio	1

Anexo B. Tratamiento con AP y β -hidroxibutirato

Tabla B. Tratamiento con AP y β -hidroxibutirato

Tratamiento	Composición
BCO	DMEM bajo en glucosa sin células
CTRL	DMEM bajo en glucosa con células
AP	DMEM bajo en glucosa con ácido palmítico 200 μ M
BHB	DMEM bajo en glucosa con β -hidroxibutirato 5 mM
AP + BHB (1mM)	DMEM bajo en glucosa + ácido palmítico 200 μ M y β -hidroxibutirato 1 mM
AP + BHB (2.5mM)	DMEM bajo en glucosa + ácido palmítico 200 μ M y β -hidroxibutirato 2.5 mM
AP + BHB (5mM)	DMEM bajo en glucosa + ácido palmítico 200 μ M y β -hidroxibutirato 5 mM

Descripción de los tratamientos.

- BCO (control de medio sin células). Se utilizó DMEM bajo en glucosa sin células. Esto sirve como base para evaluar el efecto de otros tratamientos sobre el medio en la influencia de las células.
- CTRL (control con células). Se utilizó DMEM bajo en glucosa con las células, es el grupo de referencia para evaluar el comportamiento de las células en condiciones normales.
- AP (Ácido palmítico): Se añadió ácido palmítico 200 μ M al DMEM bajo en glucosa, para estudiar los efectos del ácido graso sobre las células en condiciones de baja glucosa.
- BHB (β -hidroxibutirato): Se utilizó β -hidroxibutirato a una concentración de 5 mM en DMEM bajo en glucosa, para evaluar los cuerpos de un cuerpo cetónico como fuente alternativa de energía

- AP + BHB (1mM): Se añadió ácido palmítico 200 μ M y β -hidroxibutirato 1mM al medio DMEM bajo en glucosa para estudiar los efectos combinados del ácido palmítico y β -hidroxibutirato a baja concentración.
- AP + BHB (2.5mM): Se añadió ácido palmítico 200 μ M y β -hidroxibutirato 2.5 mM en DMEM bajo en glucosa, para evaluar los efectos de una concentración intermedia de β -hidroxibutirato junto con el ácido palmítico.
- AP + BHB (5mM): Se añadió ácido palmítico 200 μ M y β -hidroxibutirato 5 mM en DMEM bajo en glucosa para estudiar los efectos combinados a la concentración más alta de β -hidroxibutirato

Diagrama B1. Stock de Ácido palmítico (AP)

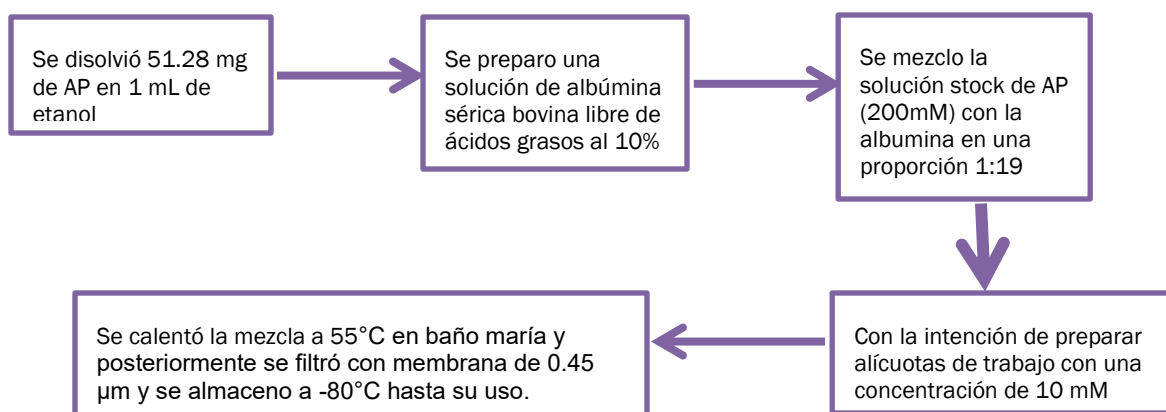
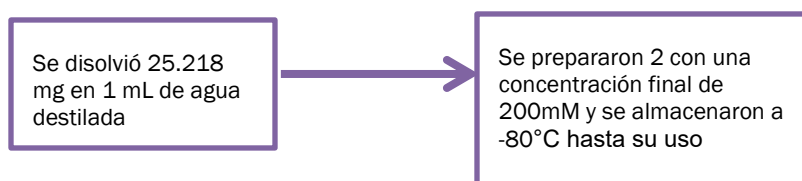


