



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

“Evaluación de Fructooligosacáridos esterificados
y Fructooligosacáridos sobre el
Síndrome metabólico inducido en un modelo murino”

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Susana Hernández Pérez

Directores:

Abril Ramírez Higuera

Rosa María Oliart Ros

Leticia Casas Godoy

H. VERACRUZ, VER.

14 DE FEBRERO DEL 2020.

RECONOCIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo en los siguientes laboratorios e Institutos:

Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Veracruz / UNIDA: Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición a cargo de la Dra. Abril Ramírez Higuera. Laboratorio de Bioquímica a cargo de la Dra. Rosa María Oliart Ros. Laboratorio de Genética aplicada a cargo de la Dra. Carolina Peña Montes. Laboratorio de Bioprocesos a cargo del Dr. Gerardo Valerio Alfaro. Laboratorio de Microbiología a cargo de la Dra. Patricia Guillermina Mendoza García.

Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica de la Universidad Veracruzana con la Dra. María Remedios Mendoza López.

Instituto de Investigaciones Psicológicas de la Universidad Veracruzana, laboratorio de Conducta alimentaria a cargo de la Dra. María del Socorro Herrera Meza.

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Departamento de Fisiología con los Doctores Verónica Guarner Lans y Vicente Castrejón Téllez.

Acuario de Veracruz. Laboratorio de alimento vivo a cargo de la Dra. Guadalupe Campos Bautista.

Instituto Politécnico Nacional (IPN). Laboratorio de endocrinología y metabolismo. Departamento de Fisiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas a cargo de la Dra. Lucia Quevedo Corona, mediante el proyecto SIP 20195713 "Influencia del tejido adiposo peri vascular sobre la expresión arterial en un modelo de hipotiroidismo en rata".

Centro de Nano ciencias y Micro y Nanotecnologías del IPN con la Dra. María de Jesús Perea Flores en área de Preparación de muestras y con el Dr. Hugo Martínez Gutiérrez en Microscopía Electrónica de Barrido de alta Resolución.

Agradecemos el apoyo brindado y la disponibilidad de todos ellos.

Susana Hernández Pérez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado otorgada (cvu:839819) y el apoyo complementario del programa de becas mixtas para movilidad nacional (Estancia de investigación).

Mtra. Gabriela Hernández Reyes y a las compañeras que nos ayudaron el día del sacrificio.

RESUMEN

**Hernández Pérez Susana. M.C en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Febrero, 2020. “EVALUACIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS ESTERIFICADOS Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS SIN ESTERIFICAR SOBRE EL SÍNDROME METABOLICO INDUCIDO EN UN MODELO MURINO”.
Directora: Abril Ramírez Higuera; Codirectora(s): Rosa María Oliart Ros; Leticia Casas Godoy.**

Dentro de los problemas más graves de salud en la sociedad actual se encuentra el síndrome metabólico (SM), el cual engloba una serie de anormalidades metabólicas que en conjunto son consideradas un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes. Actualmente el 25% de la población mundial lo padece y el 80% de estos podrían desarrollar complicaciones cardiovasculares y posiblemente la muerte si no son tratados. El SM es originado por diversos factores entre ellos genéticos, ambientales, sociales, falta de actividad física y principalmente dietas inadecuadas, por lo tanto se buscan alternativas no farmacológicas que ayuden a la calidad de vida de los pacientes. Este es el caso de los carbohidratos de ésteres de ácidos grasos (CFAE, por sus siglas en inglés) generados a partir de carbohidratos y ácidos grasos, de los que destaca su uso como prebióticos y posibles emulsificantes y surfactantes en la industria alimentaria. Los fructooligosacáridos (FOS) provenientes del Agave tequilana Weber var. azul han sido estudiados por su capacidad prebiótica ya que promueven el crecimiento selectivo de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mejorando la salud del hospedador mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta como el butírico, propionico y acético. Por otro lado los ácidos grasos de cadena media (AGCM) como el ácido láurico, se les atribuye un efecto termogénico que provoca la disminución de grasa abdominal sin alterar los niveles de colesterol en sangre. Por lo anterior la presente investigación se centró en la evaluación del efecto de los FOS esterificados con ácido láurico (FOS-AL) y FOS sin esterificar, sobre los parámetros que conforman el SM inducido en ratas Wistar, dando como resultado una disminución de la resistencia a la insulina, glucosa, presión, triglicéridos, colesterol total, grosor de panículo adiposo visceral y aumento de *Lactobacillus* en los grupos suplementados con FOS-AL y FOS sin encontrarse diferencia significativa entre ellos. De estos resultados se concluye que la esterificación de los FOS de Agave con ácido láurico no afecta su funcionalidad, en términos de su actividad prebiótica ni de mejora de algunas comorbilidades del SM, por lo que podrían ser utilizados en la industria alimentaria como compuestos surfactantes y emulsificantes sin alterar los efectos benéficos de los FOS.

ABSTRACT

Hernández Pérez Susana. M.C. en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. February, 2020. “EVALUATION OF ESTERIFIED FRUCTOOLIGOSACCHARIDES ON THE METABOLIC SÍNDROME INDUCED IN A MURINE MODEL”. Advisors: Abril Ramirez Higuera, Rosa María Oliart Ros; Leticia Casas Godoy.

Among the most severe health problems in today's society is the metabolic syndrome (MS), which encompasses a series of metabolic abnormalities that together are considered a risk factor for developing cardiovascular diseases and diabetes. Currently 25% of the world's population suffers from it and 80% of these could develop cardiovascular complications and possibly death if they are not treated. MS is caused by various factors including genetic, environmental, social, lack of physical activity and mainly inadequate diets. Therefore, non-pharmacological alternatives are sought that help patients' quality of life. This is the case of carbohydrates of fatty acid esters (CFAE) generated from carbohydrates and fatty acids, which highlights their use as prebiotics and possible emulsifiers and surfactants in the food industry. Fructooligosaccharides (FOS) from *Agave tequilana* Weber var. azul have been studied for their prebiotic properties as they promote the selective growth of bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which improve the health of the host by producing short-chain fatty acids such as butyric, propionic and acetic. On the other hand, medium-chain fatty acids (AGCM) such as lauric acid are attributed a thermogenic effect that causes abdominal fat to decrease without altering blood cholesterol levels. Therefore, this research focused on the evaluation of the effect of FOS esterified with lauric acid (FOS-AL) and an esterified FOS, on the parameters that comprise the induced SM in Wistar rats, resulting in a decrease in resistance to insulin, glucose, pressure, triglycerides, total cholesterol, folds and increase of *Lactobacillus* in the groups supplemented with FOS-AL and FOS without finding a significant difference between them. From these results it is concluded that the esterification of Agave FOS with lauric acid does not affect its functionality, in terms of its prebiotic activity or improvement of some MS comorbidities, so they could be used in the food industry as surfactant compounds and emulsifiers without altering the beneficial effects of FOS.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Síndrome metabólico	2
2.1.1 Componentes del síndrome metabólico	3
2.1.1.1 Resistencia a la insulina	3
2.1.1.2 Obesidad	4
2.1.1.3 Dislipidemia	5
2.1.1.4 Presión arterial	6
2.1.2 Estrés oxidativo	8
2.1.2.1 Antioxidantes enzimáticos	9
2.1.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)	10
2.1.2.1.2 Catalasa (CAT)	10
2.1.2.1.3 Glutación peroxidasa (GPX)	11
2.1.2.1.4 Óxido nítrico síntasa (NOS)	12
2.2 Alimento funcional	13
2.2.1 Prebióticos como parte del alimento funcional	14
2.3 Microbiota intestinal	15
2.3.1 Microvellosidades en el epitelio intestinal	16
2.3.1.1 Cambios en las microvellosidades por la alimentación con fructanos	17
2.3.2 Efectos benéficos de la microbiota intestinal en el síndrome metabólico	18
2.4 Agave tequilana Weber variedad azul	19
2.4.1 Fructanos y fructooligosacáridos	21
2.4.1.1 Efectos benéficos de los fructanos y fructooligosacáridos en el síndrome metabólico	23
2.5 Ácidos grasos saturados de cadena media	24
2.5.1 Ácido láurico	25
2.5.2 Efectos encontrados de los ácidos grasos de cadena media en la salud	25
2.6 Carbohidratos de ésteres de ácidos grasos (CFAE)	27

2.6.1	Ensayos de biotoxicidad _____	29
2.6.1.1	Bioensayo con artemia salina _____	29
2.6.1.2	Prueba de Ames _____	30
2.7	Modelos murinos _____	31
2.7.1	Dietas para la inducción del síndrome metabólico _____	33
2.7.1.1	Dieta alta en grasas _____	33
2.7.1.2	Dieta alta en carbohidratos _____	34
2.7.2	Pruebas conductuales _____	35
2.7.2.1	Prueba de laberinto de brazos elevados _____	35
2.7.2.2	Prueba de campo abierto _____	37
2.7.2.3	Prueba de nado forzado _____	38
3	JUSTIFICACIÓN _____	40
4	HIPÓTESIS _____	41
5	OBJETIVOS _____	42
5.1	Objetivo general _____	42
5.2	Objetivos específicos _____	42
6	MATERIALES Y METODOLOGÍA _____	43
6.1	Material biológico _____	43
6.2	Animales y condiciones de vivienda _____	43
6.3	Bioensayo con Artemia salina _____	43
6.4	Composición de la dieta para inducción del síndrome metabólico _____	44
6.5	Especificaciones de distribución y tiempo de inducción del síndrome metabólico	45
6.6	Determinaciones biométricas y nutricionales _____	46
6.7	Comportamiento conductual _____	46
6.7.1	Prueba de laberinto de brazos elevados _____	46
6.7.2	Prueba de campo abierto _____	47
6.7.3	Prueba de nado forzado _____	48
6.8	Biomarcadores del síndrome metabólico _____	48
6.8.1	Presión sanguínea _____	48
6.8.2	Prueba de tolerancia a la glucosa _____	48
6.8.3	Prueba de resistencia a la insulina _____	48
6.8.4	Peso y almacenamiento de órganos _____	49
6.8.5	Determinación de lípidos de membrana _____	49
6.8.6	Medición de parámetros bioquímicos (Glucosa, Triglicéridos y Colesterol total)	50

6.8.7	Determinación de estrés oxidativo en riñón y corazón _____	50
6.8.7.1	Obtención y cuantificación de proteína _____	50
6.8.7.2	Identificación de proteínas por el método de Western blot _____	51
6.9	Detección y estimación de lactobacilos y bacterias totales por el método de reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) _____	52
6.9.1	Extracción de DNA en muestras fecales de roedor _____	52
6.9.2	Validación de sondas utilizadas en RT-PCR para la estimación de lactobacilos y bacterias totales _____	53
6.10	Análisis de microvellosidades de colon por microscopía electrónica de barrido 54	
6.11	Estadística _____	55
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	56
7.1	Prueba de biotoxicidad con artemia salina _____	56
7.2	Determinaciones biométricas y nutricionales _____	56
7.2.1	Valores de índice de masa corporal _____	58
7.2.2	Medición de grosor del panículo adiposo _____	59
7.2.3	Registro del consumo de agua _____	60
7.2.4	Aporte calórico de las dietas administradas _____	61
7.3	Evaluación de biomarcadores del síndrome metabólico _____	63
7.3.1	Valores de presión arterial sistólica. _____	63
7.3.2	Valores de la prueba de tolerancia a la glucosa _____	64
7.3.3	Prueba de resistencia a la insulina _____	66
7.3.4	Tejido adiposo (perirenal, visceral y epididimal) _____	67
7.3.5	Peso de tejido hepático _____	69
7.3.6	Determinación de lípidos de membrana en tejido adiposo _____	70
7.3.7	Determinaciones bioquímicas _____	71
7.3.8	Determinación del estrés oxidativo _____	73
7.4	Análisis de lactobacilos y bacterias totales en heces _____	76
7.4.1	Extracción de DNA en heces de ratas W _____	76
7.4.2	Validación de sondas y cebadores utilizados en RT-PCR para el análisis de lactobacilos y bacterias totales en heces de rata W _____	77
7.4.3	Cuantificación relativa de lactobacilos y bacterias totales _____	78
7.5	Pruebas de comportamiento conductual en ratas _____	79
7.5.1	Prueba de laberinto de brazos elevados _____	79
7.5.2	Prueba de nado forzado _____	80
7.5.3	Prueba de campo abierto _____	81
7.6	Análisis de microvellosidades de colon transverso _____	82

8	CONCLUSIONES	85
9	RECOMENDACIONES	86
10	BIBLIOGRAFÍA	87

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico definidos por diferentes asociaciones.	2
TABLA 2.2 Clasificación de la obesidad conforme el IMC y su índice de riesgo a la salud.5	
TABLA 2.3 Niveles de lípidos recomendados por el Panel de Tratamiento para Adultos III (ATP-III).....	6
TABLA 2.4 Valores predeterminados de presión arterial propuestos por la Asociación Americana del Corazón (AHA siglas en ingles).	7
TABLA 2.5 Dietas propuestas para la inducción del síndrome metabólico en ratas Wistar.	34
TABLA 6.1 Composición de la dieta alta en grasas y carbohidratos para la inducción del síndrome metabólico.	44
TABLA 6.2 Composición nutricional de las dietas testigo y síndrome metabólico.	44
TABLA 6.3 Solución de lisis utilizada en la purificación de proteínas.	50
TABLA 6.4 Diferentes porcentajes de gel SDS-PAGE.	51
TABLA 6.5 Etapas utilizadas en RT-PCR.	54
TABLA 6.6 Reactivos utilizados en RT-PCR.....	54
TABLA 7.1 Valores biométricos medidos tras la ingesta de FOS y FOS-AL durante 8 semanas.....	57
TABLA 7.2 Determinación de lípidos de membrana en tejido adiposo de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.....	71
TABLA 7.3 Expresión de proteínas del sistema antioxidante enzimático en corazón.....	74
TABLA 7.4 Expresión de proteínas del sistema antioxidante enzimático en riñón.....	74
TABLA 7.5 Parámetros medidos en la prueba de laberinto de brazos elevados en ratas con síndrome metabólico suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.....	80
TABLA 7.6 Parámetros evaluados en la prueba de campo abierto de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Esquema general del sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	8
FIGURA 2.2 Esquema de reacción química realizado por la enzima SOD en la célula.....	10
FIGURA 2.3 Esquema de reacción química realizada por la enzima CAT en la célula.....	11
FIGURA 2.4 Esquema general de la reacción realizada por GPX en la célula.....	11
FIGURA 2.5 Relación de la microbiota intestinal con algunos factores del síndrome metabólico (Deveraj, 2013).	16
FIGURA 2.6 Esquema ilustrativo del epitelio intestinal.....	17
FIGURA 2.7 Estructura propuesta para los fructanos de Agave tequilana W.	20
FIGURA 2.8 Estructuras representadas de los fructanos, a) Inulina y b) Agavina.....	21
FIGURA 2.9 Diferentes grados de polimerización de fructanos de Agave tequilana a lo largo de su ciclo de vida.	21
FIGURA 2.10 Diferentes estructuras de fructanos.....	23
FIGURA 2.11 Estructura general de los ácidos grasos.	24
FIGURA 2.12 Estructura lineal del ácido láurico.	25
FIGURA 2.13 Esquema general de la esterificación de FOS y ácido láurico para la formación de FOS-AL.	29
FIGURA 2.14 Equipo utilizado en la prueba de laberinto de brazos elevados.....	37
FIGURA 2.15 Esquema de la prueba de campo abierto utilizada en roedores.	38
FIGURA 2.16 Esquema general de la prueba de nado forzado.....	39
FIGURA 6.1 Esquema representativo del diseño experimental realizado en este trabajo. ...	45
FIGURA 6.2 Iniciadores utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas.....	53
FIGURA 7.1 Pesos registrados de la semana 0 y 8 en ratas alimentadas con dieta HFHC tras la ingesta de FOS y FOS-AL.	58
FIGURA 7.2 Índice de masa corporal en ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL durante 8 semanas.	59
FIGURA 7.3 Grosor del panículo adiposo en ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL durante 8 semanas.	60
FIGURA 7.4 Promedio del consumo de agua (mL) en ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL durante 8 semanas.	61
FIGURA 7.5 Aporte energético promedio de ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL.	62
FIGURA 7.6 Ingesta diaria de los grupos alimentados con croquetas (DN) y los grupos con síndrome metabólico y suplementados con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	62
FIGURA 7.7 Valores de presión en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.....	64

FIGURA 7.8 Curva de tolerancia a la glucosa en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	65
FIGURA 7.9 Valores de prueba de resistencia a la insulina en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL.	67
FIGURA 7.10 Registro de pesos de tejido adiposo epididimal, perirenal y visceral en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	69
FIGURA 7.11 Registro de pesos del tejido hepático en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	70
FIGURA 7.12 Efecto de la administración de FOS y FOS-AL en la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre en ratas con síndrome metabólico.	73
FIGURA 7.13 Densidad relativa de eNOS en tejido cardiaco de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	75
FIGURA 7.14 Densidad relativa de CAT en tejido cardiaco de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	76
FIGURA 7.15 Muestras de DNA en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. ..	77
FIGURA 7.16 Amplificación de sonda específico para lactobacilos con RT-PCR.	77
FIGURA 7.17 Amplificación de sonda específico para bacterias (E.coli) con RT-PCR.	78
FIGURA 7.18 Cuantificación relativa de lactobacilos y bacterias totales en muestras de heces de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	79
FIGURA 7.19 Tiempo de inmovilidad empleado en la prueba de nado forzado en ratas con síndrome metabólico suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	81
FIGURA 7.20 Tamaño de las microvellosidades después de la ingesta FOS y FOS-AL durante ocho semanas.	83
FIGURA 7.21 Fotografías de alta resolución de las microvellosidades del colon transverso de ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS-AL y FOS tomadas por un microscopio electrónico de barrido.	84

1 INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es una serie de anormalidades o desordenes metabólicos que contempla la resistencia a la insulina, aumento de circunferencia de cintura, dislipidemia e hipertensión arterial entre otras (Lizarzaburo, 2013) siendo uno de los problemas más graves en la actualidad ya que el 25% de la población mundial lo padece y de estos el 80% tiene el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus (ENSANUT, 2016).

Los prebióticos son carbohidratos no digeribles que pasan intactos por el tracto gastrointestinal para ser aprovechados por la microbiota intestinal en especial *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los cuales se les ha atribuyen beneficios en algunos padecimientos que están presentes en el SM.

El *Agave tequilana* Weber ha sido reconocido por su principal uso en la producción de tequila (García *et al.*, 2017) sin embargo los desechos generados no son aprovechados, encontrándose en ellos un alto contenido de fructooligosacáridos (FOS) ramificados en la cabeza del *Agave tequilana* los cuales presentan un posible uso como prebiótico (Iñiguez, 2001).

Algunos carbohidratos como los FOS al esterificarse con una ácido graso como el ácido láurico han presentado propiedades emulsificantes y surfactantes aplicables en la industria alimentaria (Casas *et al.*, 2016), manteniendo sus propiedades benéficas a la salud como lo es su capacidad prebiótica.

Por lo que en el presente estudio se evaluó los FOS esterificados con ácido láurico y FOS sin esterificar sobre los parámetros del síndrome metabólico inducido a través de una dieta alta en grasas y carbohidratos en un modelo murino.

2 ANTECEDENTES

2.1 Síndrome metabólico

En 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) denominó al conjunto de padecimientos como la obesidad (medida por índice de masa corporal (IMC) y/o relación cintura-cadera), hipertensión, hipertrigliceridemia, nivel de colesterol HDL bajo y microalbuminuria. con el término de síndrome metabólico (SM), la cual es una entidad que se diagnostica con criterios establecidos donde el paciente debe mostrar principalmente la resistencia a la insulina (RI) más dos factores de riesgo adicional mostrados en la TABLA 2.1. En esta tabla también se mencionan los criterios propuestos por algunas otras instituciones y asociaciones de la salud para un diagnóstico oportuno.

Cabe destacar que en la fisiopatología del SM, además de los factores de riesgo antes mencionados existen factores genéticos y ambientales, como los malos hábitos alimenticios donde se incluyen dietas con alto porcentaje de grasas saturadas, carbohidratos refinados, sodio y poca actividad física que coadyuvan en su desarrollo (Ferreira y Luengo, 2007).

En la actualidad el 75.2% de la población padece sobrepeso u obesidad, 19.5% Dislipidemia, 18.4% Hipertensión y 10.3% Diabetes (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018).

TABLA 2.1 Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico definidos por diferentes asociaciones.

Criterios	IDF	AHA	ATP-III
Prerrequisito	Obesidad central	-	-
Criterios requeridos	Obesidad central y al menos dos	3	3

Continúa TABLA 2.1

Obesidad central (cm de cintura)	Hombres > 90 cm Mujeres > 80 cm	Hombres > 102 cm Mujeres > 88	Hombres > 102 cm Mujeres > 88 cm
Alteración en el metabolismo de los carbohidratos	Glucemia en ayuno >100 mg/dL. (Incluidos pacientes con DM) ó en tratamiento de hiperglucemia.	Glucemia en ayuno >100 mg/dL. (Incluidos pacientes con DM) ó en tratamiento de hiperglucemia.	Glucosa en ayuno > 110 mg/dL (incluidos pacientes con DM).
Triglicéridos	>150 mg/dL ó en tratamiento para hipertrigliceridemia	>150 mg/dL ó en tratamiento para hipertrigliceridemia	>150 mg/dL
Presión arterial alta	>130/85 mm Hg ó en tratamiento para HAS	>130/85 mm Hg ó en tratamiento para HAS	>130/85 mm Hg
HDL colesterol bajo	Hombres < 40 mg/dL. Mujeres <50 mg/dL ó en tratamiento para HDL bajo	Hombres < 40 mg/dL. Mujeres <50 mg/dL ó en tratamiento para HDL bajo	Hombres < 40 mg/dl. Mujeres <50 mg/dL.

* Federación Internacional de Diabetes (IDF), Asociación Americana del Corazón (AHA) y Panel de tratamiento para adultos III (ATP III). Fuente: Pacheco y Jácquez 2017.

2.1.1 Componentes del síndrome metabólico

Los componentes que conforman el síndrome metabólico aún no están definidos, sin embargo algunas asociaciones como el Panel de tratamiento para Adultos (ATP III) han propuesto la obesidad abdominal como factor principal de esta patogénesis, la cual podría desencadenar los demás parámetros asociados como la resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión, colesterol HDL bajo, estrés oxidativo entre otros (Lizarzaburu, 2013).

2.1.1.1 Resistencia a la insulina

La insulina es una hormona anabólica secretada por las células β del páncreas en respuesta a diversos estímulos, siendo la glucosa el más relevante. Su principal función es mantener la homeostasis glicémica y de otros sustratos energéticos. De esta forma, posterior a cada comida la insulina suprime la liberación de ácidos grasos libres mientras que favorece la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo. Por otra parte, la insulina

inhibe la producción hepática de glucosa, mientras que promueve la captación de glucosa por el tejido muscular esquelético y adiposo. En un estado de RI, la acción de esta hormona a nivel celular está reducida, lo que aumenta la secreción de insulina. Esto permite compensar el defecto en la acción tisular y así mantener la homeostasis glicémica (Carrasco *et al.*, 2013). Sin embargo esto suele preceder a situaciones claramente patológicas como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ó el SM y está asociada a circunstancias como el sobrepeso y la obesidad (Ros y Medina, 2011). En presencia de obesidad, el tejido adiposo segrega una gran cantidad de adipoquinas, una de las más importantes es el factor de necrosis tumoral (TNF- α), asociado con la RI, al inducir un defecto en la capacidad de fosforilación de residuos de tirosina en el primer sustrato del receptor de insulina (IRS-1) necesaria para la progresión de la señal intracelular de la hormona. Por otra parte la TNF- α junto con otros factores aumenta la liberación de AGL (ácidos grasos libres) a partir del adipocito (sobre todo por el tejido adiposo visceral). Los AGL se encuentran fuertemente relacionados (como causa y consecuencia) en el desarrollo y progreso de la RI y DM2 (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.1.1.2 Obesidad

De acuerdo a la OMS, la obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por el aumento de la grasa corporal, asociada a un mayor riesgo para la salud. En la década de los años 40, el médico francés Jean Vague planteó que la distribución anatómica de la grasa corporal determinaba en forma distinta el riesgo de salud asociado a la obesidad, considerando la grasa abdominal ó grasa visceral como la de mayor riesgo (Moreno, 2012).

La grasa intra-abdominal medida por la circunferencia abdominal, se asocia de manera independiente con cada uno de los criterios del SM, y se sugiere que puede tener un papel central en la patogénesis del mismo (Pineda, 2008), dado que el tejido adiposo de los sujetos obesos se encuentra infiltrado por una cantidad significativamente superior de macrófagos que en los individuos normopesos. Estos macrófagos posiblemente son atraídos al tejido adiposo debido a la muerte de adipocitos hipertrofiados ó por la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL6) creando así un ambiente proinflamatorio. Estas citoquinas se encuentran involucradas en la RI, ya que entre otros mecanismos, interfieren

con la ruta de la señalización de la insulina, además de existir un estado de estrés oxidativo caracterizado por elevadas cantidades de especies reactivas de oxígeno, el cual se asocia con la RI y con la DM2, lo que adicionalmente permiten perpetuar el ambiente inflamatorio típico de la obesidad (Rodriguez *et al.*, 2009).

La clasificación actual de Obesidad propuesta por la OMS está basada en el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual corresponde a la relación entre el peso expresado en kilos y el cuadrado de la altura, expresada en metros. De esta manera, las personas cuyo cálculo de IMC sea igual o superior a 30 kg/m² se consideran obesas (TABLA 2.2).

TABLA 2.2 Clasificación de la obesidad conforme el IMC y su índice de riesgo a la salud.

Clasificación	IMC (Kg/m²)	Riesgo asociado a la salud
Desnutrición	< 18	-----
Peso normal	18.5 – 24.9	Ninguno
Exceso de peso	≥ 25	Promedio
Sobre Peso ó Pre-obeso	25 – 29.9	Aumentado
Obesidad grado I ó moderada	30 – 34.9	Aumento moderado
Obesidad grado II ó severa	35 – 39.9	Aumento severo
Obesidad grado III ó mórbida	≥ 40	Aumento muy severo

Fuente. Elaboración propia a partir de Moreno 2012.

2.1.1.3 Dislipidemia

Es la elevación anormal de la concentración de grasas en la sangre (colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). El colesterol- LDL es el encargado de transportar la mayoría de los lípidos por la sangre y distribuirlos a los tejidos. Cuando la circulación es excesiva, se acumula en las paredes de los vasos sanguíneos, con la consiguiente formación de placas arterioscleróticas que impiden el flujo normal de sangre hacia los tejidos. El colesterol-HDL reduce, reutiliza y

recicla el colesterol transportándolo al hígado donde puede ser reprocesado por medio de este mecanismo brinda mantenimiento a las paredes internas (endotelio) de los vasos sanguíneos protegiendo al organismo de sus efectos nocivos. El diagnóstico clínico de las dislipidemias se basa en los niveles séricos de las lipoproteínas y de sus lípidos (TABLA 2.3). Para pacientes con dislipidemia, el incremento del nivel del colesterol-HDL predice la regresión de la aterosclerosis y el nivel bajo de colesterol-HDL se relaciona con la ocurrencia de eventos cardiovasculares, aun cuando el colesterol-LDL sea inferior a 70 mg/dL (Canalizo *et al.*, 2013).

TABLA 2.3 Niveles de lípidos recomendados por el Panel de Tratamiento para Adultos III (ATP-III).

LÍPIDOS	NIVELES (mg/dL)	CATEGORÍA
Colesterol-LDL	< 100	Óptimo
	100 – 129	Deseable
	160 – 189	Alto
	≥ 190	Muy alto
Colesterol total	< 200	Deseable
	≥ 240	Alto
Colesterol-HDL	< 40	Bajo
	≥ 60	Alto
Triglicéridos	< 150	Normal
	200 – 499	Alto
	≥ 500	Muy alto

2.1.1.4 Presión arterial

Según la American Heart Association (AHA) la presión arterial es la fuerza ejercida por la sangre contra las paredes de los vasos sanguíneos y se mide en milímetros de mercurio (mm Hg) cuando ésta es mayor al rango normal (120/80 mm Hg) se le denomina hipertensión arterial (TABLA 2.4).

TABLA 2.4 Valores predeterminados de presión arterial propuestos por la Asociación Americana del Corazón (AHA siglas en ingles).