Diagrama B2. Stock de β -hidroxibutirato



Anexo C. Preparación de Curva de Viabilidad

Los datos contenidos en la tabla para realizar la curva estándar se hacen por triplicado para garantizar que los resultados sean más robustos, consistentes y confiables, lo cual es fundamental para interpretar correctamente la relación entre la concentración del tratamiento y la respuesta observada.

Tabla C1. Rango de Concentración de la curva estándar de AP.

Concentración de ácido palmítico (μM)	Volumen de ácido palmítico (μL)	Volumen de DMEM (μL)	Concentración final (μM)
100	10	90	100
150	15	85	150
200	20	80	200
250	25	75	250
300	30	70	300

Anexo D. Concentración de ácidos grasos

Tabla D1. Estándares para construcción de la curva de ácidos grasos.

Componente	Cantidad (μL)
Tampón de ensayo	44
Sonda OxiRed/Sonda de ácidos grasos	2
Mezcla de enzimas Acyl CoA/Mezcla de enzimas	2
Potenciador	2

Tabla D2. Estándares para la construcción de la curva de AP de ácidos grasos.

Estándar	Vol. de AP estándar (µl)	Tampón de ensayo (µl)	Vol. Final de estándar por pozo (µl)	Conc. Final de AP por pozo (nmol/pocillo)
1	0	150	50	0
2	6	144	50	2
3	12	138	50	4
4	18	132	50	6
5	24	126	50	8
6	30	120	50	10

Anexo E. Síntesis de cDNA

Tabla E1. Composición de los reactivos utilizados para la síntesis de cDNA.

Reactivo	Cantidad
RNA total	5 µg
Random Hexamer Primer	1 µL
Agua libre de nucleasas	Para completar 12 µL
Tampón Reacción 5x	4 µL
Inhibidor de RNAasa	1 µL

Mezcla de dNTP 10mM	2 µL
Revert Aid RT	1 µL
Volumen total	20 µL

Anexo F. qPCR

Las cantidades de la siguiente tabla se realizaron por triplicado para cada una de las enzimas.

Tabla F1. Reactivos para qPCR

Reactivo	Cantidad
Primer F	0.5 µL
Primer R	0.5 µL
Agua libre de nucleasas	0.5 µL
cDNA	1 µL
Syber Green	2.5 µL
Volumen Total	5 µL

A continuación, se presentan las secuencias de los primers utilizados en el análisis de los genes β -actina, VCAM, ICAM, NOS2, NOS3 y NOX4.

Tabla F1. Primers PCR

Gen	Primer Forward (5' -> 3')	Primer Reverse (5' -> 3')
B-actina	5'-CCCGCGAGTACAAC CCTTCT-3'	5'-CGTACATCCATGGC GAACT-3'
VCAM	5'-GGCTTTGAAGCAG AGAVTT-3'	5'-GCTTGAGAGACTG CAAACAG-3'
ICAM	5'-GCTAAAGGCACGG CACTTGTA-3'	5'-CAGATGGTGTCCC GCTGCCTA-3'
NOS2	5'-GTGACCATGGAGC ATCCCA-3'	5'-CTCCAGGAGCATG TTGGCCAC-3'
NOS3	5'-CCTGTACCCCAAG ACGCTG-3'	5'-CCAATAGCTGCTC AGTGGGT-3'
NOX4	5'-GCTCATTTCCCACA GACCTGG-3'	5'-AGGTTTGTGCTC CGGATGCA-3'
TNF-α	5'-CTGCCTCTGGCTC ACAAGG-3'	5'-CTGTGCCTCAGGG AACAGTC-3'
IL-18	5'-GGAATCAGACCAC TTTGGCA-3'	5'-TGTC AACGAAGAG AACTTGGT-3'
IL-1β	5'-GTCACAGAGGACGGGCTCTT-3'	5'-GGAATCAGACCACTTTGGCA-3'
IL-6	5'-GCCTTCTTGGAGACTGATGCT-3'	5'-GACAGGTCTGTTGGGAGTGG-3'