CATEGORIA DE LA PRESIÓN ARTERIAL	SISTÓLICA (mm Hg)		DIASTÓLICA (mm Hg)
Normal	< 120	y	< 80
Elevada	120 - 129	y	< 80
Presión arterial alta (Hipertensión I)	130 - 139	ó	80 – 89
Presión arterial alta (Hipertensión II)	≥ 140	ó	≥ 90
Crisis de hipertensión (Atención medica de inmediata).	> 180	y/o	> 120

*American Heart Association (AHA, 2017).

La insulina puede regular la presión arterial debido a la excreción renal de sodio y a través de ello podría expandir el volumen extracelular y la volemia (volumen total de sangre de un individuo), aumentando el gasto cardíaco y la resistencia periférica, que son los principales componentes reguladores de la presión arterial. Además, la hiperinsulinemia aumenta la vasoconstricción parcial de los vasos sanguíneos y altera los iones intracelulares (retención de Na^+ y Ca^{+2} y alcalosis), lo que aumenta la reactividad vascular y la proliferación celular. Todo lo anterior favorece la hipertensión (Maiz, 1997).

Dentro de los mecanismos que explican la regulación de la presión arterial está el sistema renina-angiotensina (SRA) (FIGURA 2.1), donde la angiotensina II influye significativamente en la absorción de sodio y agua por su capacidad de estimular a las células de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal para que sintetizen y segreguen aldosterona. De igual manera la angiotensina II estimula la sed y la secreción de hormona anti-diurética. Por lo cual tienen un papel fundamental en la regulación aguda y crónica de la presión arterial por medio de su influencia sobre la regulación sistémica endocrina (Santeliz *et al.*, 2008).

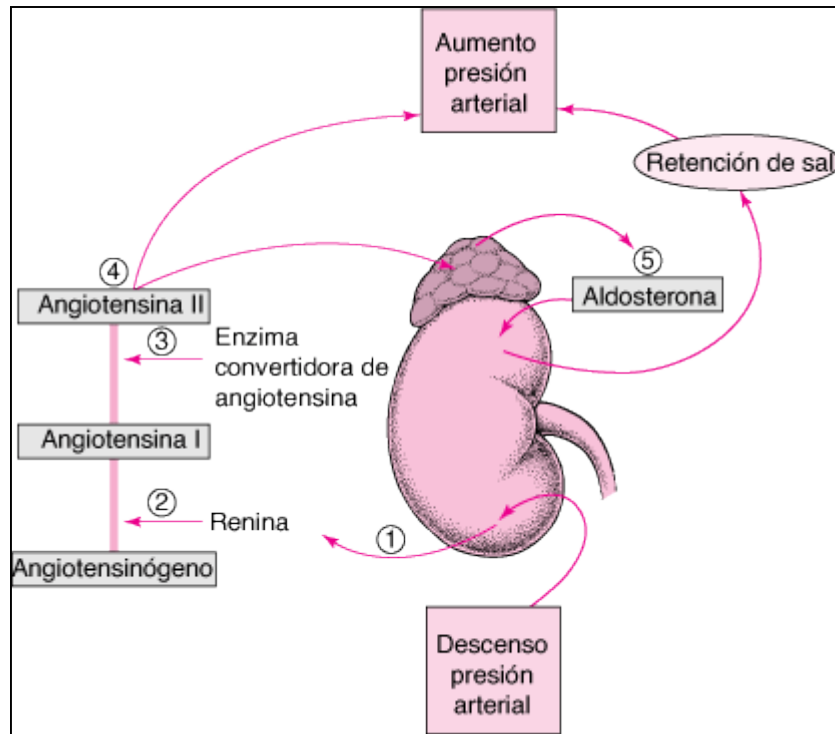


FIGURA 2.1 Esquema general del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

2.1.2 Estrés oxidativo

Se conoce como estrés oxidativo al incremento de radicales libres (RL) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), ácido hipocloroso ($HOCl$) y el radical hidroxilo (HO^\cdot) con respecto a las especies antioxidantes, lo cual genera daño celular y facilita la progresión de diversas enfermedades ó sus complicaciones (Gonzales *et al.* 2009).

Los radicales libres (RL) son especies químicas (átomos, iones o moléculas) con un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que le da una configuración espacial inestable y, por lo tanto, una gran capacidad de reaccionar con otras sustancias. Los RL del oxígeno (O_2) tienen un bajo peso molecular y se forman como consecuencia de reducciones univalentes subsecuentes del oxígeno; presentan una vida media muy corta y, por su naturaleza birradicálica, pueden reaccionar con las macromoléculas orgánicas modificando su estructura y función, por lo que son potencialmente citotóxicos y carcinógenos. Durante estas reacciones químicas se forman además, compuestos que no son RL del O_2 , pues no

presentan electrones impareados, pero que son sus precursores o moléculas intermedias en la formación de éstos y son también potencialmente dañinos. Los RL del O₂ y estas últimas sustancias se denominan, en su conjunto, especies reactivas del oxígeno (EROs). Una de las principales fuentes de generación de las ERO es la cadena respiratoria de electrones, a partir de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida (NADH). Las ERO también pueden generarse a partir de fuentes externas como la contaminación ambiental (Cruz *et al.*, 2010).

Por lo contrario existen sustancias que retardan ó previenen la oxidación ya que donan un electrón a los RL transformándolos en moléculas menos reactivas, evitando el daño en células y órganos a los cuales se les conoce como antioxidantes. Entre los antioxidantes más conocidos se encuentran los denominados antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT); además de los no enzimáticos como el ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos. (Corrales y Muñoz, 2012). En personas con estilos de vida sedentaria y malos hábitos alimenticios se ha encontrado un aumento de ERO en tejido adiposo, así como células pancreáticas y musculares, y una disminución tanto en la concentración como en la actividad enzimática de SOD, catalasa y GPX (Baez *et al.*, 2011). El estrés oxidativo generado por el aumento de ERO y la disminución de especies antioxidantes da paso a la producción de citocinas, lo cual inicia una respuesta inflamatoria y por ende una alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, siendo este un posible inicio de la modificación en la secreción de insulina por las células pancreáticas.

2.1.2.1 Antioxidantes enzimáticos

El sistema de defensa antioxidante de las células vivas, constituye un mecanismo adaptativo de gran relevancia, destacándose las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).

2.1.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Metaloenzima que tiene una amplia distribución en el organismo humano. Esta enzima, se encuentra en cuatro isoformas: SOD1 o SOD CuZn: homodímero de cobre y zinc que se encuentra en el espacio citoplasmático intracelular, SOD2 o SODmn: tetrámero que contiene manganeso en su sitio activo y se encuentra en la matriz mitocondrial, SOD3 o ECSOD: Es un tetrámero que contiene cobre y zinc y posee un péptido señalizador que la direcciona hacia el espacio extracelular. Sin embargo, su papel en los diferentes estados fisiológicos, hasta ahora no está del todo claro y SODFe: contiene hierro y se encuentra en bacterias, algas y vegetales.

Esta enzima cataliza la reacción de destrucción del anión superóxido, mediante la transformación de éste en peróxido de hidrógeno (dismutación del O_2^-) (FIGURA 2.2), el cual puede ser destruido a su vez por la actividad de la catalasa o de la glutatión peroxidasa. Su presencia es imprescindible en todos los organismos aerobios. (Cruz *et al.*, 2010).

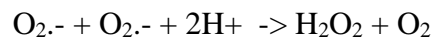


FIGURA 2.2 Esquema de reacción química realizado por la enzima SOD en la célula.

2.1.2.1.2 Catalasa (CAT)

Es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula con amplia distribución en el organismo. Su presencia es abundante en hígado y riñón, pero escasa en tejido conectivo y epitelios, y prácticamente nula en tejido nervioso. De localización intracelular (mitocondrias, peroxisomas, citosol). Es una de las enzimas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H_2O_2 bajo ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 , (FIGURA 2.3) para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior. Con dadores de H^+ como metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles presenta actividad peroxidasa (Corrales y Muñoz, 2012).

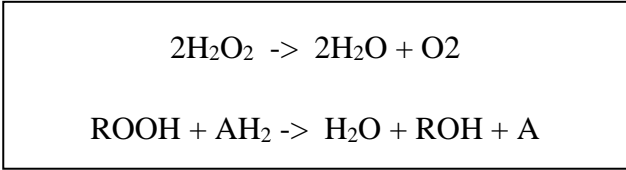


FIGURA 2.3 Esquema de reacción química realizada por la enzima CAT en la célula.

Por lo tanto, el H_2O_2 es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la catalasa y otras peroxidasa. En animales, el peróxido de hidrógeno se detoxifica mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Cruz *et al.*, 2010).

2.1.2.1.3 Glutatión peroxidasa (GPX)

Está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de seleno-cisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GPX comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2) (FIGURA 2.4) usando glutatión reducido (GSH), y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (Corrales y Muñoz, 2012).

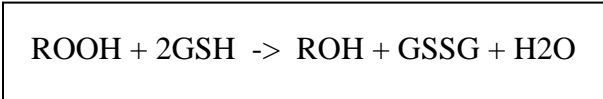


FIGURA 2.4 Esquema general de la reacción realizada por GPX en la célula.

Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPX en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, el nivel de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido. La GPX citosólica ó mitocondrial (GPX1) reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H_2O_2 a expensas del glutatión. La GPX1 y la GPX4 (PHGPX o fosfolípido hidroperóxido

GPX) se encuentran en más tejidos. La GPX4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana. PHGPX puede reducir directamente los hidroperóxidos de los fosfolípidos, peróxidos de ácidos grasos y hidroperóxidos de colesterol, que se producen en las membranas peroxidadas y en las lipoproteínas oxidadas. La GPX1 se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón e hígado, y la GPX4 se expresa mayoritariamente en células del epitelio renal y en los testículos. La GPX2 citosólica (o GPX-G1) y la GPX3 extracelular (o GPX-P) se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente. Recientemente se ha encontrado un nuevo miembro, la GPX5, que es independiente de selenio y se expresa específicamente en el epidídimo de ratón. El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, pero la catalasa es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo. En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H_2O_2 es la GPX, ya que la catalasa presenta mucha menos afinidad por el H_2O_2 (Corrales y Muñoz, 2012).

2.1.2.1.4 Óxido nítrico sintasa (NOS)

El compuesto óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por una familia de enzimas conocidas Óxido Nítrico Sintetas (NOS), unas de las isoformas es la NOS endotelial (eNOS) la cual es dependiente de Ca^{2+} y se expresa constitutivamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Busse y Mülsch, 1990) y en el riñón participando en la regulación de la presión arterial (Rees *et al.*, 1989). En el riñón no sólo se expresa la isoforma endotelial de la NOS, sino también las isoformas neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). Estas dos últimas son más conocidas por su presencia en el sistema nervioso y en el sistema inmune, respectivamente (Nava, 1998).

El NO liberado por la célula endotelial activa en la célula muscular lisa la enzima guanilato ciclasa que cataliza la formación de GMP cíclico responsable de la relajación de la fibra lisa.

Algunos estudios realizados en ratas muestran que las variaciones de presión arterial afectan directamente la producción de NOS en tejido endotelial, ya que cuando se reduce la presión arterial la concentración de NOS disminuye (hipotensión) y por lo contrario si la

presión llegase a aumentar la concentración de NOS aumenta (hipertensión) (Nava *et al.*, 1996).

2.2 Alimento funcional

La Asociación Dietética Americana (ADA siglas en inglés) definió los alimentos funcionales como alimentos que son "enteros, fortificados, enriquecidos o mejorados y que deben consumirse como parte de una dieta variada de forma regular, a niveles efectivos para que los consumidores cosechen sus beneficios potenciales para la salud (ADA, 1999).

Existe una amplia gama de nutrientes y otros elementos que pueden estar presentes en los alimentos funcionales tales como vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos entre otros (Cencic y Chingwaru, 2010). Algunos ejemplos de alimentos funcionales más comunes son las bebidas lácteas en donde se han añadido bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para proteger y mantener una buena salud intestinal, aunque a veces la adición de bacterias vivas tiene algunos problemas tecnológicos como la contaminación y podrían aparecer efectos secundarios. Por estas razones se ha recurrido a sustancias que estén de manera natural en los alimentos ó que pueden añadirse a éstos favoreciendo tanto la presencia como la función metabólica de los microorganismos. Tal es el caso de los prebióticos, componentes no digeribles que al ingerirse promueven el crecimiento y establecimiento de microorganismos beneficiosos de la flora intestinal (Ferrer y Dalmau, 2001).

En 1991 el gobierno japonés introdujo y legisló el concepto de alimentos para usos específicos en el fomento de la salud (Foods for Specified Health Use, FOSHU) que incluía a 12 clases de ingredientes como favorecedores de la salud, entre los que se incluyeron a los compuestos prebióticos como los fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), sojaoligosacáridos (SOS) y palatinosaoligosacáridos. En 1996 la lista de FOSHU incluía un total de 58 alimentos aprobados, de los cuales 34 reúnen a oligosacáridos como ingredientes funcionales (Pérez *et al.* 2004).

2.2.1 Prebióticos como parte del alimento funcional

La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO siglas en inglés) define como “prebiótico, al ingrediente alimentario o parte de él (no digerible) que posee un efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud”.

Los hidratos de carbono no digeribles (oligosacáridos y polisacáridos), algunos péptidos, proteínas, y ciertos lípidos (ésteres y éteres) son considerados como prebióticos (Pérez *et al.* 2004).

La FAO considera un alimento como prebiótico si cumple con las siguientes características:

- Resistencia a la acidez gástrica: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es modificado por la acidez estomacal.
- Resistencia a la hidrólisis por enzimas de mamíferos: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es afectado por enzimas presentes en la saliva, así como enzimas pancreáticas e intestinales.
- Resistencia a la absorción gastrointestinal: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no se absorbe a nivel del epitelio intestinal.
- Fermentación por la microflora intestinal.
- Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales benéficas que contribuyen a la salud y bienestar: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico es utilizado como nutriente selectivamente por la microflora intestinal considerada benéfica. Deberá observarse crecimiento de bacterias benéficas y no deberá observarse crecimiento de otra microflora intestinal.

Estas características ayudan a proliferar y mantener en equilibrio la microbiota intestinal que coloniza el intestino humano la cual se considera un nuevo factor implicado en la obesidad y las enfermedades asociadas, por su influencia en las funciones metabólicas e inmunológicas del huésped (Sanz *et al.*, 2009).

En las formulas infantiles, se utilizan como prebióticos los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS), aparte del ácido siálico, en una proporción de 90:10, 90% del GOS de cadena corta y 10% de FOS de cadena larga, generalmente. Esta combinación favorece el desarrollo de flora intestinal semejante a la que se encuentra en lactantes alimentados con leche materna, con predominio de bifidobacterias y lactobacilos (Chirido *et al.*, 2011).

2.3 Microbiota intestinal

La microbiota intestinal (MI) o también llamada microflora intestinal es un consorcio de microorganismos de diferentes filos, destacando los anaerobios estrictos (90%) como Firmicutes y Bacteroides y un 10 % de Actinobacterias (*Bifidobacterium*) y Proteobacterias (*Eschericia*). Estos microorganismos anidan en el tracto gastrointestinal con una distribución no homogénea a lo largo del tubo digestivo, ya que la colonización y persistencia de determinadas poblaciones bacterianas en diferentes tramos del intestino, va a depender de un equilibrio entre los mecanismos defensivos de éste (la saliva con la lisozima, ácido gástrico, secreción de inmunoglobulinas (IgA), sales biliares, secreciones proteolíticas pancreáticas, el propio moco intestinal que actúa a modo de barrera, la tolerancia inmunológica del huésped, etc.) y la capacidad de estas bacterias de sobrevivir a dichas condiciones extremas. Por lo tanto el control del crecimiento bacteriano nunca es absoluto, estableciéndose diferentes nichos a lo largo del mismo destacando que su crecimiento es nulo en el esófago y máximo en el colon (Draganov, 2009).

Sin embargo, las variaciones de la dieta pueden conducir a un desequilibrio alterando la composición de la microbiota original como en el caso de la obesidad, diabetes y SM (FIGURA 2.5). Los prebióticos, probióticos, o trasplantes fecales pueden modificar o restablecer la microbiota, ya que esta tiene influencia en la fisiología del hospedador debido a sus interacciones con los procesos metabólicos, al igual que forma parte de la barrera intestinal, evitando la anidación y penetración de patógenos, y la de modular el sistema inmunitario al igual que interviene en la angiogénesis intestinal, incluso en la interacción entre el sistema nervioso central y el entérico (Hernández *et al.*, 2015).

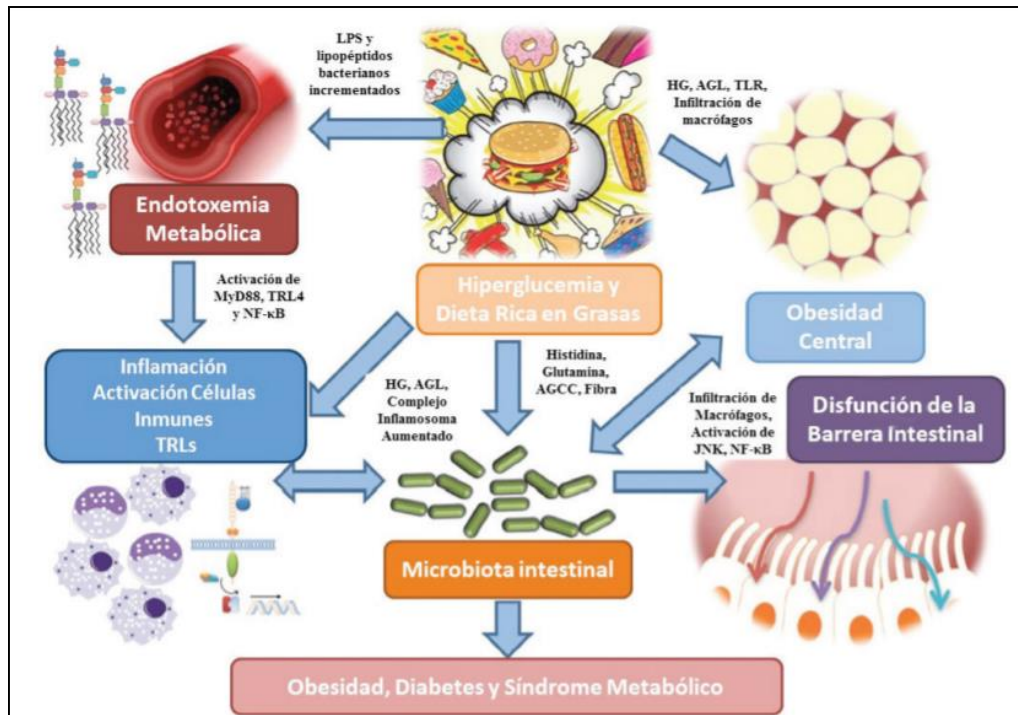


FIGURA 2.5 Relación de la microbiota intestinal con algunos factores del síndrome metabólico (Deveraj, 2013).

2.3.1 Microvellosidades en el epitelio intestinal

El epitelio intestinal (FIGURA 2.6) está formado por diversos tipos de células especializadas. El epitelio del intestino delgado forma vellosidades que alternan con criptas, mientras que el epitelio del intestino grueso es plano con invaginaciones o criptas. El epitelio esta en renovación constante durante toda la vida a partir de células madre localizadas en las criptas a media altura. Las células absortivas o enterocitos y las caliciformes (secretoras de mucus) migran hacia la parte superior de las vellosidades, mientras que las entero-endocrinas (que participan en la regulación de la función intestinal), las células de Paneth (que secretan sustancias antimicrobianas y hormonas) y las células M (células epiteliales modificadas que participan en la presentación de antígenos) están localizadas en la base de las vellosidades y sobre folículos linfoides asociados a las placas de Peyer (Hernández *et al.*, 2015).

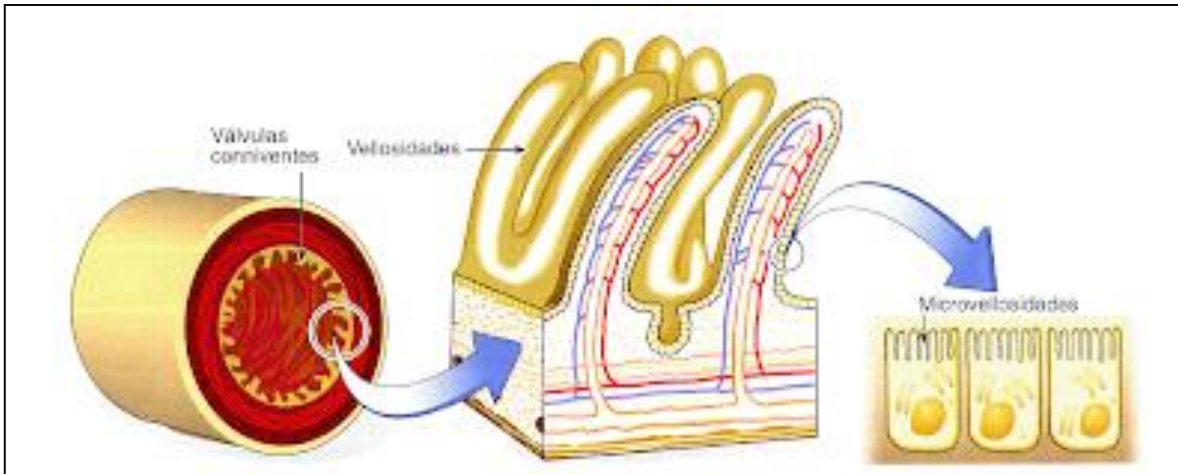


FIGURA 2.6 Esquema ilustrativo del epitelio intestinal.

La capacidad del intestino para absorber alimento, y en parte también para digerirlo, está determinada por la longitud del intestino, tamaño, densidad y disposición de las vellosidades intestinales y también por el tamaño y densidad de las micro vellosidades de los enterocitos (Milles *et al.*, 2006). Se ha reportado que los fructanos, podrían afectar al desarrollo intestinal, tanto a nivel macroscópico (longitud del intestino), como microscópico (tamaño y densidad de vellosidades y microvellosidades) (Isabel *et al.*, 2014).

2.3.1.1 Cambios en las microvellosidades por la alimentación con fructanos

Algunas investigaciones sobre los efectos de los fructanos y otros prebióticos en la dieta han demostrado que en estudios histomorfométricos de la mucosa intestinal existe un incremento de la longitud de las vellosidades, tal es el caso de pollos alimentados con pienso suplementado con FOS (1-4 g/kg) (Sonmez y Eren, 1999; Xu *et al.*, 2003). Rebolé *et al.* (2010) observaron un incremento en el cociente longitud de la vellosidad/profundidad de la cripta en pollos alimentados con una ración suplementada con inulina (10 g/kg), en comparación con el grupo control. En cambio, Rehman *et al.* (2007) observaron que en los pollos que consumían inulina la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas de la mucosa del yeyuno aumentaban, pero no se modificaba el cociente longitud de la vellosidad/profundidad de la cripta. Algunos autores han relacionado estos cambios en las vellosidades con variaciones en la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

en el intestino. Williams *et al.* (2008) señalaron que la formación de AGCC a partir de los carbohidratos fermentables son importantes para el mantenimiento de la morfología e integridad funcional del epitelio del colon. Se considera al butirato la principal fuente de energía para los colonocitos, induciendo una mayor proliferación celular en las criptas de Lieberkühn de la mucosa colorrectal e ileal (Topping y Clifton, 2001). Una técnica particularmente útil para estudiar la densidad y disposición de las vellosidades, es la microscopía electrónica de barrido. Rebolé *et al.* (2010) observaron mediante esta técnica que los pollos suplementados con inulina mostraban una disposición en zigzag en las vellosidades del yeyuno, similar a una ola. Las vellosidades organizadas de esta forma son más eficaces para la absorción de nutrientes que las dispuestas en paralelo o al azar, ya que favorecen un mayor contacto entre el quimo y el epitelio de la mucosa intestinal (Yamauchi e Isshiki, 1991).

El tamaño y la densidad de las microvellosidades es otro factor a considerar en la capacidad del intestino para digerir y absorber alimentos. Rebolé *et al.* (2010) no encontraron a nivel del yeyuno modificaciones en la longitud, la anchura, ni en la densidad de las microvellosidades en pollos de 35 días de edad alimentados con inulina (20 g/kg pienso) por lo que no mejoró el factor de amplificación de la superficie intestinal. Por el contrario, Xu *et al.* (2003), observaron un incremento en la longitud de las microvellosidades del yeyuno en pollos alimentados con una ración suplementada con 4 g/kg de FOS durante 49 días atribuyéndolo a la capacidad que tienen los FOS de crear en el intestino un ambiente microbiano más favorable, más que a una acción directa sobre el tejido intestinal.

2.3.2 Efectos benéficos de la microbiota intestinal en el síndrome metabólico

La fermentación de hidratos de carbono no digeribles se lleva a cabo por el hospedero principalmente en el ciego y colon derecho. Constituye una fuente de energía importante para la proliferación bacteriana, y además produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico. Los dos primeros se absorben a la circulación portal llegando sin modificarse al hígado y el tercero es empleado por los colonocitos como fuente de energía. El acetato se utiliza para la síntesis de colesterol y la

lipogénesis en el hígado. El propionato actúa como inhibidor competitivo del transporte del acetato hacia el interior de los hepatocitos. Esto explica que animales de experimentación alimentados con determinados hidratos de carbono, reduzcan los niveles de colesterol sérico y hepático. El acetato y el propionato también intervienen en el metabolismo hepático de la glucosa, reduciendo la glucosa postprandial y la respuesta insulínica (Turnbaugh *et al.*, 2006). Otras sustancias producidas son etanol y ácido láctico. Todos ellos contribuyen a acidificar el colon proximal y el ciego (pH 5.5-5.9) favorece la absorción de otros oligoelementos, como el hierro, calcio y magnesio, y mejoran la biodisponibilidad del zinc, cobre y fósforo. También, se generan gases, como el dióxido de carbono, metano e hidrógeno, que pueden ser expulsados en el aire espirado y, en su mayoría, por las heces, al igual que, al menos, el 10% de los AGCC originados por las bacterias (Hernández *et al.*, 2015).

2.4 *Agave tequilana* Weber variedad azul

El *Agave tequilana* Weber variedad azul pertenece al subgénero *Agave* y a la sección *Rigidae*, a la cual también pertenecen una gran cantidad de especies fibreras y mezcaleras que se extienden en México y Centroamérica. Este grupo es reconocible por la forma de sus hojas angostas y muy rígidas (Gonzales, 2012). La parte aérea de la planta está integrada por dos fracciones principales: hojas y tallo. El tallo y las bases de las hojas que se unen a él comprenden la porción conocida con el nombre de cabeza o piña (Iñiguez *et al.*, 2001), la cual una vez cosechada se utiliza para la producción de tequila.

La producción de tequila en México está regida por una Norma Internacional llamada Denominación de origen “Tequila”, la cual determina las regiones donde se puede producir con el fin de proteger la comercialización y la calidad del producto. Estas regiones incluyen 124 Municipios de Jalisco, 7 de Guanajuato, 29 de Michoacán, 8 de Nayarit y 11 de Tamaulipas. Cabe destacar que en estas regiones el 100% de la superficie cultivada pertenece a la variedad *Agave azul* (SAGARPA, 2015).

A pesar del que el *Agave tequilana* Weber var. azul destaca como un cultivo con importancia agronómica en México por ser la materia prima principal para la elaboración del tequila, los desechos que esta industria genera se han convertido en un problema, sin

embargo, el residuo de esta extracción posee un alto contenido de fructanos (Lamas *et al.*, 2004). Cabe destacar que la FDA otorgó la distinción GRAS (Generally Recognized As Safe) en el año 2011 a los fructanos extraídos de *Agave tequilana* Weber var. azul de la zona de Tlaquepaque Jalisco, misma que se renovó en el año 2016.

Los fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul tienen una estructura compleja y altamente ramificada como se muestra en la FIGURA 2.7. De acuerdo a su grado de polimerización (GP) se pueden encontrar oligosacáridos del tipo inulina, neoinulina y como componente principal graminanos (poseen una glucosa externa) y neofructanos (poseen una glucosa interna). Por esta razón, este tipo de fructanos también se conoce como "agavinas" (Toriz *et al.* 2007) en comparación de los que se encuentran en la achicoria considerados como tipo "inulina" (FIGURA 2.8). En el *Agave tequilana* los mayores rendimientos en la producción de fructanos se reporta en plantas de seis a ocho años de edad, con GP promedio de diez a trece unidades (FIGURA 2.9) (Luna, 2010). Márquez *et al.* (2013) reportan fructanos de *Agave tequilana* con GP de tres a veintinueve unidades.

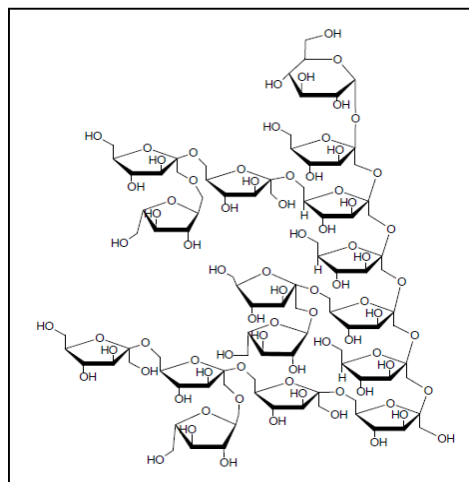


FIGURA 2.7 Estructura propuesta para los fructanos de *Agave tequilana* W.

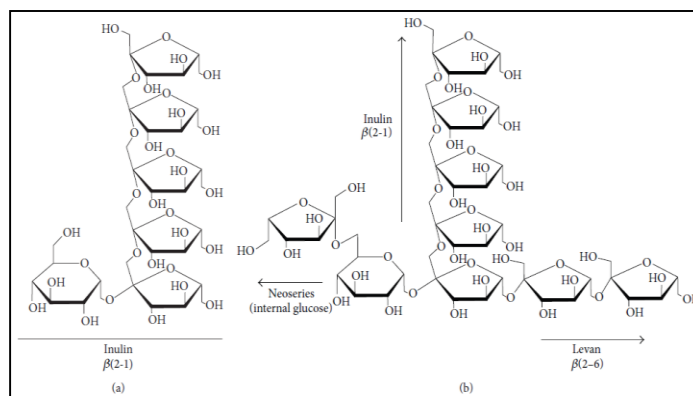


FIGURA 2.8 Estructuras representadas de los fructanos, a) Inulina y b) Agavina.

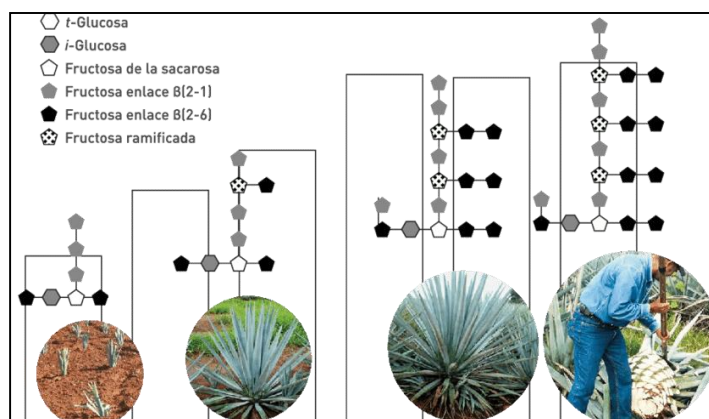


FIGURA 2.9 Diferentes grados de polimerización de fructanos de Agave tequilana a lo largo de su ciclo de vida.

2.4.1 Fructanos y fructooligosacáridos

Se les denomina fructanos a cualquier carbohidrato constituido mayoritariamente por enlaces fructosil-fructosa ó fructopiranosil por enlaces β (2-1 ó 2-6) y una glucosa acoplada por enlaces α (1-2) (Benkeblia, 2013). Las fructosas pueden unirse tanto a la glucosa como a la fructosa generando una gran diversidad de sacáridos donde destacan los fructooligosacáridos (FOS), que son los de menor GP, de entre dos a diez unidades monoméricas de fructosa, mientras que el término fructano se utiliza de forma general a los de mayor GP.

Su solubilidad en agua condiciona la formación de geles viscosos en el intestino, favoreciendo la absorción de agua y sodio. Desde el punto de vista fisiológico intestinal, estas fibras retrasan el vaciamiento gástrico y enlentecen el tránsito intestinal, por lo que se

les atribuye efecto astringente, hipolipemiante y disminución de la respuesta glucémica. A su vez, se caracterizan por ser rápidamente degradadas por la microbiota intestinal (Olagnero *et al.*, 2007).

Existen diversas fuentes vegetales que producen fructanos, sin embargo, solo tres son altamente explotadas en la industria alimentaria: agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul), alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y achicoria (*Cichorium intybus*) (Aguirre *et al.*, 2013).

En la naturaleza las plantas utilizan los fructanos como carbohidratos de almacenamiento para épocas de sequía y frío extremo. Se distinguen principalmente cinco clases estructurales de fructanos (FIGURA 2.10): inulina, levana, mezclas de fructanos ramificados, neoserias de inulina y neoserias de levana. Estos se encuentran aproximadamente en el 15 % de especies de plantas de floración pertenecientes a las familias monocotiledóneas y dicotiledóneas de climas templados y áridos (González, 2012).

Actualmente a los fructanos se les han asociado una serie de funciones en beneficio de la salud, destacando su efecto como prebiótico además facilitan la disponibilidad de minerales, el fortalecimiento de los mecanismos de defensa y el mejoramiento del metabolismo de lípidos, así como la prevención de ciertas enfermedades relacionadas con la MI (Ulloa *et al.*, 2010).

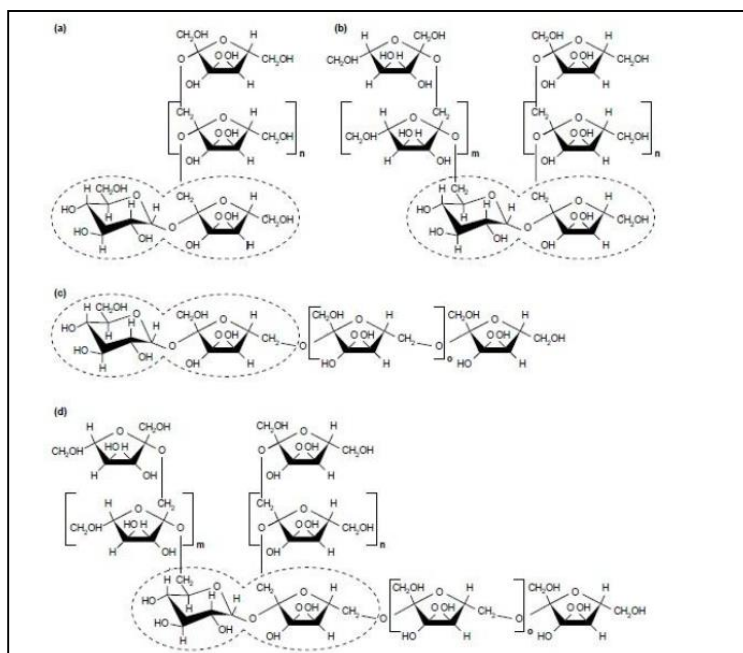


FIGURA 2.10 Diferentes estructuras de fructanos.

2.4.1.1 Efectos benéficos de los fructanos y fructooligosacáridos en el síndrome metabólico

En personas sanas, la ingesta de inulina o fructooligosacáridos (FOS) (15 g/día) en la dieta durante dos semanas, produjo un incremento significativo de bifidobacterias en heces, al igual que una disminución en la producción de *Bacterioides*, *Clostridium* y Fusobacterias (Escudero *et al.*, 2006). Tasayco (2007) administró a ratas Wistar con DM tipo 2 y tipo 1 una dosis entre 500 y 1000 mg/kg de peso corporal de FOS provenientes del extracto hidroalcohólico de las raíces de yacón, demostrando actividad hipoglucemiante en ratas con DM tipo 2, sin actividad en ratas con DM tipo 1. La suplementación en la dieta con 5% de FOS p/p disminuye un 12% la esteatosis hepática en ratas zucker obesas después de 100 días de administración (Kaume *et al.*, 2011).

Los fructanos de agave de menor longitud de cadena estimulan mejor el crecimiento de lactobacilos los cuales generan algunos ácidos como el acético, propiónico y butírico, reportados como responsables de efectos positivos en la salud (Urias y López, 2004). Los fructanos de Agave sp. disminuyen los niveles de glucosa y colesterol sérico (Mellado y López, 2013). Algunos estudios han demostrado que la administración de fructanos en

roedores con obesidad inducida por dieta alta en grasas han sufrido disminución del peso corporal, disminución de grasa abdominal, colesterol total, triglicéridos, glucosa en ayuno, esteatosis hepática, así como, aumento en el recuento de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp en las heces fecales (Aguirre *et al.*, 2013; Aguirre *et al.*, 2016).

La alimentación con 10% de oligofruktosa en ratas disminuye las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Delzenne, 2001). La oligofruktosa administrada a ratas a una dosis del 10% durante 30 días reduce la glucemia y la insulinemia posprandiales en un 7% y un 26%, respectivamente (Kaume, 2011). Haubert *et al.* (2015) analizaron la reducción de lípidos en hígado y tejido cardíaco en ratas con hígado graso no alcohólico inducido a través de dieta alta en carbohidratos (70% sacarosa). Posterior a la inducción se trató con una dieta suplementada con 10g de FOS/100g de dieta estándar, donde disminuyó el peso del hígado (11.7 ± 0.9 vs 11.5 ± 2.0) y la grasa hepática (1.25 ± 0.5 vs 0.70 ± 0.1).

2.5 Ácidos grasos saturados de cadena media

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos conformados por una cadena hidrocarbonada de longitud variable desde cuatro carbonos hasta treinta seis (FIGURA 2.11). Dependiendo del número de carbonos de la cadena se les denomina ácidos grasos de cadena corta (AGCC) si tienen de cuatro a seis carbonos, de cadena media (AGCM) si tienen de ocho a doce carbonos y de cadena larga (AGCL) si tienen 14 a 18 carbonos (Ortega, 2002).

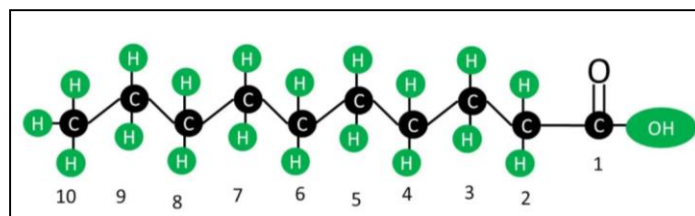


FIGURA 2.11 Estructura general de los ácidos grasos.

Otra clasificación es tomando en cuenta su estructura química, donde se denominan ácidos grasos saturados (AGS) si no contiene dobles enlaces (todos los enlaces de la molécula son sencillos), ácidos grasos monoinsaturados (AGM) si contienen un doble enlace en su estructura y ácidos grasos polinsaturados (AGP) si contienen más de un doble enlace. Existen ácidos grasos esenciales los cuales no pueden ser sintetizados en el organismo debido a la falta de enzimas, por lo cual deben ser ingeridos a través de la dieta, ejemplos de estos son los que pertenecen a la familia omega 3 y 6 denominados así porque el primer doble enlace se encuentra en el carbono 3 y 6 respectivamente, contando a partir del extremo metilo terminal de la molécula (Ros *et al.*, 2015).

2.5.1 Ácido láurico

El ácido láurico es un ácido graso saturado de cadena media (C12:0) (FIGURA 2.12), presente en los aceites de coco, palmiste y palma hasta en un 50% por lo que son llamados aceites láuricos. Su nombre sistemático es ácido dodecanoico, posee un peso molecular de 200.32, un punto de ebullición de 225°C y un punto de fusión de 44°C. También es insoluble en agua y soluble en etanol (Radzuan *et al.*, 1999). Dentro de los aceites comestibles tienen alta estabilidad contra la oxidación y está considerado dentro de la categoría de “Sustancia Generalmente Reconocida como Segura” (GRAS siglas en inglés), desde el año 1987 por el Colegio Americano de Toxicología y más recientemente por la FDA desde el año 2008.

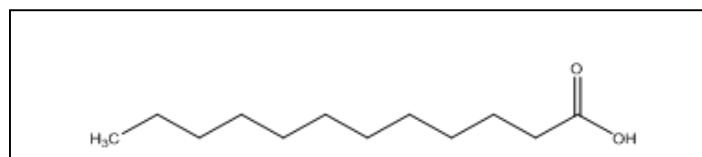


FIGURA 2.12 Estructura lineal del ácido láurico.

2.5.2 Efectos encontrados de los ácidos grasos de cadena media en la salud

El ácido láurico tiene la capacidad de provocar el proceso de termogénesis ya que se transporta fácilmente por la membrana mitocondrial donde activa la proteína UCP-1

(Termogenina) generando energía de la degradación del tejido adiposo marrón (BAT). Esta energía se libera en forma de calor ayudando a la pérdida de peso por lo que se considera como un mecanismo para la prevención de la obesidad (Tremblay *et al.*, 2013). Shabalina *et al.*, (2008) mostraron que los AGCM eran potentes activadores de UCP-1. Portillo *et al.*, (1998) demostraron que una dieta a base de aceite de coco en ratas resulta efectiva para estimular la expresión de UCP-1 y disminuir la grasa blanca. Assuncao *et al.*, (2009) realizaron un estudio con 40 mujeres donde por 12 semanas se suministró una dieta que incluía aceite de coco y aceite de soya y se demostró que las mujeres que consumieron aceite de coco redujeron su circunferencia abdominal y no causó dislipidemia. Algunos estudios sugieren que el ácido láurico podría aumentar las concentraciones de HDL en mayor proporción que el ácido palmítico y que el consumo de ácidos grasos de cadena media no se asociaría significativamente con el aumento de contraer enfermedades cardiovasculares (Mora, 2003).

El ácido láurico es aprovechado como fuente de energía y por lo tanto, no está disponible para su incorporación en la grasa del cuerpo ni para la síntesis de colesterol (Parrotta, 1993). Esto se debe a que el mecanismo de los ácidos grasos de cadena media (AGCM) es suprimir la deposición de grasa a través de termogénesis y oxidación de grasas además de que ofrecen la ventaja terapéutica de preservar la sensibilidad a la insulina en modelos de animales con DM2 (Nagao y Yanagita, 2010). La explicación podría deberse a la longitud de la cadena media que hace a la molécula más soluble en comparación con una cadena de ácido graso larga, brindándole una rápida y fácil absorción en la ruta metabólica (De Lany *et al.*, 2000). La naturaleza fisicoquímica de los AGCM les permiten pasar por la vía vena-porta hacia el hígado para ser metabolizados a través de la β oxidación sin necesidad de reesterificación intestinal, incorporación de quilomicrones o del transporte intramitocondrial de la enzima carnitina aciltransferasa (Poppitt *et al.*, 2010). En comparación, los ácidos grasos de cadena larga tienen un ritmo más lento, siendo reesterificados en el intestino delgado y transportados por quilomicrones a través del sistema linfático y vascular antes de ser oxidados para producir energía o de lo contrario almacenarse (Poppitt *et al.*, 2010). Por lo tanto, el metabolismo de los AGCM reduce su oportunidad de captación al tejido adiposo (Karen *et al.*, 2014). Los estudios en animales y seres humanos han demostrado aumento del gasto de energía y oxidación de lípidos con

AGCM, en comparación con los de cadena larga (Ferreira *et al.*, 2014). Otro posible beneficio de la oxidación de los AGCM es el aumento de la saciedad, lo que reduce la ingesta de alimentos, por lo tanto, tiene el potencial de generar un balance de energía negativo y como consecuencia la pérdida de peso a largo plazo (Karen *et al.*, 2014). El tejido adiposo también juega un papel importante en la regulación de la glucosa, por lo que la disminución de peso por disminución de grasa, también refleja mejoría en la homeostasis de la glucosa en modelos murinos con DM2 (Nagao y Yanagita, 2010).

Kabara (2001) encontró que algunos ácidos grasos y sus monoglicéridos pueden destruir o inactivar algunos microorganismos patógenos, tal es el caso de la monolaurina, monoglicérido del ácido láurico que destruye la bicapa lipídica de virus, bacterias, protozoos y hongos mediante diferentes mecanismos: en los virus, evita su ensamble y maduración y hace más fluidos los lípidos y fosfolípidos de la bicapa, mientras que en las bacterias, interfiere con las señales de traducción o de formación de toxinas. Dentro de las cepas que puede inactivar o destruir se encuentran virus como los del VIH, herpes simple, hepatitis C, citomegalovirus e influenza, bacterias patógenas como *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus*, levaduras como *Candida albicans*, y protozoos como *Giardia lamblia*, por lo que podría fungir como un agente de regulación en la microflora intestinal.

2.6 Carbohidratos de ésteres de ácidos grasos (CFAE)

Los surfactantes o tensoactivos son un grupo de sustancias que se concentran en la interface entre el aceite y el agua, de tal manera que logran reducir la tensión superficial o interfacial, generando una emulsión más estable (Kralova, 2009). Pueden interactuar con otros ingredientes como almidón, proteínas y lípidos, son ampliamente utilizados en la panadería, confitería, productos lácteos, grasas, aceites, salsas, mantequillas, margarinas, helados, licores de cremas, cárnicos, en el café, goma de mascar, bebidas, chocolates entre otros (Lerner, 2015).

Algunos surfactantes de síntesis química se asocian con la disminución de la hidrofobicidad de la mucosa intestinal, aumentando la permeabilidad intestinal, de igual manera algunos autores encontraron que los surfactantes sintéticos podrían causar disfunción de la barrera intestinal (Ilbäck *et al.*, 2004; Csáki, 2011 y Roberts *et al.*, 2013).

Los surfactantes de base biológica se caracterizan por ser obtenidos a partir de recursos renovables y que pueden ser utilizados como alternativos a los surfactantes petroquímicos. Estos surfactantes biológicos son sintetizados por esterificación, usando como materias primas carbohidratos y ácidos grasos, generalmente de fuentes alimentarias, dando como resultado mono, di y tri ésteres donde sus propiedades pueden ser ajustadas controlando el grado de esterificación y la naturaleza del ácido graso y el carbohidrato, por lo que poseen un amplio espectro de aplicación. Un ejemplo de estos “nuevos” surfactantes de base biológica son los generados a partir de los ésteres de ácido láurico con los carbohidratos de los FOS de agave, también conocidos como carbohidratos de ésteres de ácidos grasos (CFAE) (Sabeder, 2006).

En la generación de los CFAE, el desafío es unir la molécula de carbohidrato a un derivado de grasa o aceite debido a sus diferentes naturalezas y su falta de miscibilidad, ya que los carbohidratos son hidrofílicos y las grasas son hidrófobas. Los carbohidratos más utilizados han sido la sacarosa y glucosa, que se encuentran entre los más baratos y abundantes en la naturaleza. Entre los reactivos hidrofóbicos utilizados están los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de aceite de colza o de coco (cuyo ácido graso mayoritario es el ácido láurico). El proceso de producción de FAME consiste en la transesterificación de triglicéridos con metanol, usando, por ejemplo, metóxido de sodio como catalizador, el producto final es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos, y también se produce glicerol (Queneau, 2008).

Los CFAE pueden sintetizarse químicamente a través del uso de solventes como ftalato de dimetilo (DMP) o dimetilformamida (DMF) a 90-95 °C, durante 9 a 12 horas, bajo una presión de 80-100 mm Hg. También pueden producirse por síntesis enzimática mediante el uso principalmente de lipasas inmovilizadas de *Candida antarctica* o *Rhizomucor miehei*. Estas reacciones se llevan a cabo en condiciones suaves a temperaturas entre 50-70 °C, con disolventes menos dañinos como 2-metil-2-butanol, acetona y metil-etil cetona, que minimizan las reacciones secundarias, aunque se aumenten los tiempos de reacción (Sabeder, 2006).

En este trabajo se estudia los CFAE esterificados a partir de Agave azul y ácido láurico (FIGURA 2.13) a través de la enzima inmovilizada *Candida antártica*, bajo

agitación rotativa a 60°C durante 96 h (Casas *et al.*, 2016). Estos CFAE fueron evaluados como emulsificantes en una proporción al 0.5% en una solución conformada por aceite oliva (O) (90%) y agua (W)(10%), logrando mantener la emulsión estable durante un tiempo más prolongado que el control (solo O/W 90:10% sin CFAE). Su seguridad in vitro fue evaluada por pruebas de mutagenicidad en las cepas *S. typhimurium* TA98 o TA100 (prueba AMES) sin inducir mutación (Casas *et al.*, 2016), sin embargo es pertinente profundizar en su aplicación como surfactantes de base biológica y su efecto en modelos in vivo sobre marcadores como los que conforman el SM y la microbiota intestinal.

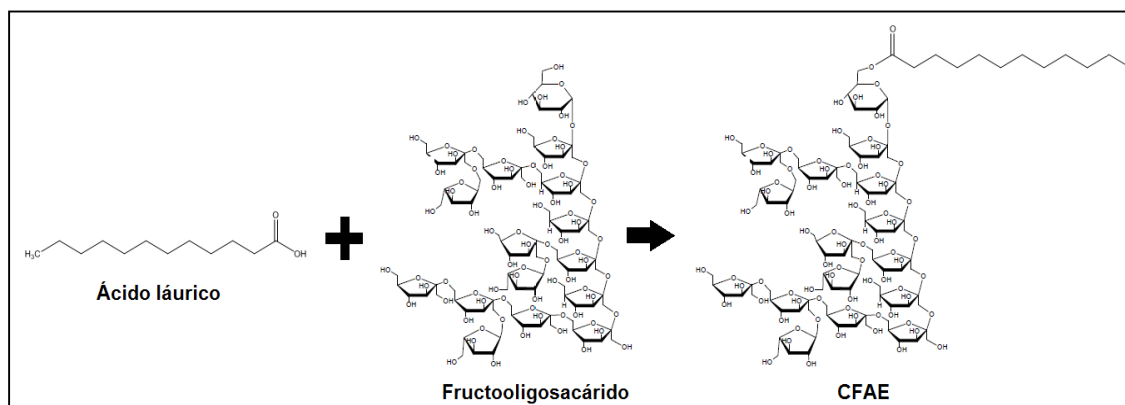


FIGURA 2.13 Esquema general de la esterificación de FOS y ácido láurico para la formación de FOS-AL.

2.6.1 Ensayos de biotoxicidad

Según la FAO los bioensayos son una prueba en la cual un tejido vivo, un organismo o un grupo de organismos son usados como agente para la determinación de la potencia de alguna sustancia fisiológicamente activa de acción desconocida.

2.6.1.1 Bioensayo con artemia salina

En la actualidad la aplicación de sistemas de barrido rápidos y sencillos, tales como los bioensayos, han demostrado ser herramientas valiosas para investigar la capacidad toxicogénica de algunos compuestos de origen natural (Sanchez y Neira, 2005).

La *Artemia salina* es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica. Se ha utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos donde se ha estudiado su biología y uso potencial en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales. Por lo que el ensayo de artemia se ha utilizado para la determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) o del porcentaje de mortalidad que produce una sustancia, mostrando una buena correlación con las pruebas de citotoxicidad (Pino *et al.*, 2010).

El ensayo de *Artemia* tiene las ventajas de ser más rápido (24 h), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20 mg o menos). Además, no se requiere suero animal, necesario para otras pruebas de citotoxicidad. Este sistema de bioensayo es muy utilizado por farmacólogos y químicos enfocados en el estudio de productos naturales, dado su reproducibilidad y fácil manejo. Así mismo los compuestos aislados en la fitoquímica sobre todo los de reciente exploración, pueden someterse a esta prueba para detectar su toxicidad y dar seguimiento a modelos biológicos más complejos o de lo contrario detectar la dosis en la que pueden ser perjudiciales (Pino *et al.*, 2010).

2.6.1.2 Prueba de Ames

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica (ANMAT) define al ensayo de *Salmonella*-fracción microsomal (o test de Ames) como una prueba *in vitro* que permite evaluar el potencial efecto mutagénico de compuestos químicos o productos biológicos como una medida indirecta del posible efecto carcinogénico sobre seres humanos. Esta prueba utiliza varias cepas de *Salmonella thyphimurium* auxótrofas para el aminoácido histidina, que poseen distintas mutaciones en genes del operón histidina. Esas mutaciones son el blanco para mutágenos que producen daño al ADN por diferentes mecanismos. Cuando esas cepas de *Salmonella* se siembran sobre placas de medio mínimo-glucosa (placas MG) que contienen trazas de histidina, sólo pueden crecer en él las bacterias que revirtieron al fenotipo his⁺. El número de colonias revertantes por placa

producidas en forma espontánea es relativamente constante para cada cepa. Por eso cuando se agrega un mutágeno a la placa, el número de colonias revertantes aumenta de manera dependiente de la dosis de dicho mutágeno. Como las bacterias son incapaces de metabolizar productos químicos mediante citocromos P₄₅₀, como los mamíferos y otros vertebrados, un componente clave del ensayo es el agregar un sistema exógeno de activación metabólica; habitualmente se emplea la fracción microsomal de hígado de rata (Maron y Ames, 1982; ANMAT, 2001).

2.7 Modelos murinos

Se denomina como modelo a los animales producidos y mantenidos bajo condiciones controladas de laboratorio bajo la norma NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio) a los cuales se les conoce genéticamente y bioquímicamente. Estos modelos al tener respuestas similares al del ser humano sirven como base para el estudio de diferentes fármacos, alimentos, enfermedades, entre otras dando resultados confiables y reproducibles para el ser humano (Karimi, 2012).

Existen dos tipos de modelos con respecto al análisis de enfermedades los:

- Modelos animales experimentales que se inducen.
- Modelos animales espontáneos que nacen con la enfermedad ó la desarrollan en su ciclo de vida.

Los modelos más usados en el laboratorio son los experimentales (inducidos) estos son animales sanos en los que la condición (generalmente enfermedad) se les induce experimentalmente. Los modelos inducidos de trastornos metabólicos incluyen manipulación genética, intervención dietética, cirugía, aplicación de xenobióticos (drogas o toxinas) ó una combinación de ellos. El uso de modelos animales ayuda a comprender de mejor manera los factores biológicos que afectan al ser humano, permitiendo obtener una gran cantidad de información valiosa para la patogénesis de la enfermedad que con el humano sería difícil debido a la heterogeneidad genética, una esperanza de vida larga, una

amplia diversidad de estilos de vida, relativa inaccesibilidad a tejidos y órganos y, por supuesto, consideraciones de tipo ético (Arias y Balibrea, 2007).

Si bien los resultados obtenidos en los animales de laboratorio no son directamente extrapolables al humano, ofrece una serie de ventajas como (Fernández, 2012):

- Al tratarse de un mamífero, salvando las diferencias lógicas, gran parte de los procesos bioquímicos y fisiológicos son muy similares.
- Tiene un tiempo generacional muy corto y un alto índice reproductivo, su talla es pequeña y son relativamente dóciles.
- Se puede controlar con relativa facilidad las variables ambientales, más precisamente el macro y microambiente, fundamentales para el desarrollo correcto de los experimentos, permitiendo su fácil reproductividad, su mantenimiento en cautiverio es cómodo y económico.
- Existe una gran cantidad de líneas definidas genéticamente, como las consanguíneas y congénicas además de cientos de mutaciones y un gran número de re-arreglos cromosómicos disponibles, para producir líneas de individuos genéticamente idénticos.
- Se conocen los mapas genéticos así como la secuencia completa del genoma; al publicarse el primer mapa detallado del genoma del ratón se halló que al menos el 80% del ADN de los ratones es idéntico al de los humanos.

Dado lo anterior los modelos in vivo más utilizados son los roedores, principalmente el ratón y la rata por su corto tiempo generacional, alto desarrollo reproductivo y fácil mantenimiento. La rata es utilizada en investigaciones nutricionales, conductuales y endocrinológicas. El conejo es utilizado fundamentalmente en la producción de antisueros, farmacología, toxicología, teratogenicidad y reproducción. Los cobayos son modelos de estudios inmunológicos, farmacológicos y nutricionales. El hamster se utiliza fundamentalmente en la reproducción, citogénesis e inmunología (Robledo, 2014).

2.7.1 Dietas para la inducción del síndrome metabólico

Como se mencionó con anterioridad el SM es la agrupación de factores de riesgo como enfermedades cardiovasculares y DM2. Estos factores incluyen obesidad central, presión arterial elevada, alteración de la tolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y dislipidemia (Panchal *et al.*, 2011).