Anexo G. Curvas Estándar de Nitrato/Nitrito

Tabla G1. Estándares para la construcción de la curva de Nitrato

Celda	Bulk Nitrate Standard (μ L)	Assay Buffer (μ L)	Nitrate standard concentration (μ L)
A1,A2	0	80	0
B1,B2	5	75	5
C1,C2	10	70	10
D1,D2	15	65	15

E1,E2	20	60	20
F1,F2	25	55	25
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35

Tabla G2. Estándares para la construcción de la curva de Nitrito

Celda	Bulk Nitrate Standard (μL)	Assay Buffer (μL)	Nitrate standard concentration (μL)
A1,A2	0	80	0
B1,B2	5	75	5
C1,C2	10	70	10
D1,D2	15	65	15
E1,E2	20	60	20
F1,F2	25	55	25
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35

Productividad

Como parte de las actividades de divulgación científica derivadas del presente trabajo de tesis, se logró la publicación de un artículo de divulgación titulado “*Efecto de la cetosis en la aterosclerosis*” en la revista *iBIO*, Vol. 6 Núm. 1 (2024), orientado a comunicar las bases de este estudio a un público general y especializado.



Imagen de Diana Polakina

Recibido: 22-nov-2023 Aceptado: 09-ene-2024

e-ISSN 2954-4890

Efecto de la cetosis en la aterosclerosis

*Lidia Arely Reyes Castañeda
María Isabel Nería González**

División de Ingeniería Química y Bioquímica, TecNM:
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec,
México.

*Autor para la correspondencia:
mineriag@tese.edu.mx

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) afectan la función cardíaca, y están relacionadas con el sobrepeso provocado por malas prácticas alimenticias. Por lo que, las ECV son de las principales causas de muerte a nivel mundial. La pérdida de peso puede reducir significativamente dichas enfermedades por promover la disminución de los niveles de

da para tratar la epilepsia, sin embargo, con el paso del tiempo y en este nuevo siglo ha tomado gran auge en el control de peso y como

Asimismo, los resultados de esta investigación fueron presentados en el XI Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI y V Encuentro de estudiantes del posgrado del CICB-UATx, realizado en Tlaxcala, México durante el mes de Diciembre del 2024, mediante la ponencia titulada *“Effect of beta-hydroxybutyrate on endothelial cells treated with palmitic acid: metabolic and vascular implications”*. Esta participación permitió compartir los hallazgos con la comunidad académica, fomentar el intercambio de ideas y fortalecer la formación profesional del autor/a como investigador/a.

A continuación, se presentan las constancias de publicación y participación:





Mexican Journal of Biotechnology 2025, 10(1):1

Journal homepage: www.mexjbiotechnol.com

SOCIEDAD CIENTÍFICA INTERNACIONAL DE
BIOTECNÓLOGOS A. C. (SOCIBI)

ISSN:2448-6590



Effect of beta-hydroxybutyrate on endothelial cells treated with palmitic acid: metabolic and vascular implications

Efecto del beta-hidroxibutirato sobre células endoteliales tratadas con ácido palmítico: implicaciones metabólicas y vasculares

Lidia Arely Reyes-Castañeda^{1,2}, María Isabel Neria-González^{1*}, Jaime Héctor Gómez-Zamudio^{2*}, Lázaro-Suaréz Martha Lucia³,

¹TecNM: Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec Estado de México, México,
²Unidad de investigación Médica en Bioquímica de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

³Dirección Ejecutiva de Investigación y estudios avanzados, Dirección de Proyectos de Investigación y Desarrollo Académico, UNISA, Universidad de la Salud, Ciudad de México, México

*Corresponding author

E-mail address: jaime_gomez_zamudio@hotmail.com (J. Gómez), mineriag@tese.edu.mx (M. Neria)

Abstract history

Received: / 10 October 2022/ Received in revised form: / Day Month 2022/

Accepted: / 00 December 2022 / Published online: / 1 January 2023

ABSTRACT

Beta-hydroxybutyrate (BHB) is the main product of the ketogenic diet, known for its benefits in obesity, hepatic steatosis, and neuroprotection. However, its effect on the vasculature has been underexplored and presents conflicting results. This study aimed to evaluate the role of BHB in a model of endothelial dysfunction using primary endothelial cell cultures from the thoracic aorta of 3-month-old Sprague-Dawley rats. The cells were incubated for 24 hours with palmitic acid (200 mM) and different concentrations of BHB (1 mM, 2.5 mM, and 5 mM). Results showed that palmitic acid decreased the expression of NOS3 and increased adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. In contrast, BHB increased NOS3 expression and reduced VCAM-1 and ICAM-1, suggesting a protective effect against palmitic acid-induced endothelial dysfunction.