Las ratas alimentadas con dietas altas en carbohidratos (HC), por ejemplo con sacarosa o fructosa desarrollan hipertensión, dislipidemia, y alteración de la tolerancia a la glucosa, pero no logran desarrollar obesidad central. Por el contrario las dietas altas en grasa (HF) inducen una marcada obesidad central y dislipidemia. Sin embargo los marcadores involucrados en el desarrollo de SM en los seres humanos son mucho más complejos, por lo tanto, una combinación de alto contenido de carbohidratos con alto contenido de grasa en la dieta de los roedores puede ser más relevante para imitar la dieta responsable del SM en humanos. Una dieta HCHF en ratas indujo síntomas como hipertensión, dislipidemia, alteración de la tolerancia a la glucosa, exceso de deposición de grasa, aumento de marcadores proinflamatorios y disminución de las defensas antioxidantes (Panchal *et al.*, 2011).

2.7.1.1 Dieta alta en grasas

Muchos investigadores han empleado diferentes tipos de dietas HF que varían entre 20 y 60% de la energía total. La fuente de energía principal puede ser aceite derivado de plantas (maíz, alazor o aceite de oliva) o grasas derivadas de animales (por ejemplo, cebo de carne y manteca de cerdo). Estas dietas se han usado ampliamente para inducir SM en modelos animales, específicamente inducir obesidad. Los estudios también han indicado que la dieta HF es efectiva en promover la hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y aumento de los ácidos grasos libres en la sangre, ya sea de forma independiente o concurrentemente (Kuan *et al.* 2016).

2.7.1.2 Dieta alta en carbohidratos

Los carbohidratos son la fuente principal de energía en los seres vivos pero al tener una ingesta excesiva de ellos y una vida sedentaria, el cuerpo almacena esta energía de sobra en forma de grasa, ocasionando insulinoresistencia y obesidad. Existen estudios donde se han utilizado dietas HC, HF y HCHF (TABLA 2.5) para inducir el SM en modelos animales. Un ejemplo de esta dieta consiste en 39.5% de leche condensada endulzada, 20% de cebo de vaca, 17.5% de fructuosa, 15.5% de alimento en polvo para ratas, 2.5% mezclas de sal y 5% de agua. Con esta dieta los animales desarrollan hipertensión, intolerancia a la glucosa, aumento en la grasa y circunferencia abdominal y muestran un perfil lipídico alterado después de 16va semana. Otros investigadores modificaron la dieta a 35% de leche condensada endulzada, 20% de cebo de cerdo, 17.5% de fructuosa, 20% de comida de rata en polvo, 2.5% de mezclas de sales y 5% de agua con resultados similares (Kuan *et al.* 2016).

TABLA 2.5 Dietas propuestas para la inducción del síndrome metabólico en ratas Wistar.

Tipo de dieta	Tiempo de tratamiento	Componentes del SM				Referencias
		Obesidad	Hiperglucemia	Hipertensión	Dislipidemia	
Bebiendo agua con fructuosa	8 semanas	*	*	*	*	Mamikutty <i>et al.</i> , 2014.
Bebiendo agua con sacarosa al 30%	21 semanas	*	-	*	*	Aguilera <i>et al.</i> , 2004.
Alta en grasa	8 semanas	*	*	-	*	Ganchava <i>et al.</i> , 2015.
Alta en grasa	10 semanas	*	*	*	*	Suman <i>et al.</i> , 2016.

Continúa TABLA 2.5

Alta en grasa y carbohidratos	16 semanas	*	*	*	*	Poudyal <i>et al.</i> , 2010.
Alta en grasa y carbohidratos	16 semanas	*	*	*	*	Panchal <i>et al.</i> , 2011.
Alta en grasa y carbohidratos	14 semanas	*	*	*	*	Hao <i>et al.</i> , 2015.
Alta en grasa y alta en fructuosa	8 semanas	*	*	-	*	Ganchava <i>et al.</i> , 2015.

* Indica que está presente en los análisis, (X) que no se encontró en los análisis y (-) que no se hicieron mediciones de ese padecimiento (Kuan *et al.* 2016).

2.7.2 Pruebas conductuales

Las investigaciones con modelos animales permiten imitar los procesos psicológicos normales y anormales como síntomas o síndromes psicopatológicos humanos y tratamientos para estas enfermedades (Laborda, 2009), debido a que algunos mecanismos básicos son compartidos entre las diferentes especies.

Existen dos tipos de modelos de respuesta:

- Modelos de respuesta condicionada: El cual se basa en la capacidad de responder ante un estímulo con la respuesta específica a otro estímulo. Ejemplo de estos son las pruebas con toques eléctricos.
- Modelos de respuesta no condicionada: Los cuales miden la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos. Ejemplo de estos son las pruebas de laberinto de brazos elevados, campo abierto y nado forzado.

2.7.2.1 Prueba de laberinto de brazos elevados

Uno de los modelos más utilizados en las investigaciones sobre ansiedad en animales, es el laberinto de brazos elevados ya que ayuda en la comprensión de algunos

estados emocionales y en la identificación de los efectos de fármacos ansiolíticos (Carobrez y Bertoglio, 2005).

El aparato está diseñado en forma de cruz con dos brazos abiertos y dos cerrados de las mismas dimensiones, opuestos entre sí y separados por un área central en forma de cuadro (10 x 10), elevado a 50 centímetros del suelo (FIGURA 2.14) (Pellow *et al.*, 1985). Es un modelo no condicionado incluye espacios abiertos y cerrados donde se puede analizar la conducta innata de los roedores conflictuando su preferencia hacia espacios cerrados y su necesidad de exploración en espacios abiertos (García *et al.*, 2005). Por lo anterior, la prueba permite a los observadores detectar conductas que incluyen elementos de neofobia, exploración y el conflicto de aproximarse o evadir los brazos abiertos (Kumar *et al.*, 2013).

En esta prueba, son considerados indicadores de ansiedad la frecuencia de entradas y tiempo pasado en los brazos: cuanto menor sea la exploración de los brazos abiertos mayor será el grado de ansiedad (Pellow *et al.*, 1985; Barros *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2006). La prueba dura 5 min, tiempo suficiente para observar modificaciones conductuales (Walf y Frye, 2007). Cuando los animales son tratados con sustancias con actividad ansiolítica, exploran con mayor frecuencia y por más tiempo los brazos abiertos (Becerra *et al.*, 2007) lo que se interpreta como una disminución de la ansiedad. Por lo tanto, este modelo se utiliza para evaluar conductas similares a las que se observan en la condición humana, permitiendo identificar sustancias con posibles efectos terapéuticos relacionados con el tratamiento de la ansiedad (Fernández, 2017).



FIGURA 2.14 Equipo utilizado en la prueba de laberinto de brazos elevados.

2.7.2.2 Prueba de campo abierto

El Campo Abierto conocido en inglés como Open Field Test (OF siglas en inglés), es una de las pruebas más populares en psicología, que busca evaluar la reacción de los sujetos a un acontecimiento estresante (Belzung y Griebel, 2001). Fue creada por Hall (1934) quien la utilizó para evaluar la emocionalidad en ratas midiendo la defecación y la orina, al igual que la actividad en el campo en un área circular iluminada aproximadamente 1.2m de diámetro cerrado por un muro de 0.45 m de altura (FIGURA 2.15). La prueba consiste en la medición de conductas que se producen al colocar un sujeto en un espacio abierto nuevo, en donde escapar está impedido por un muro que lo rodea. El animal se puede colocar en el centro o cerca de las paredes del aparato, y se observa durante 2 a 20 minutos, haciendo que sea una prueba sencilla, fácil y rápida de medir, además que los comportamientos a evaluar son claros de determinar (Walsh y Cummins, 1976; Prut y Belzung, 2003). Estos movimientos son:

- Distancia recorrida, deambulación, levantarse, intentos de fuga, tiempo sin movimiento entre otros.
- Ubicaciones a las zonas de campo, a las paredes y a los estímulos con que interactuar.

- Movimientos corporales en cuanto a manipulación de objetos, olfateo, rascarse, excavar, acicalarse, exploración visual entre otros.

Además esta técnica permite realizar medidas del sistema nervioso autónomo (defecación, micción, frecuencia cardíaca y ritmo, y respiración (Becerra *et al.*, 2007; Prut y Belzung, 2003; Walsh y Cummins, 1976). Desde sus inicios ha sido una herramienta de uso común para la medición del comportamiento animal, usándose en una gran variedad de especies, incluyendo terneros, cerdos, corderos, conejos, pollos, primates, bebes, abejas y langostas, de modo que no solo ha sido utilizado para evaluar ansiedad, sino la sedación o la actividad (Prut y Belzung, 2003).

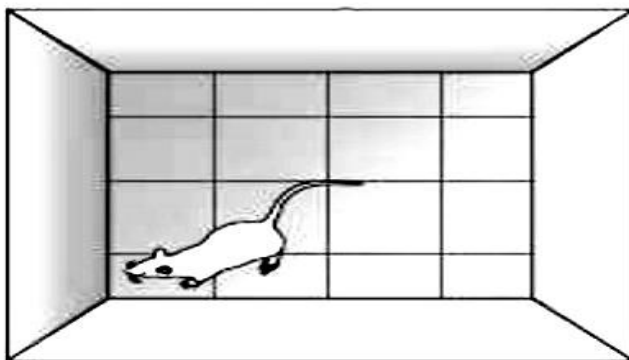


FIGURA 2.15 Esquema de la prueba de campo abierto utilizada en roedores.

2.7.2.3 Prueba de nado forzado

Es un modelo desarrollado en ratas y ratones. Esta prueba es utilizada para evaluar la actividad de los antidepresivos preclínicos. El uso generalizado de este modelo es en gran medida resultado de su facilidad de uso además de la fiabilidad de los resultados de la prueba en el laboratorio así como, la capacidad para detectar un amplio espectro de agentes antidepresivos. La prueba se basa en la observación de los movimientos de escape de las ratas, por ejemplo, si desarrollan una postura inmóvil cuando se colocan en un recipiente con agua (FIGURA 2.16), se cree que reflejan bien un fracaso de la persistencia de la conducta dirigida de escape (es decir desesperanza). En un esfuerzo por aumentar la sensibilidad de la prueba de nado forzado tradicional en la rata, (Vieyra *et al.*, 2000)

realizan modificaciones como el aumento de la profundidad del agua a 30 cm, siendo anteriormente de 15-18 cm y el control de la temperatura del agua durante la prueba ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$).

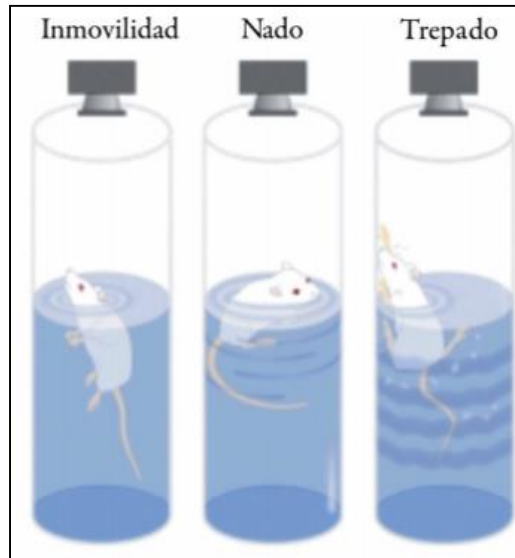


FIGURA 2.16 Esquema general de la prueba de nado forzado.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el 25% de la población mundial padece SM y cuatro de cada diez mexicanos son diagnosticados con este problema de salud por lo que es necesario encontrar alternativas no farmacológicas que mejoren la calidad de vida de los pacientes, es por ello que este trabajo se enfoca en evaluar los efectos de los CFAE y FOS del agave como compuestos funcionales sobre el SM inducido en ratas Wistar a través de una dieta alta en grasas y carbohidratos.

4 HIPÓTESIS

El compuesto generado por la esterificación de fructooligosacáridos de *Agave tequilana* Weber var. azul y ácido láurico (CFAE) tendrá efectos positivos en la salud de las ratas con SM a comparación de las ratas no tratadas con CFAE.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la administración de CFAE y FOS sobre el modelo murino de SM inducido por dieta HCHF.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la suplementación de los fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (CFAE) en comparación con los fructooligosacáridos sin esterificar (FOS) sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos en el modelo murino.
- Determinar la expresión de enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, GPX3 y CAT) en riñón e hígado tras la administración de los CFAE y FOS.
- Determinar la relación de lactobacilos y bifidobacterias en heces de ratas con SM y administradas con CFAE y FOS.
- Identificar cambios en el comportamiento conductual de ratas suplementadas con CFAE y FOS en una dieta HFHC.

6 MATERIALES Y METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

Se emplearon FOS de *Agave tequilana* Weber var. Azul y FOS esterificados con ácido láurico proporcionados por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Como modelo biológico se utilizaron Ratas Wistar macho con 21 días de edad provenientes de la Universidad Cristóbal Colón campus Calasanz.

6.2 Animales y condiciones de vivienda

Las especificaciones técnicas para la producción, tratamiento, cuidado, uso y eutanasia de los animales de laboratorio están predeterminadas por la NOM-062-ZOO-1999 y cumplió con la Guía para el Cuidado de Animales de Laboratorio del Consejo Mexicano y Directrices del Comité Internacional.

Las ratas Wistar se alojaron en jaulas metálicas individuales colocadas sobre una superficie elevada de 0,75 m. Las virutas de madera usadas como ropa de cama se reemplazaron cada 2 días. Se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad (luces encendidas: 19:00-07:00 h y luces apagadas: 07:00-19:00 h). Todos los procedimientos experimentales en las ratas se llevaron a cabo durante el ciclo oscuro (ya que estos animales son nocturnos). La temperatura ambiente promedio fue de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.3 Bioensayo con *Artemia salina*

Los huevos de artemia salina se incubaron en una solución de sal marina a temperatura ambiente durante 48 h. Las muestras de FOS y FOS esterificado se llevaron a concentraciones de 1000, 500 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, solubilizadas en solución de sal marina y se dejaron durante 24 h a temperatura ambiente.

La prueba se realizó en pequeñas placas Petri de vidrio de 5 cm de diámetro con diez larvas por caja, el volumen de agua de mar que se tomó con las larvas no excedió de los 0,05mL. Posteriormente 5 mL de las concentraciones respectivas del compuesto (ya aclimatado a 25°C) se añadieron a las placas. Después de 24 horas, se determinó el número de larvas muertas en cada placa Petri. La larva se consideró muerta cuando no se observó movimiento de los apéndices durante 10 segundos.

6.4 Composición de la dieta para inducción del síndrome metabólico

Los componentes de las dietas empleadas para el grupo sano (testigo) y los grupos con SM, así como el aporte calórico se muestran en la TABLA 6.1.

TABLA 6.1 Composición de la dieta alta en grasas y carbohidratos para la inducción del síndrome metabólico.

Cantidad suministrada en gramos	Componentes de la dieta (HFHC)
175	Fructuosa
395	Leche condensada
200	Mantequilla
155	Alimento para ratas purina 5001
25	Mezcla de sales Hubble, Mendel y Wakeman.
50	De agua/kilogramos de dieta

TABLA 6.2 Composición nutricional de las dietas testigo y síndrome metabólico.

COMPONENTES g/100g	DIETA ESTÁNDAR	HFHC
Proteínas	23.00	10.00
Carbohidratos	49.00	59.00
Grasa	3.00	20.00
Fibra	8.00	3.50
Minerales	7.00	4.60
Humedad	12.00	6.00
Energía (kJ/g)	13.18	19.08

6.5 Especificaciones de distribución y tiempo de inducción del síndrome metabólico

Se emplearon veinte ratas Wistar macho distribuidas en cuatro grupos (N=5) Grupo 1 “testigo sano” (DN) a los cuales solo se les alimento con una dieta normal a base de croquetas y agua. Grupo 2 “testigo enfermo” (SM) a los cuales se les indujo el SM alimentándolos con la dieta HCHF a partir de la semana uno hasta el término del estudio. Grupo 3 “FOS” el cual consumió una dieta HCHF y se suplemento al mismo tiempo con una dosis intragástrica diaria de FOS (70 mg por cada kg de peso de roedor, correspondiente al 70% en el que se encuentra en el CFAE). Grupo 4 “FOS-AL” consumió dieta HCHF para la inducción del SM y se suplemento con una dosis intragástrica de FOS esterificados (100 mg por kg de peso de roedor) FIGURA 6.1. Después de una semana de adaptación, diariamente se administró una dosis de FOS y FOS esterificados a los grupos 2 al 4 respectivamente. Tanto el agua como el alimento se proporcionaron ad libitum.

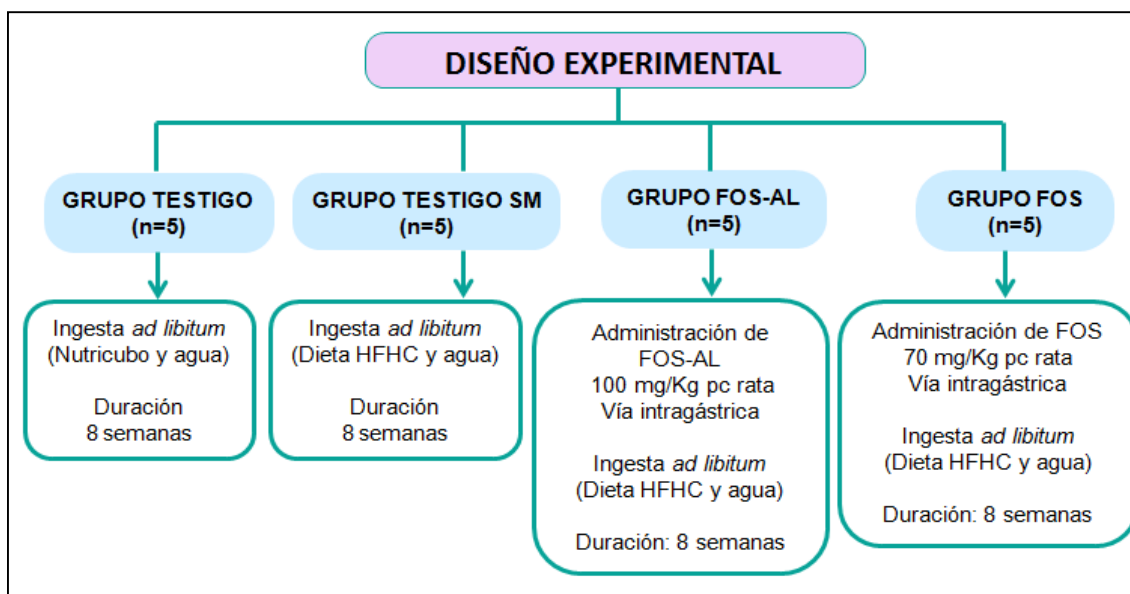


FIGURA 6.1 Esquema representativo del diseño experimental realizado en este trabajo.

6.6 Determinaciones biométricas y nutricionales

La circunferencia abdominal (AC), la longitud corporal y el peso se midieron cada semana. El peso corporal y la longitud corporal se usaron para determinar el índice de masa corporal (IMC), índice Lee y tasa específica de ganancia de masa corporal. El volumen de consumo de agua y el peso del alimento se registraron diariamente. En base a la ingesta de alimento se calculó el consumo de energía (kJ/día) y la eficiencia de la alimentación (%FE). Los procedimientos se realizaron siguiendo los métodos de Novelli, 2007 y Nery, 2011.

6.7 Comportamiento conductual

Todas las pruebas conductuales fueron filmadas con una cámara Sony, DCR-SR85, 2000x optical zoom, para posteriormente cuantificar las variables de interés mediante un programa elaborado para registros conductuales, hasta llegar a un porcentaje de concordancia de al menos el 95% (por dos observadores independientes).

6.7.1 Prueba de laberinto de brazos elevados

Para esta prueba se montó el equipo (FIGURA 2.14). Esta prueba se realizó en un cuarto aislado con iluminación de 40 lux y consistió en colocar a la rata en el centro del laberinto y llevar un conteo del número de entradas y salidas en los dos tipos de brazo (abierto y cerrado), así como también el tiempo de permanencia en ellos. Para fortalecer el análisis conductual también se evaluaron otras dos conductas: el head-dipping (es el movimiento innato de exploración en el roedor, en donde este agacha la cabeza como “asomándose” y olfatea) y el attempts (es el intento de salir o caminar pero sin hacerlo), en tiempo y frecuencia.

Los animales fueron colocados cuidadosamente en el centro del aparato, con la cabeza en dirección hacia un brazo abierto. La prueba tuvo una duración de 5 min y se evaluaron las siguientes variables: a) tiempo de permanencia en los brazos abiertos (en segundos); b) número de entradas a los brazos abiertos; c) el número total de entradas a los brazos (abiertos + cerrados); d) el porcentaje de entradas a los brazos abiertos; e) el índice de ansiedad (IA) y f) la evaluación de riesgo (head-dipping y attempts). Para la conducta de

evaluación de riesgo se contabilizó el número de eventos y el tiempo empleado en dichas conductas. El índice de ansiedad (Ec.1) fue calculado de acuerdo a Cohen *et al.* (2013) de la siguiente manera:

$$IA = 1 - \left(\frac{\left(\frac{\text{Tiempo en brazos abiertos}}{\text{Tiempo total}} \right) + \left(\frac{\# \text{ de entrada a brazos abiertos}}{\# \text{ total de cruces a los brazos}} \right)}{2} \right)$$

ECUACIÓN 6.1.- Ecuación empleada para medir el índice de ansiedad en roedores.

Se consideró que la rata entraba a alguno de los brazos únicamente cuando tres cuartas partes de su cuerpo estuvieran dentro del brazo respectivo. Al finalizar cada prueba los brazos del laberinto fueron limpiados cuidadosamente con solución al 15% de etanol, con la finalidad de evitar que existieran alteraciones conductuales inmediatas atribuibles a los estímulos sensoriales producidos por sustancias volátiles presentes en la orina o defecaciones de la rata evaluada previamente y que pudieran contaminar los resultados (Gutiérrez-García y Contreras, 2002).

6.7.2 Prueba de campo abierto

La prueba se realizó inmediatamente después de la prueba de laberinto de brazos elevados. La caja utilizada para esta prueba mide 44 x 33 cm y está hecha de vidrio opaco, con el piso delineado en 12 cuadros de 11x 11 cm (Rodríguez *et al.*, 2009). Las variables evaluadas fueron: a) el número de cuadros cruzados, que corresponde a las veces que una rata cruza de un cuadro a otro con al menos tres cuartas partes de su cuerpo, lo cual es considerado como un indicador de motricidad, b) el tiempo de conducta vertical, que es la suma de los periodos en los cuales la rata adquiere una postura vertical sostenida sobre sus patas traseras y c) tiempo de acicalamiento, que son los periodos de tiempo (segundos) dirigidos al auto-aseo.

6.7.3 Prueba de nado forzado

La prueba consistió en introducir a las ratas de manera individual en un estanque de vidrio (40x30x50cm). El estanque tiene forma cuadrangular y fue llenado con agua a 25°C \pm 1°C a una altura de 25 cm aproximadamente, altura que no les permite tocar el fondo con sus extremidades posteriores, donde no existe la posibilidad de escapar. Se utilizó el modelo propuesto por Borsini (1995), en el cual la prueba tiene una duración de 6 min, se analizan únicamente los últimos 4 min, y sólo se evaluó el tiempo total de inmovilidad, que es la suma de los periodos en los cuales la rata permanece realizando movimientos mínimos que le permiten mantenerse a flote, pero sin desplazamientos.

6.8 Biomarcadores del síndrome metabólico

6.8.1 Presión sanguínea

Se determinó a la octava semana del tratamiento usando el método pletismográfico en la arteria de la cola. Los animales fueron sometidos a un proceso de adaptación de tres días antes de las mediciones, el cual se realizó en una habitación libre de ruido con luz y temperatura controladas (Ramírez *et al.*, 2014)

6.8.2 Prueba de tolerancia a la glucosa

La prueba de tolerancia a la glucosa se realizó en la semana 8 del período experimental. Después de un ayuno nocturno (8 h), las ratas fueron administradas vía intraperitoneal (ip) con una solución de D-glucosa (2.5 g / kg de peso de rata) y la concentración de glucosa en sangre se midió en la punta de la cola al tiempo 0 (justo antes de la dosificación de glucosa ip), 15, 30, 60 y 120 minutos después de la ip. Usando un glucómetro (FreeStyle Lite®, Abbott), y se calculó el área bajo la curva para estimar la tolerancia a la glucosa (Barrientos *et al.* 2010).

6.8.3 Prueba de resistencia a la insulina

Para la prueba de resistencia a la insulina, los animales se dejaron en ayuno durante 5 horas con acceso libre al agua. Posteriormente se inyectaron vía ip. con 0.5 U de insulina

humana (Eli Lilly, México) Kg-1 de peso corporal y se tomó muestra de sangre de la punta de la cola al minuto 0 (justo antes de la dosificación de insulina ip), 15, 30, 60 y 120. Se midió la glucosa usando un glucómetro (FreeStyle Lite®, Abbott), posteriormente se calculó el área debajo de la curva para estimar la resistencia a la insulina (Barrientos *et al.* 2010).

6.8.4 Peso y almacenamiento de órganos

Después del sacrificio, se diseccionaron los tejidos adiposos (epididimal, visceral, perirenal), hígado, riñón, corazón, cerebro y se registró el peso de cada uno de ellos. Las muestras se congelaron a inmediatamente -70°C para análisis futuros.

6.8.5 Determinación de lípidos de membrana

Los lípidos se extrajeron del tejido adiposo visceral mediante el método modificado de Folch, (1957). El tejido adiposo congelado se trituró en un mortero de acero inoxidable en nitrógeno líquido, 1 g de tejido adiposo triturado se re suspendió en 1 ml de tampón Tris 50 mM-MgCl 10 mM, pH 7,5 y 16 ml de la mezcla Folch (cloroformo metanol 2: 1 v/v). Se añadieron 3 ml de NaCl al 0,73%, se agito en vórtex durante 1 min. y las muestras se centrifugaron a 16,000 rpm en una centrifuga 5810 R marca eppendorf a 4°C , durante 20 minutos. Posteriormente la fase superior se desechó y a la fase recuperada se le añadió 7.5mL de la mezcla de cloroformo: metanol: NaCl al 0,73% (3:48:47 v/v) se mantuvo 24 h a 4°C , la fase inferior se rotaevaporó a 30°C . Los ácidos grasos se metilaron de acuerdo con Pimentel *et al.* (2004) y fueron analizados por cromatografía de gases (Agilent Technologies Modelo 6890N (sistema Net Work GC) con una columna DB-5, 5% de fenilmetilpolisiloxano (60 m, 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μm de espesor de película) y espectrometría de masas (Modelo Agilent Technologies 5975 inerte XL).

6.8.6 Medición de parámetros bioquímicos (Glucosa, Triglicéridos y Colesterol total)

Los animales al final de la octava semana, fueron sacrificados tras el ayuno durante la noche (12 h). Las muestras de sangre obtenidas por punción arterial se recolectaron en tubos de polipropileno y se centrifugaron a 5000 rpm en una centrifuga 5810 R marca eppendorf durante 15 minutos a 4 ° C, el suero se almacenó a -70 ° C hasta su uso posterior. Se evaluaron los niveles glucosa, triglicéridos y colesterol en el suero utilizando kits disponibles en el mercado siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.8.7 Determinación de estrés oxidativo en riñón y corazón

Para la determinación del estrés oxidativo en riñón y corazón se recolectaron dichos órganos y se mantuvieron a -70°C con nitrógeno líquido para su conservación. Posteriormente fueron analizados en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por el método de Western Blot y quimioluminiscencia.

6.8.7.1 Obtención y cuantificación de proteína

Se utilizó la molienda criogénica como método de extracción, esta consta en poner en contacto el órgano con nitrógeno líquido provocando una rigidez mayor lo cual facilita la pulverización en un mortero. Posteriormente el pulverizado se diluye con 1mL de amortiguador de lisis (TABLA 6.3).

TABLA 6.3 Solución de lisis utilizada en la purificación de proteínas.

BUFFER DE LISIS (1 L)		POR ml de BUFFER	
Tris – HCl	25 mM	Leupeptina	1 µl
NaCl	150 mM	Fluoruro de sodio	10 µl
Sacarosa	25 mM	Inhibidor de fosfatos 1x	10 µl
EDTA	1mM	PMSF	4 µl
EGTA	1mM	Aproteínina	1 µl
Triton x100	1 %	O-vanilato	1 µl

Continúa TABLA 6.3

Glicerol	10 %	DOC	0.5%
----------	------	-----	------

*Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Ácido etilenglicol tetracético (EGTA), Ácido etilendiamino tetracético (EDTA) y Desoxicolato de sodio (DOC).