Keywords: beta-hydroxybutyrate, endothelial cells, palmitic acid, inflammation, VCAM-1, ICAM-1, NOS, NOX4.

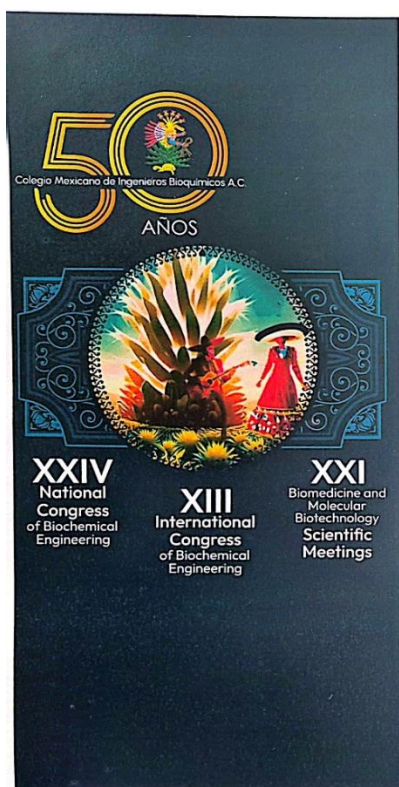
RESUMEN

El β -hidroxibutirato (BHB) es el principal producto de la dieta cetogénica, conocido por sus beneficios en obesidad, esteatosis hepática y neuro protección. Sin embargo, su efecto en la vasculatura ha sido poco estudiado y presenta resultados contradictorios. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el papel del BHB en un modelo de disfunción endotelial utilizando cultivos primarios de células endoteliales de la aorta torácica de ratas Sprague-Dawley de 3 meses. Las células se incubaron durante 24 horas con ácido palmítico (200 mM) y diferentes concentraciones de BHB (1 mM, 2.5 mM y 5 mM). Los resultados mostraron que el ácido palmítico disminuyó la expresión de NOS3 y aumentó las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1. En contraste, el BHB aumentó la expresión de NOS3 y redujo VCAM-1 e ICAM-1, sugiriendo un efecto protector frente a la disfunción endotelial.

Palabras clave: ácido palmítico, beta-hidroxibutirato, células endoteliales, ICAM-1, inflamación, NOS, NOX4, VCAM-1,

Como parte de mi compromiso con la difusión del conocimiento, durante el periodo de realización de la presente tesis, asistí al XXIV Congreso Nacional y XIII Congreso de Ingeniería Bioquímica, con las XXI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, donde presenté un trabajo titulado “Expresión del receptor A TSH en el tejido adiposo epididimal durante el envejecimiento” relacionado con un tema diferente al de la tesis. Dicho trabajo fue posteriormente publicado en JOURNAL OF BIOENGINEERING AND BIOMEDICINE RESEARCH (JBBER), con ISSN: 2594-052X, correspondiente a la edición de Marzo del 2025. Esta participación y publicación me permitieron ampliar mi experiencia en la divulgación científica y fortalecer mis competencias en investigación y presentación de trabajos en congresos.

A continuación, se anexa la constancia de participación y publicación:



**COLEGIO MEXICANO
DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.**
Biochemical Engineering Mexican Association

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:

*Lidia Arely Reyes Castañeda ; Alvaro Giovanni Ramírez Gutiérrez ; María Isabel Nería
González ; Jaime Héctor Gómez Zamudio*
Authors of the work:

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A TSH EN EL TEJIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL
DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

Keyword: BMH17REY20231219

Participated in the poster session of the XIII International Congress, XXIV National Congress on Biochemical Engineering, and the XXI Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held at Guadalajara Jalisco, México, from March 20th to 22nd, 2024.