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford. Se construyó una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras utilizando albúmina sérica bovina (BSA). Este método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas. El CBBG se une a los residuos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595 nm se usaron celdas de polipropileno facilitando su limpieza con un poco de alcohol (Stoscheck, 1990).

6.8.7.2 Identificación de proteínas por el método de Western blot

Se realizó el proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE a diferentes concentraciones para cada una de las proteínas a identificar como se muestra en la TABLA 6.4.

TABLA 6.4 Diferentes porcentajes de gel SDS-PAGE.

Proteína	Peso molecular (KDa)	% de gel SDS-PAGE
SOD 1	23	12
SOD 2	23	12
Catalasa	60	10
ENOS3	140	8
α - actina	43	12 ó 15
GPX3	23	12

Para la identificación se llevó a cabo el método de Western Blot. La especificidad de Western Blot se logró mediante la utilización de anticuerpos primarios y secundarios

que reconocen específicamente a la proteína de interés. Para su visualización se utilizaron membranas de polivinildifluoruro (PVDF) con el segundo anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) en una solución luminol - peróxido de hidrógeno 50/50 (v/v), el cual produjo una señal quimiolumincente que se capturó en una película fotográfica (FILM). Estas películas se analizaron mediante un densitómetro GS-800 CALIBRATED de la marca BIORAD y se obtuvo la densidad óptica de cada banda.

6.9 Detección y estimación de lactobacilos y bacterias totales por el método de reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

6.9.1 Extracción de DNA en muestras fecales de roedor

Se realizó la extracción de DNA a partir de las heces fecales recolectadas de la semana 4 mediante el siguiente método:

- Se resuspendieron las muestras fecales en 5 ml de cloruro de sodio al 0.9 %.
- Se centrifugó a 10,000 RPM en una centrifuga Z 216 MK marca HERMLE por 5 minutos y se retiró el sobrenadante.
- Al precipitado formado se le adiciono 500 μ L de buffer TE (Tris 1M pH 8, 0.5 M EDTA pH 8 y agua estéril) y 50 μ L de lisozima (10 mg/ml) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 45 minutos.
- Se adicionó 300 μ l de solución amortiguadora de lisis y se incubó a 50 °C en baño maría por 1 hora.
- La muestra se dividió en dos tubos Eppendorf cada uno con 400 μ l y se les adicionó 500 μ l de fenol.
- Se centrifugó a 13,000 RPM en una centrifuga Z 216 MK marca HERMLE durante 15 min a 4 °C y se repitió hasta que desapareció el botón.
- Posteriormente se adicionó 0.1 Volumen de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol al 95 %, se dejó en refrigeración por 4 horas.
- Se centrifugó a 13,000 RPM en una centrifuga Z 216 MK marca HERMLE por 15 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante por decantación dejándolo secar al aire.
- Por último se hidrató el precipitado con 35 μ L de solución amortiguadora TE y se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1% por 45 minutos a 85 volts para la comprobación de la existencia de DNA en las muestras.

6.9.2 Validación de sondas utilizadas en RT-PCR para la estimación de lactobacilos y bacterias totales

Se validaron cuatro tipos de sondas (FIGURA 6.2) de amplificación Taqman para los generos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y Bacterias las cuales fueron diseñadas por el laboratorio de genética aplicada de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) se utilizaron cultivos puros de cada una de las cepas y se procedió a realizar método RT-PCR de la siguiente manera:

1. Se realizaron cultivos en medio líquidos de Lactobacilos y *E. coli*.
2. Se extrajo el DNA de cada una de las cepas cultivadas.
3. Se validó el DNA extraído en un gel de agarosa al 1% para ver su integridad y posteriormente se midió su concentración (ng/ μ L) en un equipo NANODROP 2000 de la marca Thermo Scientific.
4. Se realizaron alícuotas de 50 ng/ μ L en un volumen de 20 μ L.
5. Se procedió a realizar el método de RT-PCR en donde se ocupó el equipo Step one Applied Biosystems el cual trabaja con placas de 48 pocillos y diferentes reactivos (TABLA 6.5) para la amplificación de la muestra. Para este proceso se ocupó el software Step One V2.3 específico para el equipo, en donde se estableció el tiempo (2 h), naturaleza del DNA (genómico), Testigo negativos (NTC), volumen del pozo (10 μ L), etapas del ciclo (TABLA 6.6), entre otros factores.

Blanco	Iniciadores	Secuencia	Amplición
Bacterias totales	BT IAEA-For	5'- CGG CAA CGA GCG CAA CCC -3'	130 pb
	BT IAEA - Rev	5'- CCA TTG TAG CAC GTG TGT AGC C 3'	
Lactobacillus sp	Allact-For	5'- TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA -3'	150 pb
	Allact-Rev	5'- AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT-3'	

FIGURA 6.2 Iniciadores utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas.

TABLA 6.5 Etapas utilizadas en RT-PCR.

Etapa	T (°C)	Tiempo	Ciclos
Activación	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Extensión	60	60 s	40

TABLA 6.6 Reactivos utilizados en RT-PCR.

REACTIVOS	VOL P/ UNA REACCIÓN
Master mix Taqman	5 μ l
ROX (colorante de referencia)	0.06 μ l
Agua libre de nucleasas (esteril)	2.54 μ l
Fwd, Prb FAM y RE (10 μ M)	0.4 μ l
DNA	2 μ l
Volumen total	10 μ l

*Fluoróforo utilizado (ROX), Forward (Fwd), Reverse (RE) y Fluorocromo para sondas Taqman (FAM).

6.10 Análisis de microvellosidades de colon por microscopía electrónica de barrido

Se recolectó 1 cm de colon transverso, se retiró el exceso de heces inyectando solución amortiguadora de fosfato mediante una jeringa de insulina, se fijó con glutaraldehído (2.5%) en solución amortiguadora de cacodilatos, el tejido se deshidrató gradualmente en etanol a las siguientes concentraciones: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% exponiéndolo un tiempo 20 min en cada solución. Se retiró el exceso de solvente, y fueron secadas por el método de punto crítico (CPD), posteriormente las muestras fueron orientadas y montadas para su recubrimiento con oro y su desecación a alto vacío. La microscopía electrónica de barrido se llevó a cabo utilizando un equipo Jeol (Japan Electron Optical Laboratorio, Tokio, Japón) operado a 5.0 KV.

6.11 Estadística

Los resultados se presentaron como medias \pm desviaciones estándar. La significancia de la diferencia se probó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) junto con la prueba Tukey realizado con el programa Sigma Plot versión 12.0. Se eligió una probabilidad de 0.05 como valor significativo.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Prueba de biotoxicidad con artemia salina

La estimación de biotoxicidad de los FOS-AL y FOS fue determinada con el modelo agudo de *Artemia salina* y calculados mediante el método gráfico de Probit, donde los valores de LC_{50} fueron de 412 $\mu\text{g/ml}$ de FOS-AL y 448 $\mu\text{g/ml}$ de FOS, según Meyer *et al.* (1982) valores de LC_{50} inferiores a 1000 $\mu\text{g/ml}$ presentan actividad biológica. Para la estimación de la dosis se tomo en cuenta la ingesta propuesta por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA siglas en inglés) para el consumo de esteres de sacarosa esterificados con ácido láurico de 0-30 mg/kg de peso corporal al día para humano, por lo que se propuso como dosis diaria de FOS-AL de 100 mg/kg de peso de la rata y para FOS 70 mg/kg de peso de la rata, estos valores no sobrepasan la ingesta diaria recomendada propuesta por la EFSA ni tampoco la LC_{50} para artemia salina.

7.2 Determinaciones biométricas y nutricionales

Los resultados de circunferencia de cintura, longitud e índice Lee, calculados de la semana cero y ocho no presentan diferencia significativa entre grupos ni con los tratamientos como se muestra en la TABLA 7.1. La ganancia de peso de la semana cero y la semana ocho (última semana del tratamiento) se muestra en la FIGURA 7.1 donde se puede apreciar una tendencia a la alza en el grupo con SM, sin embargo no es significativamente diferente contra los tratamientos ni contra la dieta normal, lo cual se corrobora con el trabajo de Haubert (2015) en donde administra 10 g de FOS/100g de dieta alta en carbohidratos (70% fructuosa) a ratas Wistar, sin encontrar diferencia significativa en el peso del grupo suplementado con FOS y sus grupos testigos (sin ningún tratamiento pero con esteatosis hepática y sin ella). Otro trabajo es el reportado por Kok *et al.*, (1998) en donde se emplearon 25 ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasas y con 10 % de FOS/g de dieta, en donde no presentaron diferencia significativa en el aumento de peso de los ejemplares con respecto al grupo testigo sano, sin embargo existen trabajos como el de Panchal *et al.* (2011) donde administraron una dieta HFHC en ratas Wistar

macho por ocho y dieciséis semanas, observando diferencias significativas en el peso de las ratas en la semana dieciséis con respecto a su grupo testigo que fue alimentado con maicena y alimento estándar, mientras que en la semana ocho aun no presentaban diferencias significativas, por lo consiguiente en este trabajo no se presentan diferencias significativas en el peso de las ratas debido al corto tiempo de exposición.

TABLA 7.1 Valores biométricos medidos tras la ingesta de FOS y FOS-AL durante 8 semanas.

	GRUPOS	INDICE DE LEE	CIRCUNFERENCIA CINTURA	LONGITUD ANO–NASAL
SEMANA 0	DN	0.329 ± 0.011 ^a	13.86 ± 0.740 ^a	16.75 ± 0.010 ^a
	SM	0.328 ± 0.651 ^a	13.50 ± 0.866 ^a	16.50 ± 0.866 ^a
	FOS	0.332 ± 0.005 ^a	13.70 ± 0.670 ^a	16.90 ± 0.894 ^a
	FOS – AL	0.327 ± 0.011 ^a	12.80 ± 0.758 ^a	16.90 ± 0.124 ^a
SEMANA 8	DN	0.313 ± 0.013 ^a	16.36 ± 0.517 ^a	21.25 ± 0.957 ^a
	SM	0.313 ± 0.003 ^a	15.84 ± 0.955 ^a	21.87 ± 0.629 ^a
	FOS	0.326 ± 0.010 ^a	16.46 ± 0.789 ^a	21.62 ± 0.946 ^a
	FOS – AL	0.313 ± 0.334 ^a	16.32 ± 0.637 ^a	21.97 ± 0.050 ^a
*ANOVA realizado por prueba Tukey p< 0.05 donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de <i>Agave tequilana</i> W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).				

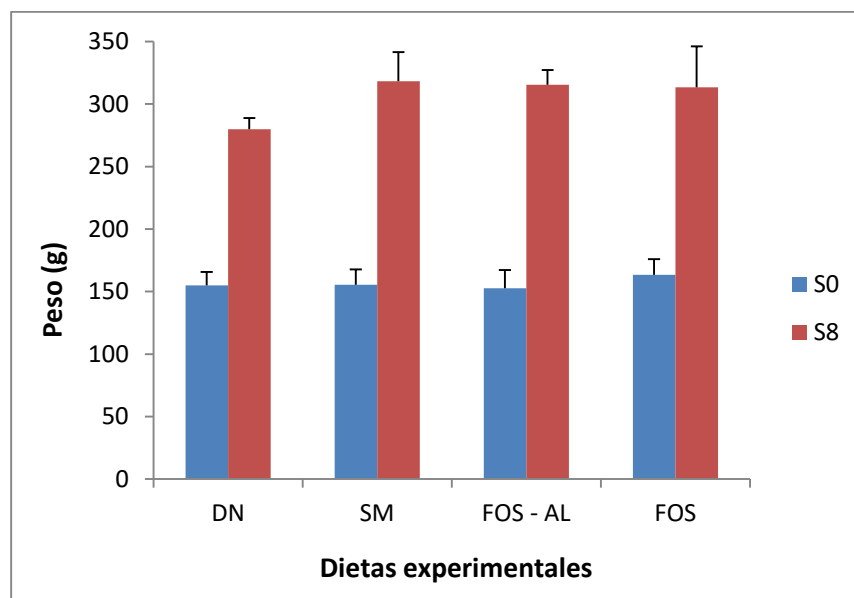


FIGURA 7.1 Pesos registrados de la semana 0 y 8 en ratas alimentadas con dieta HFHC tras la ingesta de FOS y FOS-AL.
 (ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de Agave *tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.2.1 Valores de índice de masa corporal

Los resultados del IMC calculados de la semana cero y ocho no mostraron diferencia significativa entre los grupos de estudio (Fig. 15), estos resultados son comparables con los reportados por Panchal *et al.* (2011) En donde alimentan a dos grupos de ratas Wistar, uno con dieta HFHC y otro con alimento estándar durante dieciséis semanas en donde no mostraron diferencia significativas (0.79 ± 0.01 y 0.78 ± 0.01 g/cm²; $p < 0.05$) ellos concluyen que el alimento estándar produce morbilidad metabólica y por ende no es un control apropiado en modelos con cambios inducidos por obesidad, por lo consiguiente este trabajo es similar a lo reportado por Panchal *et al.* (2011) donde ellos utilizan una dieta HFHC de inducción al SM y no se observaron cambios en dicho grupo con respecto a los demás.

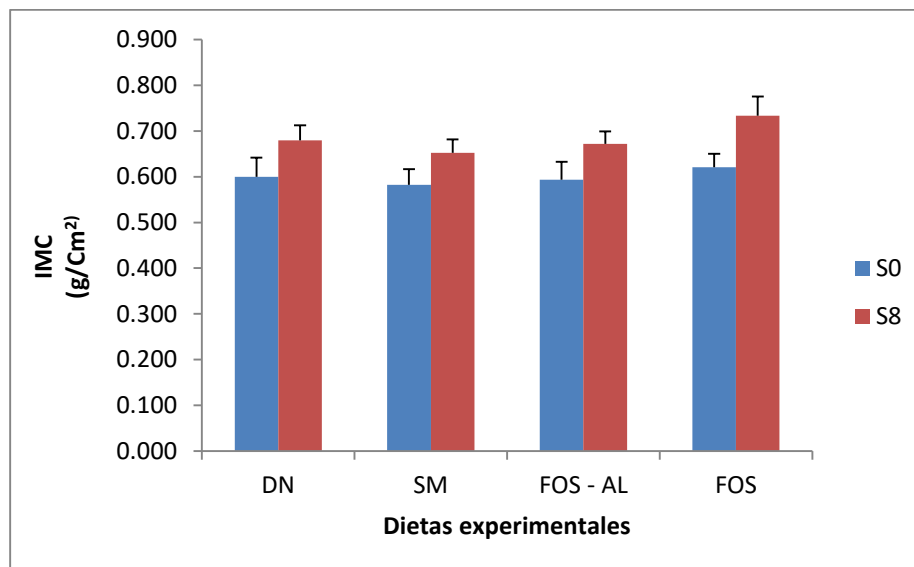


FIGURA 7.2 Índice de masa corporal en ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL durante 8 semanas.

(ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequian* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.2.2 Medición de grosor del panículo adiposo

Los valores obtenidos de la medición del panículo adiposo abdominal o pliegues abdominales se muestran en la FIGURA 7.3 donde el grupo de SM presenta un aumento del 23% con respecto a los demás grupos (2.666 ± 0.152 vs 2.16 ± 0.11 cm; $p < 0.05$), mientras que los grupos de FOS y FOS-AL no presentan diferencia significativa entre ellos (2.16 ± 0.11 vs. 2.30 ± 0.10 cm), estos resultados pueden ser comparados con el estudio de Cerna *et al.*, (2014) en donde al administrar una dieta alta en carbohidratos (20%) y sal (7%) en ratas Wistar por 9 semanas no presentaron diferencias significativas en la medición de pliegues de las ratas, concluyendo que fue un tiempo de exposición corto para poder observar diferencias con el grupo testigo sano, por lo que en este trabajo el aumento del panículo adiposo en el grupo de SM se puede deber al aumento de calorías en la dieta HFHC ya que aparte de brindar un alto contenido de carbohidratos también aporta calorías por parte de las grasas como la mantequilla, haciendo notorio el aumento del pliegue abdominal en las ratas de este grupo, por lo contrario las ratas de los grupos alimentadas

con FOS y FOS-AL no presentaron diferencias significativas con respecto al control alimentado con dieta estándar, lo cual podría atribuirse a la capacidad de los FOS como saciadores del apetito y al ácido láurico como activador del procesos de termogénesis que actúa sobre el tejido pardo ubicado en la zona visceral como lo reporta Shabalina *et al.* (2008).

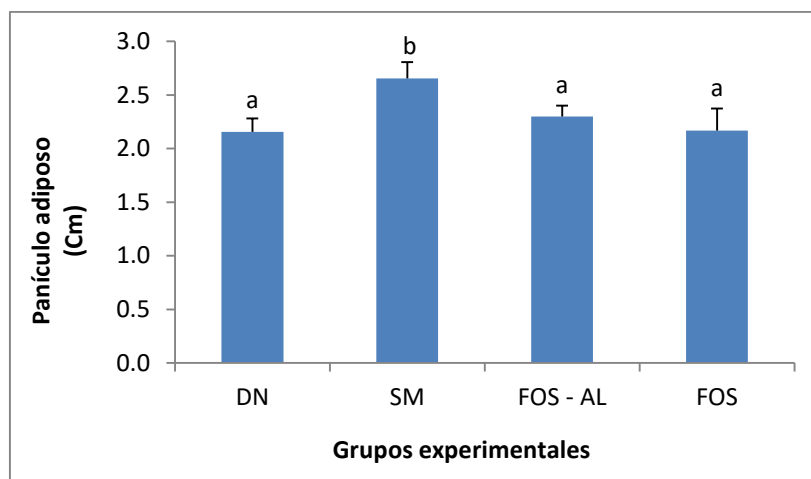


FIGURA 7.3 Grosor del panículo adiposo en ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL durante 8 semanas.

ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.2.3 Registro del consumo de agua

El consumo de agua por día fue registrado a lo largo del proyecto (FIGURA 7.4), donde el grupo de DN mostró un aumento del 69% con respecto a los demás grupos (28.2 ± 2.28 vs 19.2 ± 2.6 mL; $p < 0.05$), este resultado se corrobora con el trabajo realizado por Espinoza *et al.*, (2008) donde resaltan el consumo de agua como una variable independiente de la dieta (hipercalórica, hipocalórica y normocalórica), por lo que en este trabajo se le puede atribuir su aumento a la textura de la dieta siendo mayor el consumo de agua para dietas secas y menor para dietas blandas o suaves.

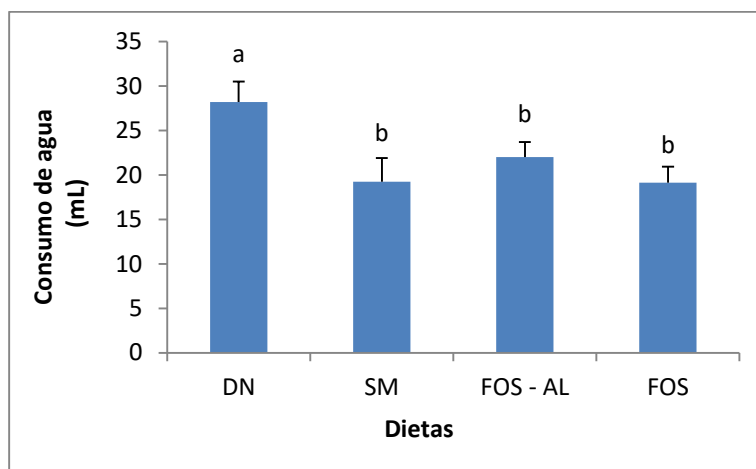


FIGURA 7.4 Promedio del consumo de agua (mL) en ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL durante 8 semanas.
 (ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.2.4 Aporte calórico de las dietas administradas

El aporte calórico de la dieta HFHC fue de 19 kJ/g mientras que la dieta estándar aportó 13 kJ/g, por lo que el consumo energético a lo largo del estudio se muestra en la FIGURA 7.5 donde los grupos de SM, FOS y FOS-AL presentan un aumento del 30% con respecto al grupo de DN (297.1 ± 24.2 kJ vs 227.8 ± 9.9 ; $p < 0.05$), este aumento se debe a la ingesta calórica aportada por la dieta HFHC la cual contiene 23% de lípidos, 64% de carbohidratos y 12% de proteínas a comparación de la dieta normal a base de croquetas la cual contiene 4% de lípidos, 65% de carbohidratos y 30% de proteínas, sin embargo cabe mencionar que los carbohidratos y lípidos no presentan las mismas características y por ende a pesar de tener composiciones parecidas las repercusiones en la ingesta es distinta, de igual manera en la FIGURA 7.6 se muestran las ingestas diarias las cuales no presentan diferencia significativa entre los grupos recalando así que el desarrollo de algunos parámetros del síndrome metabólico están relacionados directamente con la calidad de la alimentación y no por la cantidad.

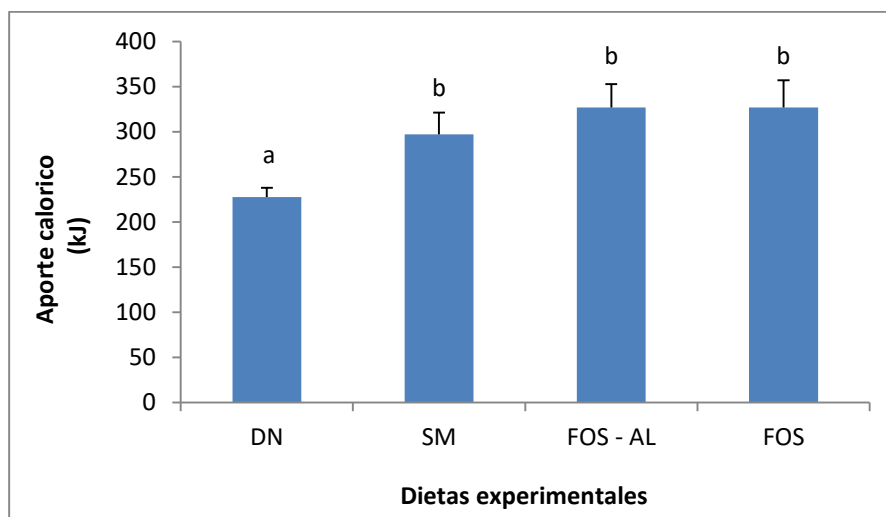


FIGURA 7.5 Aporte energético promedio de ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS y FOS-AL.

(ANOVA realizado por prueba tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

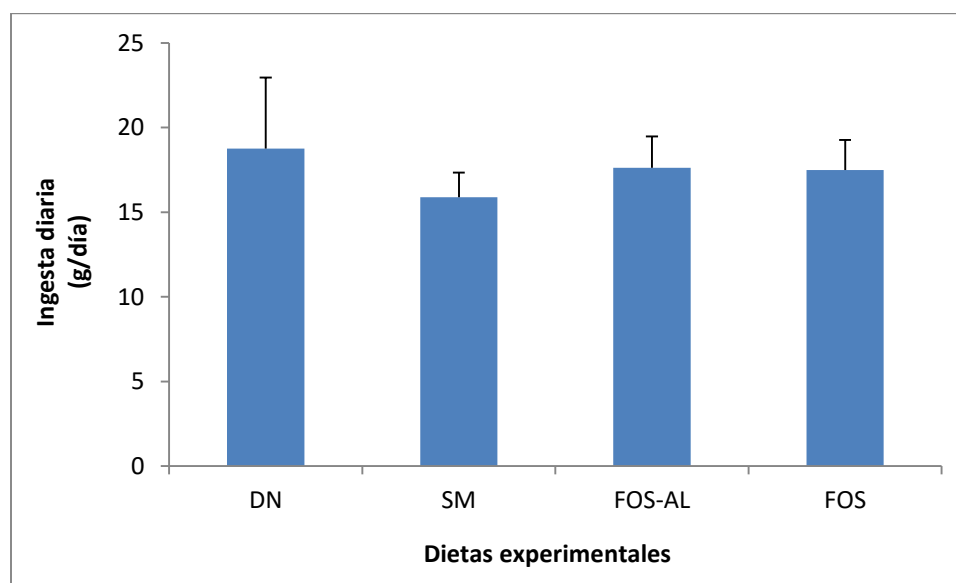


FIGURA 7.6 Ingesta diaria de los grupos alimentados con croquetas (DN) y los grupos con síndrome metabólico y suplementados con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

(ANOVA realizado por prueba tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3 Evaluación de biomarcadores del síndrome metabólico

7.3.1 Valores de presión arterial sistólica.

En la FIGURA 7.7 se muestran los valores de presión sanguínea tomados en la última semana del estudio, donde se observa que el grupo de SM aumenta un 20% en relación a los demás grupos (124.4 ± 3.8 vs 104.2 ± 5.6 mm Hg; $p < 0.05$), lo cual concuerda con en el estudio de Panchal (2011) en donde se evalúa el aumento en presión arterial en ratas Wistar alimentadas con dieta HCHF durante ocho semanas dando como resultado el aumento de presión en el grupo con dieta HCHF del 15% con respecto al grupo alimentado con dieta estándar (125 ± 7 vs 144 ± 4 mmHg; $p < 0.05$), concluyendo que las dietas HFHC inducen un aumento de presión en tiempos de exposición cortos. Por su parte los grupos de FOS y FOS-AL no presentan diferencia significativa entre ellos manteniendo sus valores semejantes al grupo de DN, lo que indica que la administración de estos compuestos tuvo un efecto benéfico en la administración de la presión arterial. Estos resultados se correlacionan con los trabajos de He *et al.* (1995); Appel *et al.* y Stamler *et al.* (1997) donde muestran que las dietas ricas en fibra se asocian inversamente con la presión arterial ya que el efecto antihipertensivo de la fibra (específicamente soluble) podría explicarse porque mejora la resistencia a la insulina, factor determinante en la patogénesis de la hipertensión arterial.

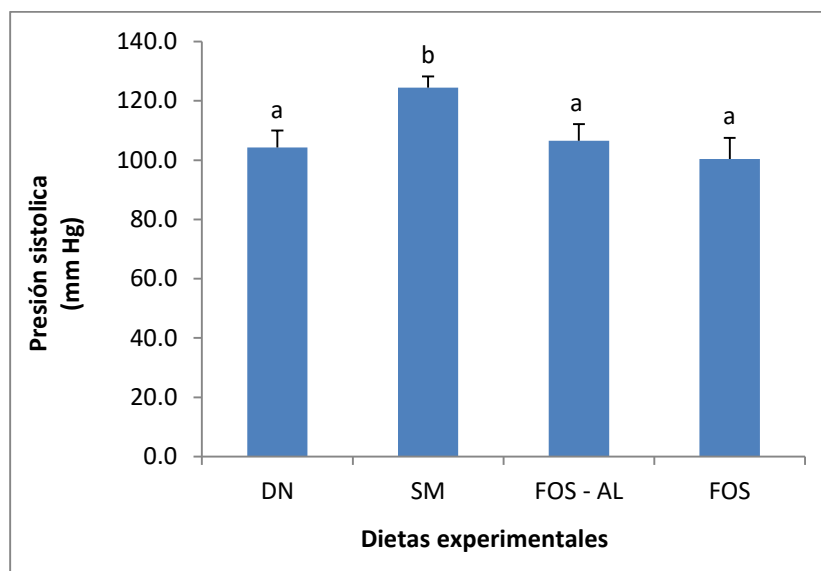


FIGURA 7.7 Valores de presión en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

(ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL)

7.3.2 Valores de la prueba de tolerancia a la glucosa

Los valores a diferentes tiempos de la prueba de tolerancia a la glucosa están representados en la FIGURA 7.7 en donde se logra apreciar un aumento del 88% en el grupo de SM a los 15 min de haber administrado glucosa vía i.p (To: 79.4 ± 2.97 vs T15: 149.8 ± 4.97 mg/dL) para posteriormente llegar a valores finales de 85.6 ± 3.78 mg/dL. Los grupos de FOS y FOS-AL no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo de DN ya que los valores de glucosa en sangre a los 15 min de haberse administrado la solución de glucosa fueron de 64.4 ± 3.91 para el grupo DN, 65.4 ± 3.05 para el grupo de FOS-AL y 64.4 ± 4.04 para el grupo de FOS. Este resultado es parecido al publicado por Pastorello *et al.* (2011) donde se aprecia un tiempo de asimilación de glucosa en sangre de tres horas en la prueba a ratas diabéticas inducidas a través de una dieta alta en grasas, a comparación del grupo control alimentado con dieta estándar, el cual tuvo un tiempo de asimilación de dos horas concluyendo que la lenta normalización de glucosa en sangre se debe principalmente a una disminución en la captación de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina, es decir, son resistentes a la insulina. Estos resultados son aceptables debido a

que la función de la insulina es activar la vía de señalización para que los transportadores de glucosa (GLUT4) ingresen las moléculas de glucosa a través de la membrana, permitiendo a los tejidos periféricos realizar sus funciones como metabolismo, transporte o almacenamiento de esta. En consecuencia el grupo de SM puede verse afectado por una secreción baja de insulina, por fallas en las células β -pancreáticas o bien por una afectación del GLUT4 por lo que el tiempo de asimilación de glucosa en sangre es prolongado a comparación del grupo control, demostrando la presencia de resistencia a la insulina, cabe recalcar que los grupos alimentados con FOS y FOS-AL se comportan de manera similar al grupo de DN esto podría deberse a la producción de ácidos grasos de cadena corta por la microbiota ya que los FOS estimulan el crecimiento de *Lactobacillus* y *bifidobacterium*, estos ácidos grasos promueven la proliferación de las células β y por ende el aumento de insulina la cual es capaz de mantener la euglucemia, por lo que los grupos suplementados con FOS y FOS-AL no presentan resistencia a la insulina ya que los valores de glucosa en sangre se restablecieron a sus valores basales en el tiempo adecuado.

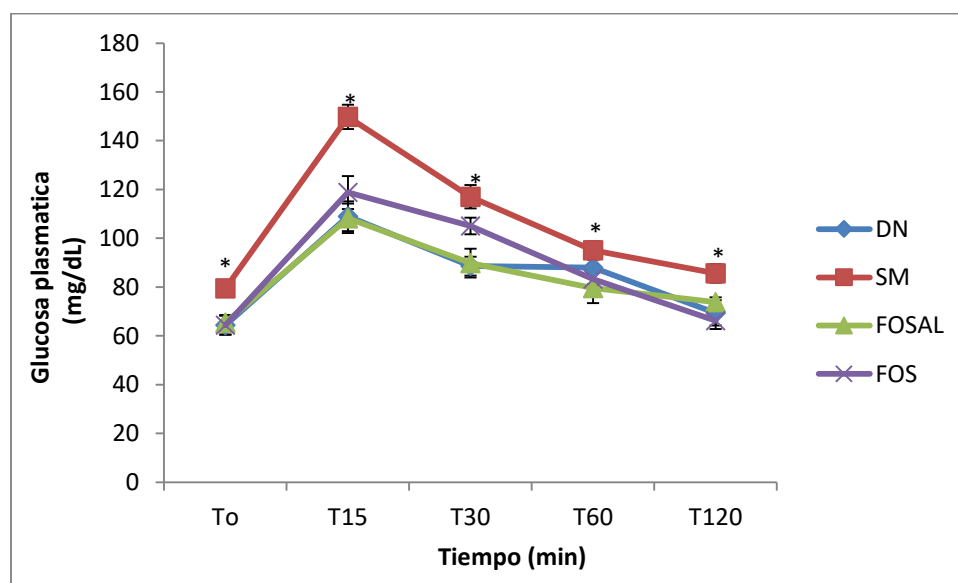


FIGURA 7.8 Curva de tolerancia a la glucosa en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.
 (ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde los * denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de Agave *tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3.3 Prueba de resistencia a la insulina

Los valores obtenidos de la prueba de resistencia a la insulina se muestran en la FIGURA 7.8 en donde el grupo de SM presenta diferencias significativas a los 15 min de haber iniciado la prueba con respecto a los demás grupos (37.2 ± 2.95 vs 48.6 ± 5.68 mg/dL; $p < 0.05$), mientras que los grupos de FOS y FOS-AL mantienen valores similares al grupo de dieta normal (49.4 ± 5.86 , 51.8 ± 5.45 vs 48.6 ± 5.68 mg/dL; $p < 0.05$), a los 30 min de la prueba el grupo de FOS presenta una disminución del 29% con respecto al grupo de DN (24.4 ± 3.36 vs 34.2 ± 3.27 mg/dL; $p < 0.05$), mientras que los grupos de DN, SM y FOS-AL no presentan diferencia significativa entre ellos, transcurrido los 60 min de la prueba los grupos de FOS y FOS-AL mantienen valores muy similares al grupo de DN (37 ± 4.0 , 33 ± 5.66 vs 26.8 ± 1.92 mg/dL; $p < 0.05$), sin embargo el grupo de SM presenta un aumento del 46% con respecto al grupo de DN (48.8 ± 2.86 vs 26.8 ± 1.92 mg/dL; $p < 0.05$), En condiciones fisiológicas, la insulina liberada por el páncreas en respuesta al estímulo hiperglicémico, activa los transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT) los cuales introducen vía transmembranal las moléculas de glucosa, sin embargo en modelos de ratas con resistencia a la insulina estos transportadores de glucosa no ejercen su función de manera correcta por ende la glucosa circundante no es asimilada de manera correcta, por lo contrario en modelos de rata sin presencia de resistencia a la insulina presentan un descenso de glucosa plasmática a los 30 min y posteriormente un aumento hasta restablecer sus valores iniciales.

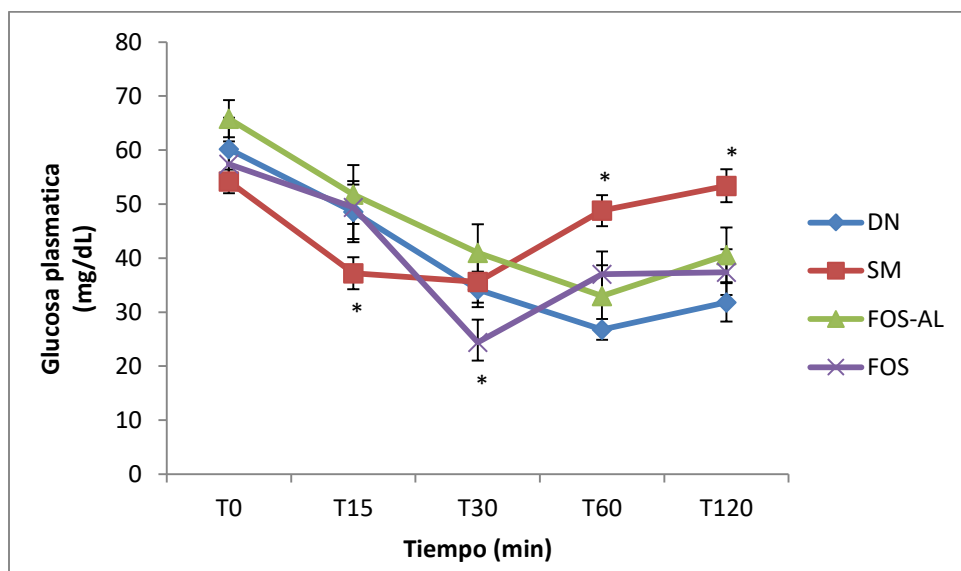


FIGURA 7.9 Valores de prueba de resistencia a la insulina en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL.

(ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde los * denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3.4 Tejido adiposo (perirenal, visceral y epididimal)

Los pesos del tejido adiposo perirenal para cada uno de los grupos experimentales se muestran en la FIGURA 7.10 donde los grupos de SM y FOS no presentan diferencia significativa entre ellos, sin embargo existe un aumento de tejido adiposo perirenal en el grupo de FOS-AL del 56% con respecto al grupo de DN (14.34 ± 0.74 vs 6.35 ± 0.72 g; $p < 0.05$) y del 27% con respecto al grupo de FOS (14.34 ± 0.74 vs 10.46 ± 0.53 g; $p < 0.05$). Los datos del peso del tejido adiposo visceral se aprecian en la FIGURA 7.10 donde los valores para los grupos de SM, FOS y FOS-AL no presentan diferencia significativa entre ellos, pero si un aumento del 30% con respecto al grupo de DN (3.66 ± 0.12 , 3.82 ± 0.41 y 3.39 ± 0.63 vs 2.68 ± 0.04 g; $p < 0.05$). Para el tejido adiposo epididimal los resultados se muestran en la FIGURA 7.10 donde los grupos de SM, FOS y FOS-AL no muestran diferencia significativa entre ellos, pero si un aumento del 53% con respecto al grupo de DN (8.21 ± 0.86 , 9.360 ± 0.247 y 8.51 ± 1.11 vs 4.436 ± 0.549 g; $p < 0.05$). En algunos trabajos como el de Cummings *et al.* (1987) al alimentar ratones con dietas ricas en grasas y FOS se observó que tanto el peso corporal como el porcentaje de grasa corporal fue

menor que en el control, al igual que el peso del tejido visceral y contenido de triglicéridos en el hígado estos pueden deberse a que los AGCC regulan positivamente la homeostasis lipídica al inhibir la lipólisis, aumentar la movilización de triglicéridos y la diferenciación adipogénica (Den *et al.*, 2013), sin embargo en este trabajo no se presentó una disminución de tejido adiposo perirenal, visceral ni epididimal en los grupos suplementados con FOS y FOS-AL con respecto al grupo de DN, esto podría explicarse con la relación que existe entre los FOS y la microbiota intestinal ya que esta al no ser adecuada por diversos factores como el tiempo de suplementación, la biodisponibilidad no permite el aumento adecuado de la población bacteriana en específico los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que a su vez generan AGCC como el propiónico, butírico y acético, los cuales son detectados por receptores específicos acoplados a proteínas G (GPR), que participan en la regulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa. GPR41 o también llamado Ffar2 y GPR43 o también llamado Ffar3 han sido identificados como receptores específicos de AGCC (Brown *et al.*; Le *et al.*, 2008), en el tejido adiposo blanco los AGCC aumentan la sensibilidad a la insulina a través de Ffar2 y por lo tanto, disminuyen el almacenamiento de grasa.

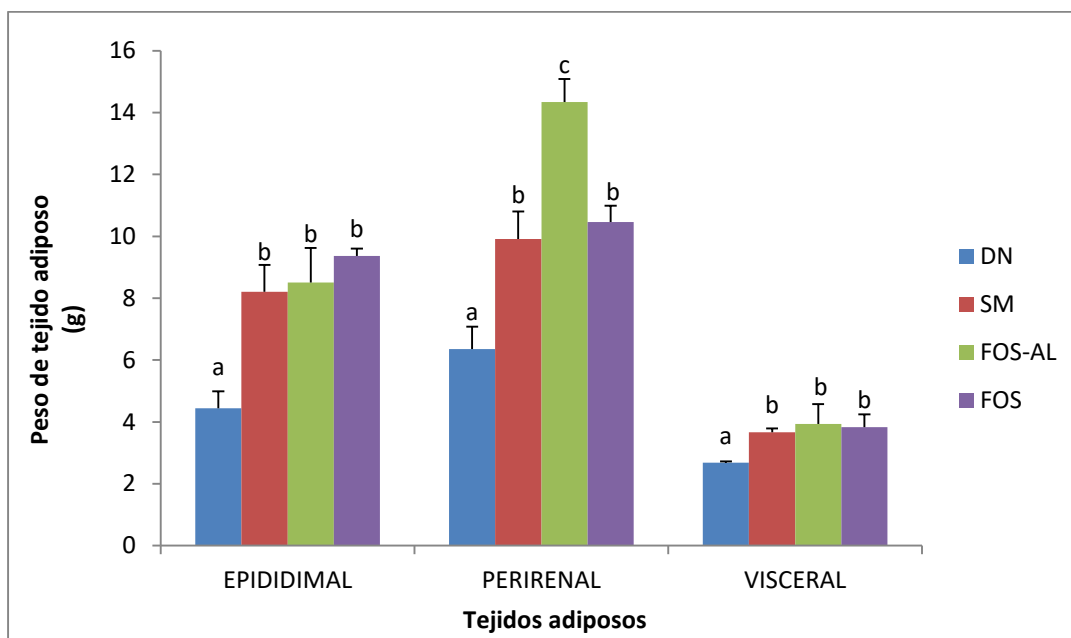


FIGURA 7.10 Registro de pesos de tejido adiposo epididimal, perirenal y visceral en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3.5 Peso de tejido hepático

En la FIGURA 7.10 se muestra el promedio de pesos de los hígados de cada grupo, donde el grupo de SM presenta un aumento del 44 % con respecto al grupo de DN (11.150 ± 0.275 vs 6.233 ± 0.275 g; $p < 0.05$), de igual manera muestra un aumento del 19 % con respecto a los grupos de FOS y FOS-AL (11.150 ± 0.275 vs 9.056 ± 0.223 g; $p < 0.05$), mientras que los grupos de FOS y FOS-AL no presentan diferencia significativa entre ellos, pero sí un aumento de peso del 31% con respecto al grupo de DN. Estos resultados pueden ser comparados con el trabajo de Urias (2008), el cual reporta una disminución del tejido hepático del 13% para el grupo de ratones alimentados con FOS (10g de FOS/90g de dieta estándar) de *Agave tequilana* Var. Azul con respecto al grupo control alimentado con dieta estándar, concluyendo que esta disminución se puede deber a la generación de AGCC entre ellos el propiónico y/o butírico ya que uno es un fuerte inhibidor de la síntesis de lípidos y el otro estimula la secreción de GLP-1 en el intestino y colon, esta hormona regula el

apetito y provoca saciedad, al igual que la homeostasis de glucosa y lípidos. Por lo que en consecuencia la disminución de peso de tejido hepático de los grupos FOS y FOS-AL con respecto al grupo de SM puede deberse a la generación de AGCC, sin embargo la concentración de estos no permitió llegar a los valores del grupo de DN, quizás por la cantidad administrada de FOS.

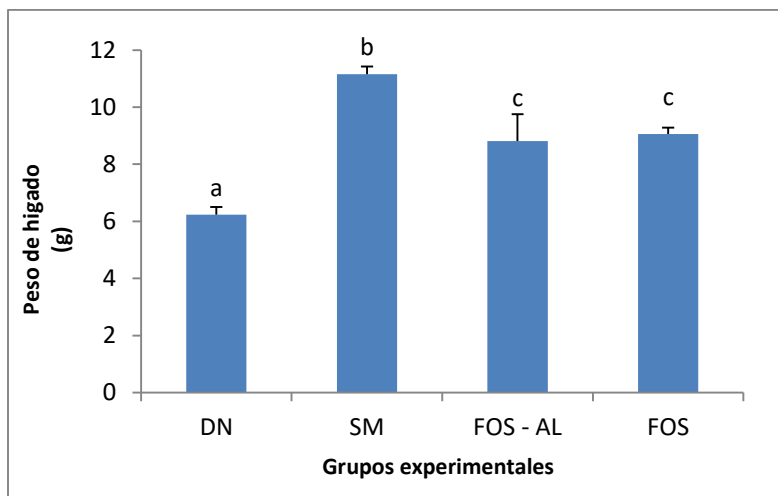


FIGURA 7.11 Registro de pesos del tejido hepático en ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de Agave tequilana W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3.6 Determinación de lípidos de membrana en tejido adiposo

En la TABLA 7.2 se muestra la determinación de lípidos de membrana extraídos de tejido adiposo perirenal en donde se observa en los ácidos grasos saturados en donde el ácido esteárico (18:0) presenta un aumento del 15% en los grupos de SM, FOS y FOS-AL con respecto al grupo de DN (7.73 ± 0.265 ; 6.91 ± 0.50 ; 6.82 ± 1.32 vs 4.17 ± 0.226 $p < 0.05$), entre los ácidos grasos mono-insaturados el que presenta mayor proporción es el ácido oleico (18:1) en los grupos de SM, FOS y FOS-AL del 66% con respecto al grupo de DN (32.27 ± 0.15 ; 33.00 ± 0.77 ; 34.203 ± 3.06 vs 23.947 ± 0.942 $p < 0.05$), mientras que en los ácidos grasos poli-insaturados el ácido linoleico (18:2) presenta una disminución del

38% en los grupos de SM, FOS y FOS-AL con respecto al grupo de DN (11.28 ± 0.20 ; 10.44 ± 0.88 ; 13.01 ± 2.08 $p < 0.05$).

TABLA 7.2 Determinación de lípidos de membrana en tejido adiposo de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ÁCIDOS GRASOS	DN	SM	FOS-AL	FOS
SATURADOS				
C10:0 Ácido cáprico	0.023 ± 0.005^a	0.380 ± 0.020^b	0.300 ± 0.043^c	0.293 ± 0.035^c
C12:0 Ácido láurico	0.120 ± 0.020^a	1.240 ± 0.026^b	0.996 ± 0.164^b	1.07 ± 0.159^b
C14:0 Ácido mirístico	1.636 ± 0.070^a	7.193 ± 0.227^b	5.793 ± 0.751^c	5.640 ± 0.802^{bc}
C16:0 Ácido palmítico	27.153 ± 4.647^a	28.343 ± 1.306^a	31.387 ± 1.90^a	27.930 ± 3.080^a
C18:0 Ácido esteárico	4.170 ± 0.226^a	7.730 ± 0.265^b	6.916 ± 0.500^b	6.820 ± 1.321^b
C20:0 Ácido aráquico	0.118 ± 0.016			
MONO-INSATURADOS				
C14:1 Ácido miristoleico	0.050 ± 0.010^a	0.376 ± 0.005^b	0.263 ± 0.005^c	0.320 ± 0.045^b
C16:1 Ácido palmitoleico	3.700 ± 0.560^{ab}	4.386 ± 0.153^a	2.74 ± 0.476^{ab}	3.816 ± 0.630^b
C18:1 Ácido oleico	23.947 ± 0.942^a	32.273 ± 0.150^b	33.00 ± 0.77^b	34.203 ± 3.065^b
C20:1 Ácido Eicosadienoico Isomero	0.310 ± 0.052			
POLI-INSATURADOS				
C18:2 Ácido linoleico	29.377 ± 3.232^a	11.283 ± 0.206^b	10.44 ± 0.887^b	13.010 ± 2.189^b
C20:2 Ácido Eicosadienoico	0.154 ± 0.026			
C20:4 Ácido araquidónico	0.525 ± 0.059			
C22:6 Ácido docosahexanoico	0.204 ± 0.063			

Los valores se expresan como % del total de ácidos grasos. Las letras diferentes significan diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$) después de la prueba ANOVA y Tukey unidireccional, los valores son media - desviación estándar; Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3.7 Determinaciones bioquímicas

Los resultados de la bioquímica de tres elementos se muestran en la FIGURA 7.12. En donde se puede observar que los valores de glucosa sérica aumentaron 32% en el grupo de SM, 15% en el grupo de FOS y 21% en el grupo de FOS-AL con respecto al grupo de DN (155.6 ± 6.87 ; 136 ± 3.3 y 143.2 ± 1.30 vs 117.6 ± 1.14 ; $p < 0.05$), cabe recalcar que en este trabajo los valores de glucosa sérica en los grupos de FOS y FOS-AL no lograron

normalizar sus valores con el grupo de DN, sin embargo fueron menores a los valores reportados por el grupo de SM.

Para los valores de triglicéridos mostrados en la FIGURA 7.12 se observa un aumento del 45% en el grupo de SM comparado con los demás grupos de DN, FOS y FOS-AL (87.2 ± 8.49 vs 60 ± 0.70 , 68 ± 1.2 y 65.8 ± 3.7 ; $p < 0.05$) mientras que los grupos de FOS y FOS-AL presentaron valores similares al grupo de DN. Estos resultados pueden atribuirse a que los FOS llegan al colon donde son fermentados por la microbiota generando AGCC en particular el propionato el cual aumenta la actividad de la proteína quinasa activa por AMP (AMPK) por lo que disminuye la gluconeogénesis hepática al aumentar la fosforilación, también se le atribuye la inhibición de la síntesis de colesterol en el hígado y la disminución de triglicéridos plasmático ya que aumentan la actividad de PYY y GLP-1, donde PYY participa en la absorción de glucosa en el musculo y el tejido adiposo, mientras que GLP-1 aumenta la secreción de insulina y disminuye la producción de glucagón en el páncreas.

Los valores de colesterol total sérico se muestran en la FIGURA 7.12 donde se puede observar que el grupo de SM y FOS-AL no presentan diferencia significativa entre ellos pero si presentan un aumento del 36% de colesterol con respecto al grupo de DN (95.80 ± 3.3 ; 90.4 ± 4.8 vs 57 ± 6.4 ; $p < 0.05$), cabe recalcar que el grupo de FOS disminuyó un 19% la concentración de colesterol sérico con respecto al grupo de SM (77.80 ± 7.791 vs 95.80 ± 3.3466 ; $p < 0.05$), estos valores de colesterol pueden ser comparados con el trabajo de García *et al.* (2018) donde alimentan a grupos de cerdos con dieta estándar de maíz y soja más FOS de *Agave fourcroyde* al 0.25% y 0.50% por 75 días dando como resultado la disminución de colesterol del 26% en el grupo suplementado con 0.25% de FOS y 20% para el grupo suplementado con 0.50% de FOS con respecto al grupo alimentado solo con dieta estándar. En este trabajo no se normalizaron los valores de colesterol en los grupos de FOS y FOS-AL con respecto al grupo DN, sin embargo estos no sobrepasaron los valores del grupo de SM, por lo contrario el grupo de FOS demostró una disminución con respecto al grupo de SM, lo cual podría deberse a que los FOS sirven de sustratos a la microbiota y esta a su vez genera ÁGCC los cuales fosforilan y activan el AMPK directamente al aumentar la relación AMP/ATP e indirectamente a través de la vía

Ffar-leptina en el tejido adiposo blanco. Al igual que los AGCC también aumenta la sensibilidad a la insulina a través de Ffar2 y por lo tanto disminuye el almacenamiento de grasa. Además la unión de AGCC a Ffar conduce a la liberación de la proteína G i/o la inhibición posterior de Adenilato ciclasa y un aumento de la relación ATP/cAMP. Esto a su vez, conduce a la inhibición de PKA y a la posterior inhibición de HSL (lipasa sensible a hormonas), lo que lleva a una disminución de la lipólisis y a la reducción de ácidos grasos libres en el plasma.

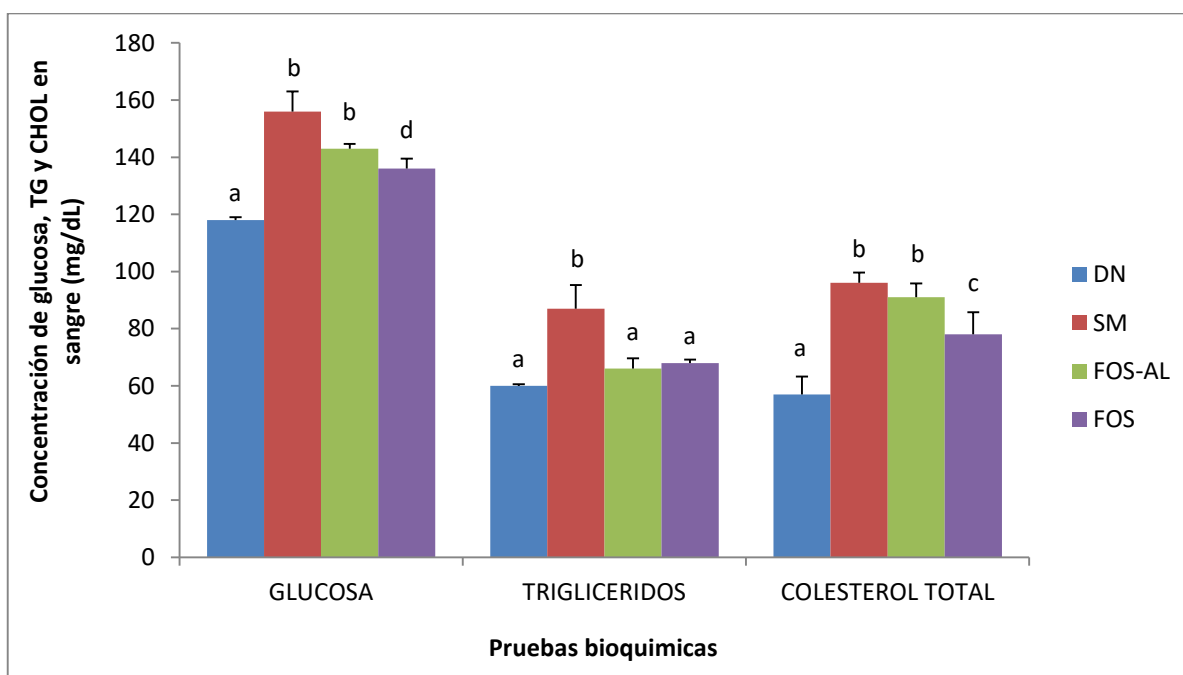


FIGURA 7.12 Efecto de la administración de FOS y FOS-AL en la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre en ratas con síndrome metabólico. ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.3.8 Determinación del estrés oxidativo

En la TABLA 7.3 se observan algunos valores obtenidos de proteínas que conforman el sistema antioxidante enzimático como SOD1, eNOS y CAT en tejido cardíaco, donde SOD 1 no presenta diferencia significativa entre los grupos de DN, SM, FOS y FOS-AL, mientras que eNOS presentó una disminución del 57% en el grupo de FOS-AL con respecto al grupo de DN (0.652 ± 0.134 vs 1.138 ± 0.093 ; $p < 0.05$) lo cual

puede observarse en la FIGURA 7.13. El grupo de FOS aumento 30 % con respecto al grupo de SM (1.243 ± 0.051 vs 0.952 ± 0.116 ; $p < 0.05$). Para catalasa se obtuvo un aumento del 19 % en el grupo de FOS-AL con respecto al grupo FOS (0.794 ± 0.066 vs 0.665 ± 0.020 ; $p < 0.05$) (FIGURA 7.14), mientras que los demás grupos no presentaron diferencia significativa entre ellos DN, SM y FOS-AL.

En la TABLA 7.4 se muestran las proteínas detectadas en riñón (SOD1, SOD2, GPX3 y CAT) las cuales forman parte del complejo enzimático, sin embargo estas no presentan diferencias significativas entre los grupos de estudio.

TABLA 7.3 Expresión de proteínas del sistema antioxidante enzimático en corazón.

Enzimas antioxidantes	DN	SM	FOS-AL	FOS
SOD 1	0.620 ± 0.131^a	0.591 ± 0.112^a	0.624 ± 0.165^a	0.558 ± 0.032^a
eNOS	1.138 ± 0.093^{ac}	0.952 ± 0.116^a	0.652 ± 0.134^b	1.243 ± 0.051^c
CAT	0.726 ± 0.603^{ab}	0.760 ± 0.033^{ab}	0.794 ± 0.066^a	0.664 ± 0.021^b
*ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de <i>Agave tequilana</i> W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).				

TABLA 7.4 Expresión de proteínas del sistema antioxidante enzimático en riñón.

Enzimas antioxidantes	DN	SM	FOS-AL	FOS
SOD 1	1.37 ± 0.089^a	1.43 ± 0.057^a	1.46 ± 0.046^a	1.38 ± 0.151^a
SOD 2	0.603 ± 0.054^a	0.686 ± 0.092^a	0.758 ± 0.048^a	0.628 ± 0.089^a
GPX3	0.633 ± 0.094^a	0.861 ± 0.117^a	0.688 ± 0.280^a	0.602 ± 0.171^a
CAT	0.742 ± 0.117^a	0.891 ± 0.074^a	0.825 ± 0.049^a	0.775 ± 0.087^a
*ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de <i>Agave tequilana</i> W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).				

En la FIGURA 7.13 se muestra la expresión de eNOS en corazón donde se observa una disminución del 57 % en el grupo FOS-AL con respecto al grupo de DN (0.652 ± 0.134 vs 1.138 ± 0.9 eNOS/Actina; $p < 0.05$). Este resultado coincide con el trabajo reportado por Gómez *et al.* (2004) en donde se estudia la expresión de eNOS en personas con hipertensión arterial y sin ningún otro padecimiento las cuales muestran una disminución de eNOS con respecto al grupo control (normotensos) concluyendo que la posible disminución de eNOS en pacientes hipertensos se podría deber al bloqueo pretranscripcional y postranscripcional del mRNA para la producción de óxido nítrico y por ende de eNOS al igual que las citocinas proinflamatorias y el aumento del colesterol LDL característicos del SM que pueden disminuir su estabilidad transcripcional.