Raúl Chávez Alviricio, MSc *Delfilia Ahuatzí Chacón, PhD*
President Chair Scientific Committee



Expression of TSH receptor in adipose tissue during aging

Reyes-Castañeda Lidia Arely^{1,2}, Ramírez-Gutiérrez Álvaro Giovanni¹, Neria-González María Isabel^{*1}, Gómez-Zamudio Jaime Héctor^{*2}

¹División de Ingeniería Química y Bioquímica, TecNM: Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec Estado de México, México

²Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

*Corresponding author: jaim_gomez_zamudio@hotmail.com, mineriag@tese.edu.mx

Abstract. The presence of the Thyroid-Stimulating Hormone receptor (TSHR) in adipose tissue has taken a great relevance in the last years due to it has been related with the presence and maintaining of an inflammatory state in obesity, which has been associated to the development of several metabolic complications such as insulin resistance, diabetes, cardiovascular diseases, etc. On the other hand, the redistribution of body fat and loss of muscle mass during aging is related to metabolic and endocrine changes, events in which the TSHR could be participating. Our research focused on the relationship between TSHR expression and aging in the thyroid gland, epididymal and perirenal fat. Total RNA was obtained of thyroid gland, epididymal and perirenal fat from rats of -3, -6 y 12 months old. cDNA was synthesized to realize real time PCR for TSHR gen, using β -actin as reference gene. The results showed that the expression of the TSHR decrease with advancing age, indicating a low regulation of the receptor in a manner dependent of the age, and possibly changes in its activation does not depend solely on the amount of thyroid-stimulating hormone. This finding has possible implications in the metabolism, and changes associated with muscle loss and fat gain in old age, providing a basis for future research and potential therapeutic strategies aimed at addressing obesity and aging.

Keywords. Biochemistry, inflammation, muscle mass, metabolism, resistance

Resumen. La presencia del receptor a TSH en tejido adiposo ha tomado gran relevancia en los últimos años ya que se ha relacionado con la presencia y mantenimiento de un estado inflamatorio en obesidad, el cual se ha asociado con el desarrollo de complicaciones metabólicas como resistencia a la insulina, diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc. Por otro lado, la redistribución de la grasa corporal y la pérdida de masa muscular durante el envejecimiento se relacionan con cambios metabólicos y endocrinos, eventos en los que pudiera participar el TSHR. Nuestra investigación se centró en la relación entre la expresión del TSHR y el envejecimiento en el tejido adiposo epididimal, perirrenal y tiroideo. Se obtuvo RNA total de tejido adiposo epididimal y perirrenal de ratas de 3, 6 y 12 meses de edad. Se sintetizó cDNA para realizar PCR en tiempo real para el gen TSHR, usando β -actina como gen de referencia. Los resultados mostraron que la expresión del TSHR disminuye conforme avanza la edad, indicando una regulación a la baja del receptor dependiente de la edad, y que posiblemente los cambios en su activación no solo dependen de la cantidad de hormona estimulante de tiroides (TSH). Este hallazgo tiene posibles implicaciones en el metabolismo y los cambios asociados con la pérdida de músculo y el aumento de grasa en la vejez, proporcionando una base para futuras investigaciones y posibles estrategias terapéuticas dirigidas a abordar la obesidad y el envejecimiento.

Palabras clave. bioquímica, Inflamación, masa muscular, metabolismo, resistencia

De igual manera participe en un simposio organizado por el Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec titulado “Productos Naturales 2023”, donde presente un trabajo relacionado con un tema diferente al de la tesis. Esta participación me permitió compartir mis conocimientos y obtener retroalimentación académica, lo que contribuyó al desarrollo de habilidades en la divulgación científica y la presentación de investigaciones en un entorno académico.

A continuación, se anexa la constancia de participación en el simposio:



EL TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC

Organismo Público Descentralizado del Estado de México

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

LIDIA ARELY REYES CASTAÑEDA

Por la presentación del trabajo “**Expresión del receptor a TSH en el tejido adiposo epididimal durante el envejecimiento**”, en el marco del Simposio Productos Naturales 2023, desarrollado del 10 al 14 de julio del 2023.

DR. PABLO BEDOLLA LÓPEZ
DIRECTOR GENERAL

Ecatepec de Morelos, Estado de México, Julio de 2023.