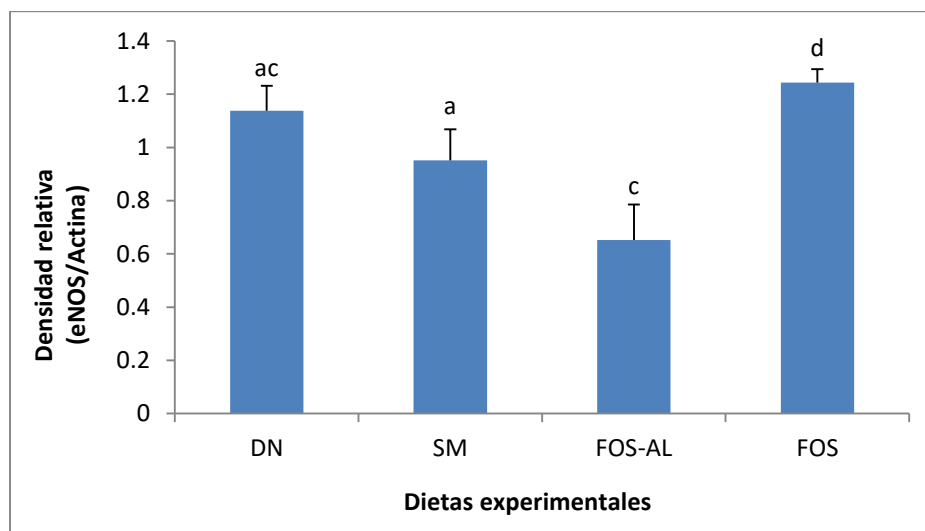


FIGURA 7.13 Densidad relativa de eNOS en tejido cardiaco de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas. ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

En la FIGURA 7.13 se muestra la densidad relativa de CAT en tejido cardiaco en donde se puede observar una disminución del 19% en el grupo de FOS con respecto al grupo de FOS-AL (0.665 ± 0.02 vs 0.794 ± 0.06 CAT/Actina; $p < 0.05$), mientras que los grupos de DN, SM y FOS no presentan diferencia significativa entre ellos. Diversos estudios como el

de Adéchián *et al.* (2009) demostraron que la administración de una dieta alta en grasa y sacarosa por 5 semanas redujo la actividad de CAT en músculo esquelético; Chapman *et al.* (2000) han señalado un incremento de la actividad de CAT en hígado y corazón de ratas donde se administró aceite de pescado dietario. Colbert y Huggins, 2010) observaron una disminución de la expresión génica y actividad de dicha enzima en diferentes tejidos de ratas o ratones alimentados con dietas ricas en grasa. Por lo consiguiente se sabe que CAT tiene como función principal convertir al peróxido de hidrogeno en agua inhibiendo el daño celular y en presencia de obesidad disminuye su actividad (Hsu *et al.*, 2009), lo cual se puede observar en este trabajo donde el grupo de FOS-AL mantiene los mismos valores del grupo de DN indicando que CAT no presenta alteraciones en su actividad.

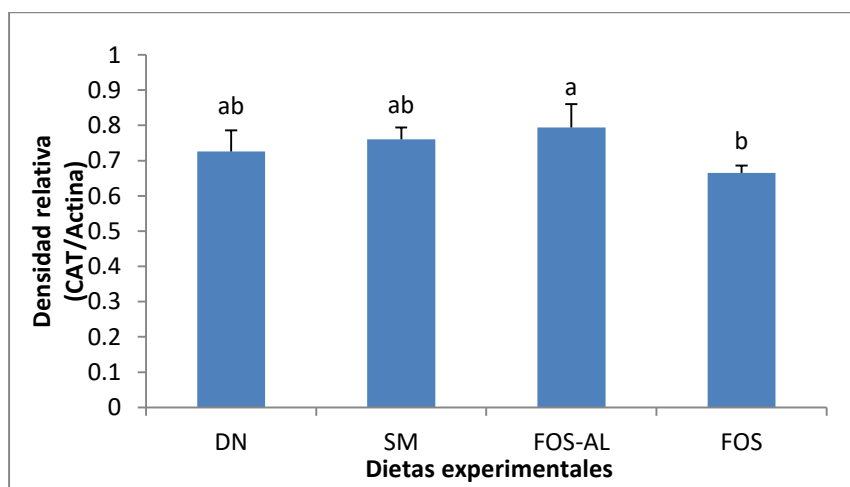


FIGURA 7.14 Densidad relativa de CAT en tejido cardiaco de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.4 Análisis de lactobacilos y bacterias totales en heces

7.4.1 Extracción de DNA en heces de ratas W

En la FIGURA 7.15 se muestran las bandas resultantes de la extracción de DNA de las muestras fecales, en un gel de agarosa al 1%. Como puede observarse en todas las muestras hay una banda de tamaño mayor a 10,000 pb, indicativo de DNA genómico.

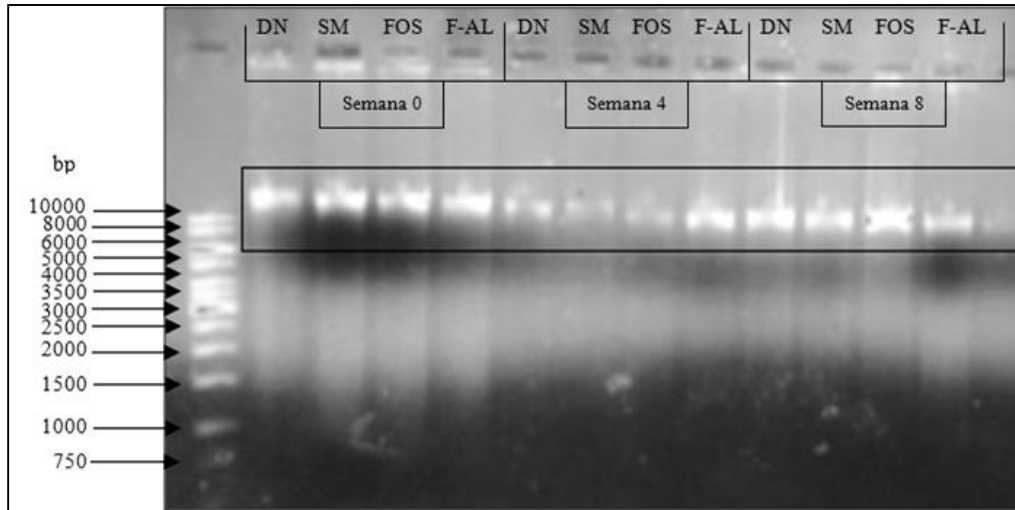


FIGURA 7.15 Muestras de DNA en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

7.4.2 Validación de sondas y cebadores utilizados en RT-PCR para el análisis de lactobacilos y bacterias totales en heces de rata W

Las curvas de amplificación de RT-PCR, obtenidas para cada grupo de microorganismos se muestran en la FIGURA 7.16 para lactobacilos y la FIGURA 7.17 para *E. coli*, donde los valores de Ct se muestran en el eje X, en relación a la fluorescencia obtenida (eje Y) estas amplificaciones demuestran la eficiencia de los iniciadores para la amplificación.

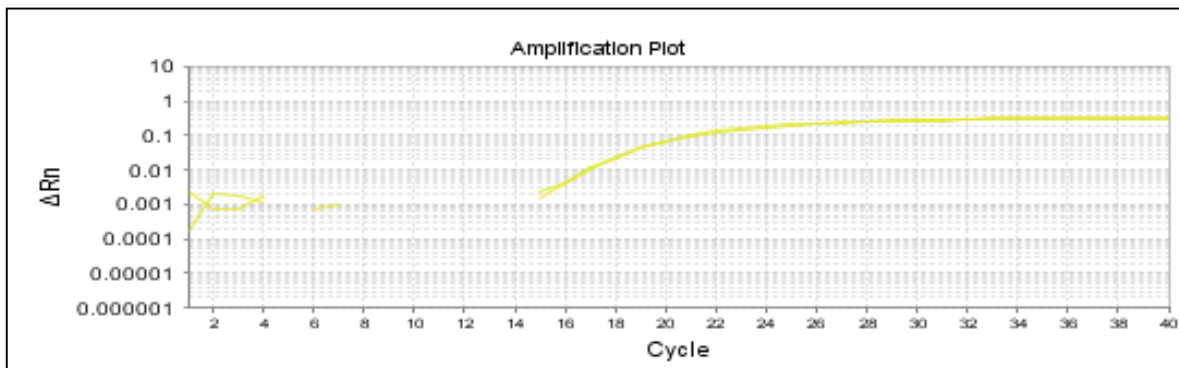


FIGURA 7.16 Amplificación de sonda específico para lactobacilos con RT-PCR.

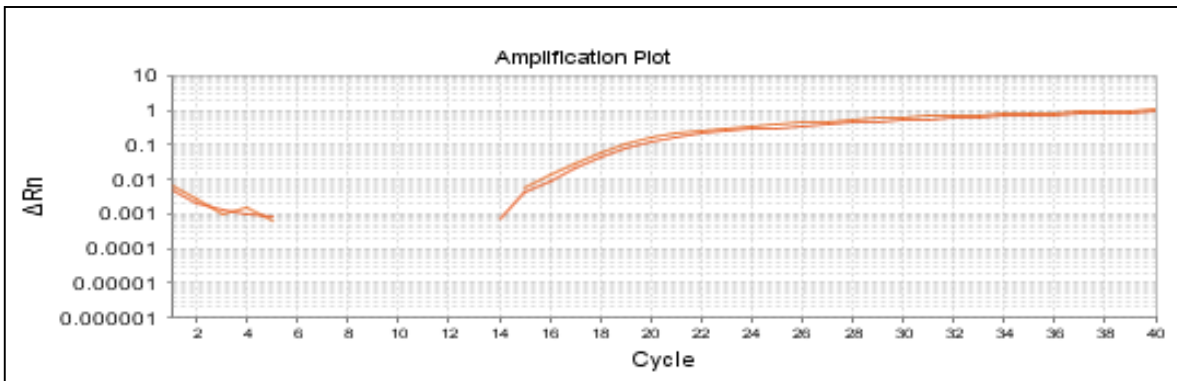


FIGURA 7.17 Amplificación de sonda específico para bacterias (E.coli) con RT-PCR.

7.4.3 Cuantificación relativa de lactobacilos y bacterias totales

En la FIGURA 7.18 se muestra la cuantificación relativa de bacterias totales y lactobacilos proveniente de las heces de la cuarta semana de estudio en donde se puede observar 1.4 veces más de bacterias en el grupo de FOS con respecto al grupo de DN y 0.5 veces más bacterias en el grupo de FOS-AL con respecto al grupo de DN, estos resultados pueden corroborarse con el trabajo de Filippo *et al.* (2010) en donde al administrar dietas con alto contenido en grasas y azúcares en ratas encuentra un aumento en la masa bacteriana a comparación de los grupos alimentados con dieta estándar, de igual manera observa que al administrar dieta alta en grasas (18-31g/día), proteína animal (30-40 g/día), almidón y polisacáridos provenientes de plantas (102-148 g/día) predomina el género actinobacteria y bacteroide, mientras que en dietas ricas en proteínas animal (41-66 g/día), azúcares refinados (190-290g/día), almidón y grasa (56-73g/día) y baja en fibra (5 a 8g/día) predomina el género firmicutes y proteobacteria.

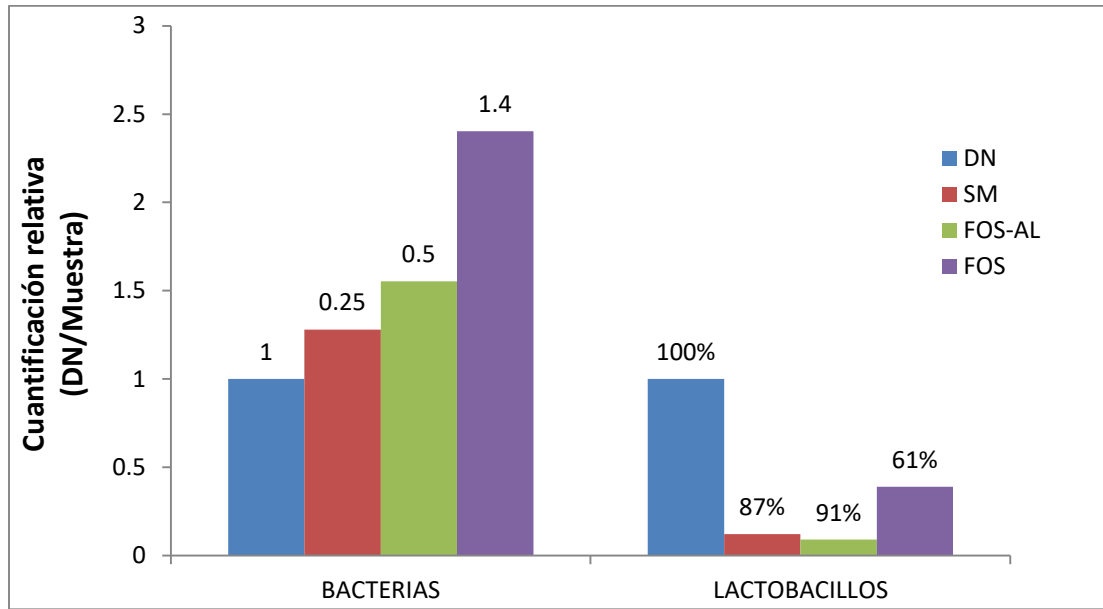


FIGURA 7.18 Cuantificación relativa de lactobacilos y bacterias totales en muestras de heces de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

7.5 Pruebas de comportamiento conductual en ratas

7.5.1 Prueba de laberinto de brazos elevados

En la prueba de laberinto de brazos elevados se midieron distintos parámetros los cuales se muestran en la TABLA 7.5, para cada uno de los grupos de estudio no se encontraron diferencias significativas entre ellos, cabe recalcar que esta prueba se realiza para medir la ansiedad experimental causada por sustancias con potencia ansiolítica, se mide a través del índice de ansiedad (IA) donde los valores cercanos a 1 indican un comportamiento ansiogénico y valores cercanos a 0 indican comportamientos ansiolíticos, en este trabajo los valores de IA no presentaron diferencia significativa entre los grupos ni con el grupo de DN manteniéndose en valores de (0.50 ± 0.02) lo cual indica que los grupos alimentados con FOS y FOS-AL no presentan características ansiolíticas ni ansiogénicas.

TABLA 7.5 Parámetros medidos en la prueba de laberinto de brazos elevados en ratas con síndrome metabólico suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA de 1 vía						
Variable	Grupos				Estadístico	<i>p-value</i>
	DN	FOS	FOS AL	SM		
PEBA	0.49 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	3.28	0.053
HD	26.5 ± 7.59	19 ± 3.65	21.8 ± 2.86	23.4 ± 6.22	1.385	0.288
THD	64.97 ± 20.04	41.63 ± 6.89	55.56 ± 13.79	48.54 ± 16.73	1.762	0.201
Prueba de Kruskal-Wallis						
Variable	Grupos				Estadístico	<i>p-value</i>
	DN	FOS	FOS AL	SM		
EBA	16.75 ± 1.71	10.75 ± 4.99	14.2 ± 2.68	13.4 ± 2.31	5.993	0.112
TEBA	114.09 ± 33.46	122.97 ± 5.16	127.44 ± 17.83	123.87 ± 16.86	0.805	0.848
IA	0.51 ± 0.06	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.995	0.803
AT	1 ± 1.41	2.75 ± 0.5	3 ± 2.73	1.2 ± 0.44	5.323	0.15
TA	0.57 ± 0.85	2.94 ± 1.55	2.8 ± 2.83	0.7 ± 0.12	8.624	0
Permanencia en brazos abiertos (PEBA), Head-dipping (HD), Tiempo en head-dipping (THD), entrada a brazos abiertos (EBA), tiempo de entradas a brazos abiertos (TEBA), Attempts (AT), tiempo en attempts (TA) e Índice de ansiedad (IA), Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de <i>Agave tequilana</i> W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).						

7.5.2 Prueba de nado forzado

Esta prueba es utilizada para detectar sustancias con potencial antidepresivo por lo que en la FIGURA 7.19 se puede observar los tiempos de inmovilidad de cada uno de los grupos experimentales los cuales no mostraron diferencia significativa entre ellos ni con

respecto al grupo control lo cual indica que la suplementación con FOS y FOS-AL no alteran el comportamiento del sistema nervioso como sustancias estimulantes o depresoras.

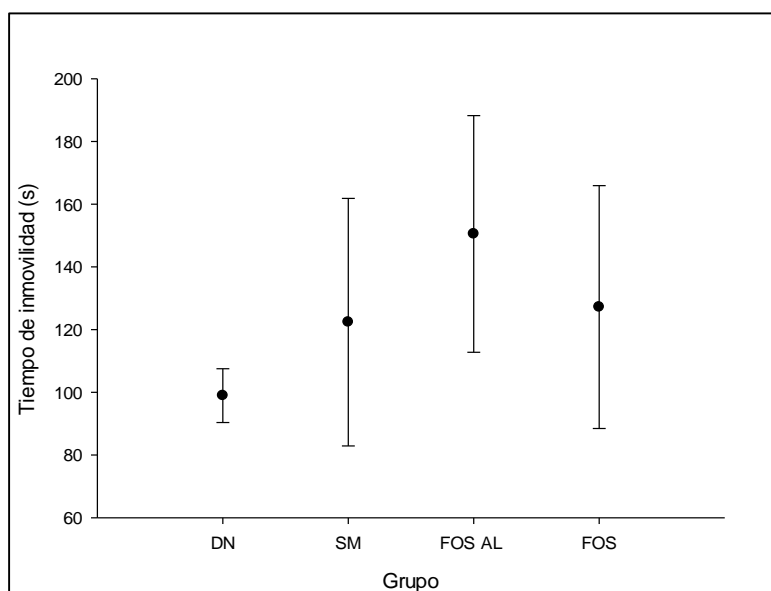


FIGURA 7.19 Tiempo de inmovilidad empleado en la prueba de nado forzado en ratas con síndrome metabólico suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

7.5.3 Prueba de campo abierto

La prueba de campo se utilizó para descartar o identificar alteraciones en la actividad locomotora, producida por los tratamientos al igual que para reforzar los resultados de las otras pruebas, sus parámetros a medir fueron los que se muestran en la TABLA 7.6 donde se puede observar que no presentan diferencia significativa entre los grupos ni con respecto al grupo de DN por lo consiguiente no presentan cambios en la conducta por lo que los resultados de las pruebas anteriores no son atribuidas a problemas locomotores.

TABLA 7.6 Parámetros evaluados en la prueba de campo abierto de ratas con síndrome metabólico y suplementadas con FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA de 1 vía						
Variable	Grupos				Estadístico	<i>p-value</i>
	DN	FOS	FOS AL	SM		
CC	88 ± 23.76	69.25 ± 35.02	69.8 ± 8.81	71 ± 11.04	0.762	0.534
TCV	78.04 ± 19.16	81.92 ± 37.65	90.93 ± 16.62	93.09 ± 14.41	0.439	0.729
TACI	5.65 ± 3.32	1.22 ± 2.45	12.43 ± 10.22	12.87 ± 11.61	1.932	0.171
Prueba de Kruskal-Wallis						
Variable	Grupos				Estadístico	<i>p-value</i>
	DN	FOS	FOS AL	SM		
CV	46.25 ± 7.36	42 ± 16.43	47.8 ± 6.14	52.8 ± 9.6	1.685	0.64
ACI	2.5 ± 1.91	0.25 ± 0.5	3 ± 1	2.8 ± 2.16	7.232	0.065
Cuadros cruzados (CC), Tiempo en columna vertical (TCV), Tiempo de acicalamiento (TACI), Columna vertical (CV), Acicalamiento (ACI), Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de <i>Agave tequilana</i> W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).						

7.6 Análisis de microvellosidades de colon transverso

En la FIGURA 7.20 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido, donde el grupo de FOS-AL presenta un aumento del 12% con respecto al grupo de SM (45.3 ± 0.7 vs $40.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$; $p < 0.05$) y 35% (45.3 ± 0.7 vs $29.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$; $p < 0.05$) con respecto al grupo de FOS, al igual que una disminución del 25% del grupo de SM con respecto al grupo de DN (40.5 ± 0.6 vs $53.5 \pm 0.18 \mu\text{m}$; $p < 0.05$). Esto puede deberse a que los prebióticos, y en específico los fructanos, pueden afectar al desarrollo intestinal a nivel macroscópico (longitud del intestino) como microscópico (tamaño y densidad de vellosidades y microvellosidades). Algunas investigaciones

sustentan la idea de que el uso de prebióticos puede producir un incremento de la altura de las vellosidades y microvellosidades intestinales, así como de la propia longitud del intestino. Algunos autores consideran que el incremento en la concentración de ácidos grasos volátiles (butírico, acético y propiónico) de alto contenido energético podrían producir una hiperplasia de la mucosa y un incremento del espesor de la pared intestinal (Rémésy *et al.*, 1993). Particularmente el butirato tiene mayor importancia en relación con la estructura intestinal actuando como estimulador de la división celular. Además, se considera que es la principal fuente de energía para los enterocitos, induciendo una mayor proliferación celular de la mucosa intestinal. (Topping y Clifton, 2001). Sin embargo en este trabajo el grupo de FOS-AL mostró mayor crecimiento en las microvellosidades del colon, esto pudiera deberse a que la esterificación con ácido láurico brindo un efecto protector a los FOS evitando su degradación a lo largo del tracto digestivo mejorando su biodigestibilidad y aprovechamiento para la microbiota.

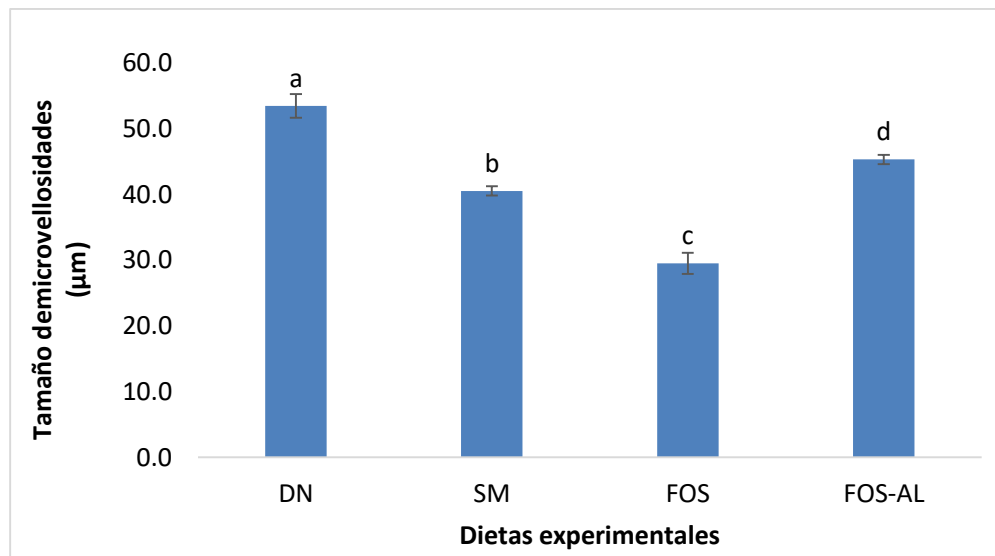


FIGURA 7.20 Tamaño de las microvellosidades después de la ingesta FOS y FOS-AL durante ocho semanas.

ANOVA realizado por prueba Tukey $p < 0.05$ donde las letras diferentes denotan diferencia estadística); Dieta normal (DN), Síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

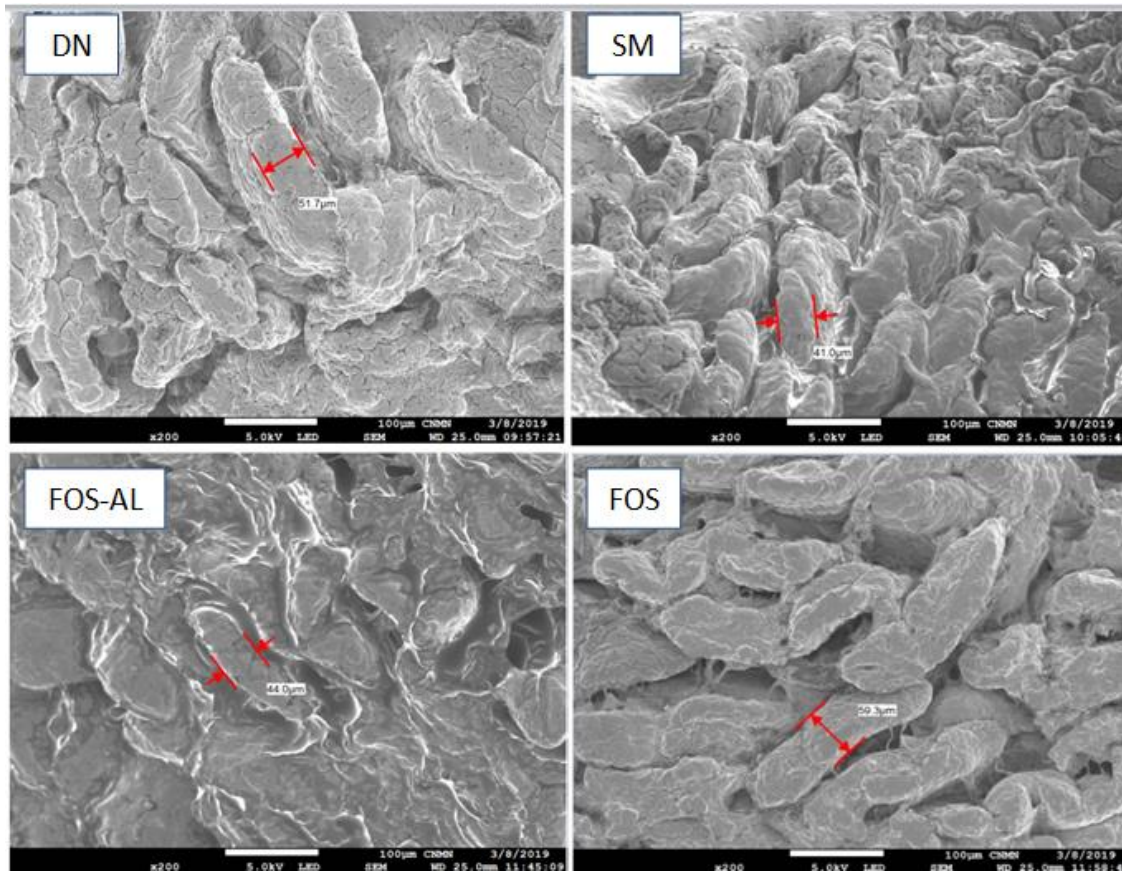


FIGURA 7.21 Fotografías de alta resolución de las microvellosidades del colon transverso de ratas alimentadas con dieta HFHC y suplementadas con FOS-AL y FOS tomadas por un microscopio electrónico de barrido.

* Dieta estándar (DN), dieta alta en grasas y carbohidratos (HFHC), síndrome metabólico (SM), Fructooligosacáridos de *Agave tequilana* W. (FOS) y Fructooligosacáridos esterificados con ácido láurico (FOS-AL).

8 CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros fisiológicos y bioquímicos entre los grupos administrados con FOS-AL y FOS pero si con respecto al grupo de SM esto indica la inducción aguda del SM en los modelos.

La suplementación de FOS y FOS-AL presentan beneficios multifactoriales ya que logran disminuir algunos factores que conforman el SM como la R.I, TG, CHOL, glucosa en ayunas y circunferencia abdominal a comparación de los fármacos en el mercado los cuales atacan un solo factor.

La esterificación con ácido láurico no altera los beneficios a la salud aportados por los FOS, por lo cual podría ser utilizado como ingrediente funcional en la industria alimentaria.

Los FOSAL pueden ser utilizados en la industria alimentaria como modificadores de textura, emulsificantes y surfactantes ya que no presentan efectos adversos en la salud de ratas con SM, sin embargo se recomienda extender el estudio a diferentes dosis y tiempos.

No se presentaron cambios en conducta de los modelos tras la ingesta de FOS y FOS-AL a las dosis señaladas.

La ingesta de FOS y FOS-AL promueven el cambios en las microvellosidades del colon transversal de las ratas suplementadas.

Los FOS y FOS-AL aumentan el crecimiento de bacterias totales, sin embargo no se detectaron concentraciones altas de *Lactobacillus* pudiendo deberse a que sean otros géneros como *Bifidobacterium* los que predominen los cuales no fueron estudiados en este proyecto.

9 RECOMENDACIONES

Realizar estudios de biodigestibilidad del compuesto FOS-AL para poder determinar la disponibilidad de este por la microbiota en el intestino grueso.

Preservar las muestras fecales en solución amortiguadora evitando así su degradación para los futuros análisis.

Cuantificar los géneros de bifidobacterias y enterococos en las muestras fecales.

Medir lipoproteínas de baja y alta densidad para esclarecer ciertos parámetros del M y concluir de manera acertada.

Medir expresión de GLP-1, TNF- α , adiponectinas, Leptina y PPARs ya que estos componentes pueden elucidar el mecanismo de inflamación y resistencia a la insulina.

10 BIBLIOGRAFÍA

Acosta M.A., Escalona M.O., Maiz G.A., Pollack C.F. y Leighton P.F. 2012. Determinación del índice de resistencia insulínica mediante HOMA en una población de la Región Metropolitana de Chile. *Rev. Med. Chile.* 130(11):1227-1231.

Adéchian S., Giardina S., Rémond D., Papet I., Buonocore D., Gaudichon C., Dardevet D., Marzatico F. y Mosoni L. 2009. Excessive Energy Intake Does Not Modify Fed-state Tissue Protein Synthesis Rates in Adult Rats. *Obesity.* 17:1348-1355.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2001. Farmacopea, Argentina. [Consultado el 17 de Septiembre del 2019]. Recuperado de: <http://www.anmat.gov.ar>

Aguilera A.A, Diaz G.H., Barcelata M.L., Guerrero O.A., Ros R.M. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 15:(3)50-7.

Aguirre A.L.M., Ruiz R.M.C., Mercado G., Camberos E.P, González A., Gálvez G., Martínez D. y Sahagún O. 2013. Effects of *Agave tequilana* fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacillos/Bifidobacteria in obese mice. *Food y Function.* 4:1237-1244.

Aguirre M. A. L, Ruiz C. M. R., Mercado G. Y. K., Camberos P. E., Avila G. M., Gastelum G. F. J., Martínez D. N. E. y Sahagun O. D. 2016. Fructans from *Agave tequiliana* with a lower degree of polymerization prevent weight gain, hyperglycemia and liver steatosis in high-fat diet-induced obese mice. *Plants Foods Hum Nutr.* 71:416-421.

American Dietetic Association. 1999. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 99:1278–1285.

Appel L.J., Moore T.J., Obarzanek E., Vollmer W.M., Svetkey L.P., Sacks F.M., Bray G. A., Vogt T. M., Cutler J. A., Windhauser M. M., Lin P. H. y Karana N. 1997. A clinical trial of the effects of dietar patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 336(16):1117-24.

Arias D. J. y Balibrea J. 2007. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp.* 22(2): 160-68.

Assuncao M.L., Ferreira H.S., Dos Santos A.F., Cabral C.R.Jr. Y Florencio T.M.M.T. 2009. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. *Lipids.* 44(7):593 - 601.

Baez D.B.G., Pérez F.R., Zamora G.I., Torres R.E., Ruíz V.G. y Nieva V.A. 2011. Síndrome metabólico y su relación con estrés oxidativo. *Nutr Res.* 8(5):2814-2822.

Barrientos C., Racotta R. y Quevedo L. 2010. Glucosamine attenuates increases of intraabdominal fat, serum leptin levels, and insulin resistance induced by a high-fat diet in rats. *Nutr Res.* 30:781–800.

Barros, D., Amaral, O.B., Izquierdo, I., Geracitano, L., Raseira, M.D.C.B., Henriques, A.T. y Ramirez, M.R. 2006. Behavioral and genoprotective effects of vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 84(2):229-234.

Barros, M., Boere, V., Huston, J.P. y Tomaz, C. 2000. Measuring fear and anxiety in the marmoset (*Callithrix penicillata*) with a novel predator confrontation model: effects of diazepam. *Behav Brain Res.* 108(2):205-211.

Becerra G. A.M., Madalena A.C., Estanislau C., Rodríguez R.J.L., Dias H., Bassi A., y Morato S. 2007. Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y mal adaptaciones. *RLP.* 39(1):75-87.

Belzung, C. y Griebel G. 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav Brain Res.* 125:141-149.

Benkeblia, N. 2013. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Nutr hosp.* 1313:54-61.

Borsini, F. 1995. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev.* 19(3):377-395.

Brown A. J., Goldsworthy S.M., Barnes A.A., Eilert M.M., Tcheang L., Daniels D., Muir A. I., Wigglesworth M.J., Kinghorn I., Fraser N.J. 2003. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278:11312–11319.

Busse R. y Mülsch A. 1990. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS letts.* 265:133-136.

Canalizo M.E., Favela P.E.A., Salas A.J.A., Gómez D.R., Jara E.R., Torres A.L. y Viniegra O.A. 2013. Guía de práctica clínica diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 51(6):601-720

Carobrez A.P. y Bertoglio L.J. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(8):1193-1205.

Carrasco N.F., Galgani F.J.E. y Reyes J.M. 2013. Síndrome de resistencia a la insulina, estudio y manejo. *Rev. Med. Clin.* 24(5):827-837.

Casas G.L., Arrizon J., Arrieta B.D., Plou J.F. y Sandoval G. 2016. Synthesis and emulsifying properties of carbohydrate fatty acid esters produced from Agave tequilana fructans by enzymatic acylation. *Food Chem.* 204:437-43.

Castro D.A.S. y Guerrero B.J.A. 2013. El agave y sus productos. *TSIA.* 7(2):53-61.

Cencic A. y Chingwaru W. 2010. The role of functional Foods, Nutraceuticals, And Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients.* (2):611-625

Cerna C.J., Díaz R.M.I., Cervantes K.V.H., Cardenas A.M. Hernández E.V.M. y Montero C.S.A. 2014. Analisis del efecto de la sal en el desarrollo de obesidad. *Rev. cuba. investig. bioméd.* 33(2):119-128.

Chapman C., Morgan L. y Murphy M. 2000. Maternal and early dietary fatty acid intake: changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats. *J Nutr* 130:146-151.

Chirido G.F., Menendez M.A. y Pita M.L. 2011. M. Prebiotics in infant health. *Arch Argent Pediatr.* 109(1): 49-55.

Cohen H., Matar M. A. y Joseph Z. 2013. Animal models of post-Traumatic stress disorder. *Curr Protoc Neurosci.* 9:9-45.

Colbert C.K. y Huggins K. 2010. Consumption of a high glycemic index diet increases abdominal adiposity but does not influence adipose tissue pro-oxidant and antioxidant gene expression in C57BL/6 mice. *Nutr Res.* 30:141-150.

Corrales C.L. y Muñoz A.M.M. 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova.* 10:135-250.

Crepaldi G., Maggi S., Rammet P., Alberti G., Mohan V., Deepa M., Chan J., Caprio S., Simmons D., Standl E., Shaw J., Eckel R. y Grundy S. 2006. El síndrome metabólico. *Diabetes.* (51):8-31.

Cruz H.J., Licea P.M.E., Hernández G.P., Abraham M.E.A. y Yanes Q.M. 2010. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Clin.* 58(1)4-15.

Csáki K.F. 2011. Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction. *Med Hypotheses.* 76:76–81.

Cummings J.H, Pomare E.W, Branch W.J, Naylor C.P. y Macfarlane G.T. 1987. Ácidos grasos de cadena corta en el intestino grueso humano, portal, sangre hepática y venosa. *Nutr Hosp.* 28:1221-1227.

De Lany J.P., Windhauser M.M., Champagne C.M. y Bray G.A. 2000. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 72(4):905-911.

Delzenne N.M. y Kok N. 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 73:456-458

Den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 54(9):2325-40.

Deveraj S., Hemarajata P. y Versalovic J. 2013. La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: implicaciones con la obesidad y diabetes. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 47(2):421-34.

Draganov P.V. 2009. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol.* 15:81-85.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2018. Informe final de resultados. [Fecha de consulta 31 de enero del 2020]. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Enzi G., Busetto L., Inelmen E. M., Coin A., Sergi G. 2003. Historical perspective: visceral obesity and related comorbidity. *Nutr Hosp.* 27: 534-5.

Escudero A.E. y González S.P. 2006. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* 2:61-72.

Espinoza L.A., Galindo A., Martínez G.A., Díaz F., Aguilera V., Torre I.C. y Cardenas A. 2008. Regulación de la conducta alimentaria ante cambios en el contenido nutricional del alimento en ratas. *Psicologia iberoamericana*. 16:22-28.

Feldstein A.C. y Romero J.C. 2007. El sistema renina angiotensina en la hipertensión esencial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2(2):49-58.

Fernández D.R. 2017. Evaluación del efecto del jugo de zarzamora (*Rubus fruticosus*) sobre la ansiedad experimental en la rata Wistar. Tesis para obtener el grado de maestro en neuroetología. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver.

Fernández L.M. 2012. Utilización de Modelos animales en investigación del Cáncer. *Salud militar* 31(1):55-58.

Ferreira L., Lisenko K., Barros B., Zangeronimo M., Pereira L. y Sousa R. 2014. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: A systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr* . 98(1):1-8.

Ferreira M.J y Luengo F.E. 2007. Alimentos funcionales y nutraceuticos. *Rev Esp Cardiol Supl*. 54:1-11

Ferrer L.B. y Dalmau S.J. 2001. Alimentos funcionales: Pro bióticos. *Acta Pediatr Esp*. 67(5): 223-230

Folch J, Lees M. y Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Jour Biol Chem*. (1):497-509.

Gancheva S., Zhelyazkova S.M., Galunska B. y Chervenkov T. 2015. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scr Sci Med.* 47:14–21.

García A.M.B., Cardenas F. P. y Morato S. 2005. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 85(3):265-270.

García C.Y., Ayala L., Bocourt R., Albelo N., Nuñez O., Rodriguez Y. y López G.M. 2018. Agavins as prebiotic. their influence on lipid metabolism of pigs. *Cuban J Agr Sci.* 52(4).

García M.A.J., Cházaro B.M.J., Nieto S.J., Sánchez T.L.F., Tapia C.E., Gómez L.J.F., Tamayo O.M., Narváez Z.J.A., Rodríguez G.B., Palomino H.G.A., Martínez R.J., Martínez R.J.C., Quiñones A.E.E., Rincón E.G., Beltrán G.M.J., Quí Z.J.A., Guzmán M.R., Mercado F.Y., Ragazzo S.J.A., Calderón S.M. y Gutiérrez M.A. 2017. Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. *AGARED.* 1:217-293.

Gibson G.R, Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr;* 125:1401–1422.

Gomez F.P., Sanchez M.V., García M.F., Medina J. y Almaraz M. 2004. Expresión vascular de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en la hipertensión arterial. *SEN.* 24(5) 486 – 488.

Gómez S.B., Díaz F.B., Rodriguez M.M. 2011. Farmaceuticos comunitarios. *Revista Trimestral* 3(3):112-118.

Gonzales F.A. 2012. Caracterización de las propiedades funcionales de fructanos de agave para su uso como sustitutos de grasa en alimentos. Tesis de maestría en ciencias en desarrollo de productos bióticos. Universidad Autónoma de México. Estado de México, México.

González S.O., Arpa G.A., González M.M. y Pérez A. J. L. 2009. Valoración del estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico. *Rev Cub de Med Mil.* 38(3-4) 40-52.

Gutiérrez G.A.G., y Contreras, C.M. 2002. Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Biomédica.* 13:189-209.

Hall, C.S. 1934. Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *Rev Cub de Med Mil.* 7:89-108.

Hao L., Lu X., Sun M., Li K., Shen L. y Wu T. 2015. Protective effects of L-arabinose in high carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Food Nutr Res.* 59:(2)88-86.

Haubert B.G.B.J.N., Marchini J.S., Cunha C.F.S., Suen M.M., Padovan J.G., Junior J.A.A., Alves M.M.M.C., Marchini M.F. y Vannuchi H. 2015. Choline and Fructooligosaccharide: Non-alcoholic Fatty liver disease, cardiac fat deposition, and oxidative stress markers. *Nutr Metab Insights.* 8:1-16.

He J., Klag M.J., Whelton P.K., Chen J.Y., Qian M.C. y He G.Q. 1995. Dietary macronutrients and blood pressure in southwestern China. *J Hypertens.* 13(11):1267-74.

Hernández H.A., Coronel R.C., Monge Z.M. y Quintana H.C. 2015. Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatr Integral*. (5):337-354.

Hsu C.L., Wu C.H., Huang S.L. y Yen G.C. 2009. Phenolic Compounds Rutin and o Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats. *Agric Food Chem*. 54:425-431.

Imondi A.R. y Bird F.H. 1966. The turnover of intestinal epithelium in the chick. *Poult Sci*. 45:142-147.

Iñiguez C., Díaz T., San Juan D., Anzaldo H. y Rowell M. 2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of Agave tequilana Weber azul leaves. *Bioresour Technol*. 77:101-108.

Isabel B., Velasco S. y Rebolé A. 2014. La inulina y los fructooligosacaridos en la alimentación del ganado porcino. *J. Comp. Psychol*. 17(1):89.

Kabara J.J. 2001. Nutraceuticals from Tropical Oils. En: Memorias 9° Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites de la AOCS, 26- 29 de noviembre de 2001. Memorias, AOCS. San José. Costa Rica.

Karen M., PGDipSc. Y Welma S. 2014. Effects of Medium-Chain Triglycerides on Weight Loss and Body Composition: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Acad Nutr Diet*. 115:249-263.

Karimi I. 2012. *Animals Models as Tools for Translational research: Focus on Atherosclerosis, Metabolic Syndrome and Type-II Diabetes Mellitus*. 3rd Ed. IntechOpen, Rijeka, Croacia. pp 509-530.

Kaume L., Gilbert W., Gadang V. y Devareddy L. 2011. Dietary supplementation of fructooligosaccharides reduces hepatic steatosis associated with insulin resistance in obese Zucker rats. *J. Funct. Foods*. 1(5):199-213.

Kok N.N., Taper S.H. y Delzenne M.N. 1998. Oligofructose Modulates Lipid Metabolism Alterations Induced by a Fat-rich diet in Rats. *J Appl Toxicol*. 18(1):47-53.

Kralova I., Sjöblom J. Surfactants used in food industry: a review. 2009. *J Dispers Sci Technol*. 30:63–83.

Kuan W.S., Yong K.C., Hj S.F.; Fairus A. y Ima N.S. 2016. Animals models of metabolic syndrome: a review. *Ann. Nutr. Metab*. 2:13-65.

Kumar V., Bhat, Z. A. y Kumar, D. 2013. Animal models of anxiety: a comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 68(2):175-183.

Laborda, M.A. 2009. Modelos animales en psicopatología experimental: miedo, tolerancia a las drogas y condicionamiento. *Revista de Psicología*. 14:81-104.

Lamas R., Sandoval F., Osuna T., Prado M. y Gschaedler M. 2004. *Cocimiento y Molienda. Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y Perspectivas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco. Guadalajara, México.

Le Poul E., Loison C., Struyf S., Springael J. Y., Lannoy V., Decobecq M. E., Brezillon S., Dupriez V., Vassart G., Van Damme J. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 278:25481–25489.

Lebovitz H. 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin End Diabetes.* 109(2):135-48.

Lee Y., Kim, A.Y., Choi J.W., Kim M. Yasue S., Son H.J., Masuzaki H., Park K.S. y Kim J.B. 2008. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol.* 22:2176-2189.

Lerner A, Matthias T. 2015. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 14(6):79-89

Ilbäck N.G., Nyblom M., Carlfors J, Fagerlund B., Tavelin S. y Glynn A.W. 2004. Do surface-active lipids in food increase the intestinal permeability to toxic substances and allergenic agents? *Med Hypotheses.* 63:24–30.

López A.J. 2004. Genética en la obesidad. *Rev Endocrinol Nutr.* 12(4):96-101.

Luna, T.G. 2010. Madurez del Agave tequilana Weber var. azul y su relación con las características de los fructanos acumulados en su piña. Tesis de doctorado en Ingeniería de procesos. Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco. México.

Maiz G.A. 1997. Consecuencias patológicas de la obesidad: Hipertensión arterial, Diabetes mellitus y dislipidemia. *Rev ciencias medicas*. 26(1).

Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. 2014. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Res Int*. 2(6):38-97.

Maron M.D. y Ames N.B. 1982. Revised methods for the Samonella mutagenicity test. *Mutat. Res*. 173-215.

Márquez-Aguirre A.L., Camacho R.R.M., Arriaga A.M., Padilla C., Kirchmayr M.R., Blasco J.L. y González A.M. 2013. Effects of Agave tequilana fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacilli/Bifidobacteria in obese mice. *Food Funct*. 4(8):1237-1244.

Mellado M.E. y López P.M. 2012. Análisis comparativo entre jarabe de Agave azul (Agave tequiliana Weber Var. Azul) y otros jarabes naturales. *Agrociencia*. 47(3):233-244.

Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E. y Mc Laughlin J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Med* 45: 31-4.

Milles, R.D, Butcher, G.D, Henry, P.R y Littell, R.C. 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters and quantitative morphology. *Poult. Sci.*, 85: 476-485.

Mora G. L. 2003. Acido láurico: Componente bioactivo del aceite de palmiste. Cenipalma. *Revista palmas*. 24(1):79-83.

Moreno M. 2012. Definición y clasificación de la obesidad. *Rev. Med. Clin.* 23(2): 124-128.

Nagao K. y Yanagita T. 2010. Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol Res.* 61:208–212.

Nava E., Wiklund N.P., Salazar F.J. 1996. Changes in nitric oxide release in vivo in response to vasoactive substances. *Br J Pharmacol* 119:1211-1216.

Nava E. 1998. Disfunción del endotelio, riñón e hipertension arterial. *Nefrologia*. 18(1):84-88.

Nery C.S., Pinheiro I.L., Muniz G.S., Vasconcelos D.A., Franca S.P. y Nascimento E. 2011. Murinometric Evaluations and Feed Efficiency in Rats from Reduced Litter During Lactation and Submitted or Not to Swimming Exercise. *Rev Bras Med Esporte*. 17(1):49-55.

Novelli E.L.B., Diniz Y.S., Galhardi C.M., Ebaid G.M.X., Rodrigues H.G, Mani F., Fernández A.A.H., Cicogna A.C. y Novelli F.J.L. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 41(1):111–119.

Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genovois C., Grazella L. y Montonati M. 2007. Alimentos funcionales: Fibra prebióticos, probioticos y simbióticos. *Diaeta*. 25(121):20-33

Ortega M.R. 2002. Importancia de las grasas en la alimentacion. *Rev Nurt.* 1:3-11

Pacheco A.M.C. y Jáquez T.J.A. 2017. Prevalencia de síndrome metabólico en la consulta externa. *Rev. Sanid. Milit. Mex.* 71:264-275.

Panchal S.K., Poudyal H., Iyer A., Nazer R., Alam A., Diwan V., Kauter K., Sernia C., Campbell F., Ward L., Gobe G., Fenning A. y Brown L. 2011. High-carbohydrate high-fat (HCHF) diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 57(1): 51-64.

Parrota A. J. 1993. Cocos nucifera L., Coconut, Coconut palm, palma de coco. SO-ITFSM- 57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station

Pastorello M. y Anita I. 2011. Papel de la Angiotensina II en la resistencia a la insulina neuronal en un modelo experimental de diabetes tipo 2 en ratas. *Diabetes internacional.* 3(4):88-97.

Pellow S., Chopin P., File S.E. y Briley M. 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.

Pérez C.D. y López G.R.G. 2004. Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. *An.Vet.* 20:5-20.

Pimentel A.S., Lago G.J.H., Chaves H.M., Kumagai E.E. 2004. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropanoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil. *J Chromatogr A*. 235–239.

Pineda C.A. 2008. Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Colom Med*. 39(1):96-106.

Pino P.O. y Jorge L.F. 2010. Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Proteccion Veg*. 22(1):34-43.

Pluske, J.R., Tompson, M.J., Atwood C.S., Bird P.H., Williams I.H. y Hartmann P.E. 1996. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *Br. J.Nutr.*, 76: 409-422.

Poppitt S.D., Strik C.M., MacGibbon A.K.H., McArdle B.H., Budgett S.C. y McGill A.T. 2010. Fatty acid chain length, postprandial satiety and food intake in lean men. *Physiol Behav*. 101(1):161-167.

Portillo M.P, Serra F., Simon E., Del barrio A.S., Palou A. 1998. Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. *Int J Obes* 22:974-979.

Poudyal H, Panchal S. y Brown L. 2010. Comparison of purple carrot juice and beta-carotene in a high-carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 104:(13)22–32.

Prut, L., y Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463: 3–33

Queneau Y., Chambert S., Besset C. y Cheaib R. 2008. Recent progress in the synthesis of carbohydrate-based amphiphilic materials: the examples of sucrose and isomaltulose. *Carbohydr Res* 3:34-56

Radzuan. J., Nor A. y Msa Y. 1999. Medium chain triglycerides: a brief review. *Porim bulletin.* 38(4): 33-38.

Ramirez H.A., Quevedo C.L., Paniagua C.N., Chamorro G.C., Milliar G.A., Jaramillo F.M.E. 2014. Antioxidant enzymes gene expression and antihypertensive effects of seaweeds *Ulva linza* and *Lessonia trabeculata* in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *J Appl Phycol.* 26(1):597-605

Reaven G. M. 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37(12):1595-607.

Rebolé A., Ortiz L.T., Rodríguez M^a.L., Alzueta C., Treviño J. y Velasco S. 2010. Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination, on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat-and barley-based diet. *Poult. Sci.* 89: 276-286.

Rees D.D, Palmer R.M.J y Moncada S. 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 3375-3378.

Rehman, H, Rosenkranz, C, Bölem, J y Zentek, J. 2007. Dietary inulin affects the morphology but not the sodium dependent glucose and glutamine transport in the jejunum of broilers. *Poult. Sci.* 86: 118-122.

Remesy, C., Levrat, M.A., Gamet, I. y Demigne, C. 1993. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *Am. J. Physiol.* 264:855–862

Roberts C.L., Rushworth S.L., Richman E. y Rhodes J.M. 2013. Hypothesis: increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 7:38–41.

Robledo G. 2014. Genética: Técnicos para Bioterios. [consultado 05 de marzo del 2019] Disponible en: [<https://geneticabioterio.wordpress.com>].

Rodrigues, S.M., LeDoux, J.E. y Sapolsky, R.M. 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:289-313.

Rodríguez E.J.D. y Torres W.M.A. 2017. Evaluación de la toxicidad subcronica de la variedad colombiana *Smallanthus sonchifolis* (yacon) en ratas hembras. *Acta Toxicol. Argen.* 25:91-100.

Rodríguez R.E., Perea J.M., López S.A.M y Ortega R.M. 2009. Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio. *Nutr Hosp.* 24(4):415-421.

Rodríguez R.E., Perea M.J., López S.M. y Ortega M.R. 2009. Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutr hosp* 24(4): 415-425.

Rojas J., Bermúdez V., Leal L., Aparicio D., Peña G., Acosta L., Finol F., Urdaneta A., Colmenares C., Almarza J., Linares S., Carrillo M. y Bustamante M. 2008. "Origen étnico y enfermedad cardiovascular", *AVFT*. 27(1): 41-58.

Ros E., López M.J., Pico C. Rubio M.A., Babio N., Sala V.A., Pérez J.F., Escrich E., Bulló M., Solanas M., Gil H.A. y Salas S.J. 2015. Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta; postura de la Federación Española de Sociedades de Alimentación, Nutrición y Dietética (FESNAD). *Nutr hosp*. 32(2):435-477.

Ros P.M. y Medina G.G. 2011. Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinol Nutr*. 58(7):360-369.

Šabeder, S., Habulin, M., y Knez, Z. 2006. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *J Food Eng*. 77(4):880–886.

Sánchez L. y Neira A. 2005. BIOENSAYO GENERAL DE LETALIDAD EN *Artemia salina*, A LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Cultura Científica* (3):40-45

Santeliz C.E., Romano E.L., González C.A. y Hernández H.H. 2008. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional mas alla del control de la presión arterial. *Rev Mex Cardiol*. 19(1):21-29.

Sanz Y., Santacruz A. y Dalmau J. 2009. Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad y las alteraciones del metabolismo. *Acta Pediatr Esp.* 67(9):437-442.

Selenscig A.D. 2010. Tejido adiposo: Rol de las adipocitoquinas (leptina, TNF- α y adiponectina) en la adiposidad visceral. Relación con los ácidos grasos no esterificados plasmáticos, PPARs, Resistencia insulínica y estrés oxidativo en un modelo experimental de dislipidemia-efecto de los ácidos grasos n-3. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

Shabalina, I.G., W.C. Backlund, J., Bar T., Cannon B. y Nedergaard J. 2008. Within brown-fat cells, UCP1-mediated fatty acid-induced uncoupling is independent of fatty acid metabolism. *Biochim. Biophys.* 1777:642-650.

Sonmez N.W y Eren M. 1999. Effects of supplementation of zinc bacitracin, mannanoligosaccharides and probiotic into the broiler feeds on morphology of the small intestine. *Vet. Fak.* 18:125-138.

Stamler J., Caggiula A. W. y Grandits G. A. 1997. Relation of body mass and alcohol, nutrient, fiber and caffeine intakes to blood pressure in the special intervention and usual care groups in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Clin Nutr.*

Stoscheck C. M. 1990. Quantitation of Protein. *Rev. Enz.* 182: 50-69.

Suman RK, Ray Mohanty I, Borde MK, Maheshwari U, Deshmukh YA. 2016. Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. *Adv Pharmacol Sci.* 3:11-24

Tasayco Y.N.J. 2007. Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Smallanthus sonchifolias* (Yacón) en ratas con diabetes tipo 1 y 2. Tesis de maestría en farmacología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Topping D.L. y Clifton M.P. 2001. Short chain fatty acids and human colonic functions: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81:1031-1064.

Toriz G., Delgado E. y Zuñiga V. 2007. A proposed chemical structure for fructanos from blue agave plant (*Tequiliana Weber* var. azul). *E-Gnosis*. 1(5).

Tremblay A., Royer M. M., Chaput J. P. y Doucet E. 2013. Adaptive thermogenesis can make a difference in the ability of obese individuals to lose body weight. *Int J Obes*. 37(6):759-64.

Turnbaugh, Ley R.E. y Mahowald M.A. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 444:1027-1031.

Ulloa A., Espinosa A., Cruz R.G., Ulloa R.P., Ulloa R.E. y Ramírez R.C. 2010. Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Revista fuente*. 2(5).

Urias S.E. y López G.M. 2004. 1° encuentro participación de la mujer en la ciencia “Efecto prebiótico de los fructanos de agave”. Centro de Investigación y de estudios Avanzados del Instituto politécnico Nacional. León, Guanajuato.

Urias S.J.E. 2008. Efecto prebiótico de los fructanos de agaves *Dasyliroton* y su implicación en el metabolismo de glucosa y lípidos en ratones. Tesis de doctorado en

ciencias en biotecnología de plantas. Centro de Investigación y de estudios Avanzados del Instituto politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.

Vieyra R.P., Jiménez G.C.; Hernández G.M.M. y Hernández A.A. 2000. Bioingeniería aplicada a modelos conductuales en animales de experimentación. Universidad Autonoma del estado de México. Estado de México, México.

Walf, A.A. y Frye, C.A. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2:322-328.

Walsh, R.N., y Cummins, R.A. 1976. The open-field test: A critical review. *Psychol Bull.* 83:482-504.

Williams, J., Mallet, S., Leconte, M., Lessire, M., y Gabriel, I. 2008. The effects of fructo-oligosaccharides of whole wheat on the performance and digestive tract of broiler chickens. *Poult Sci.* 49(3):329-339.

Xu Z.R., Hu C.H., Xia M.S., Zhan, X.A. y Wang M.Q. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* 82: 1030-1036.

Yamauchi K.E. e Isshiki Y. 1991. Scanning electron microscopic observations in the intestinal villi in growing White Leghorn and broiler chicken from 1 to 30 days of age. *Br. Poult. Sci.*, 32: 67-78.

Yason C.V, Summers B.A. y Schat K.A. 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: Pathology. *Am. J. Vet. Res.* 6: 927-938.

American Heart Association. 2017. ¿Qué es la presión arterial alta?. [consultado 03 de febrero del 2020] Disponible en: https://www.heart.org//media/dataimport/downloadables/4/c/5/whatishighbloodpressure_span-ucm_316246.pdf]