



**UNIVERSIDAD AUTONOMA MEROPOLITANA-IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“INFLUENCIA DE NICOTINAMIDA SOBRE EL PERFIL DE LÍPIDOS Y SU
REPERCUSIÓN EN LA ACTIVIDAD DE ESTERASAS CIRCULANTES EN UN
MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO”**

PROYECTO

MAESTRIA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

Biól. Exp. Juan David Villeda González

**Co-Directora Dra. Margarita Díaz Flores
Co-Director Dr. José Luis Gómez Olivares
Asesor Interno Dr. Noé Salinas Arreortua**

Julio 2016

CÓMITE TUTORAL

Co-Directora Externa

Dra. Margarita Díaz Flores

Investigador Asociado D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades Médicas “Dr. Bernardo Sepúlveda”

Centro Médico Nacional S XXI

Correo electrónico: mardiaz2001@yahoo.com

Co-Director Interno

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C

Laboratorio de Biomembranas

Depto. de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Correo electrónico: gool@xanum.uam.mx

Asesor Interno

Dr. Noé Salinas Arreortua

Profesor Asociado D

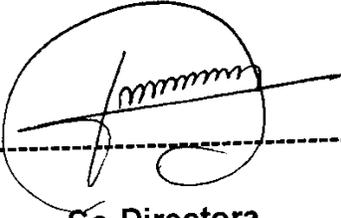
Laboratorio de Biomembranas

Depto. de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Correo electrónico: noes_77@hotmail.com

FIRMAS DEL COMITÉ TUTORAL



A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, is written over a horizontal dashed line. The signature is enclosed within a hand-drawn circle.

Co-Directora

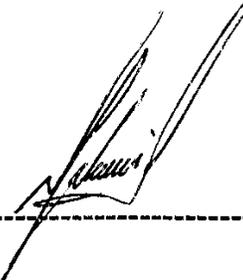
Dra. Margarita Díaz Flores



A handwritten signature in black ink, featuring a long horizontal stroke and a circular flourish on the right side, is written over a horizontal dashed line.

Co-Director

Dr. José Luis Gómez Olivares



A handwritten signature in black ink, with a prominent vertical stroke and a horizontal base, is written over a horizontal dashed line.

Asesor Interno

Dr. Noé Salinas Arreortua

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está considerada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados del CONACYT.

Agradecimientos a CONACYT por los apoyos obtenidos para la Maestría en Biología Experimental, con número de registro UAM-I: 309-0 con clave: C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca N° 570363.

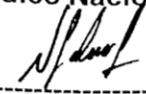
El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biomembranas del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y dentro de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Bajo la dirección de la Dra. Margarita Díaz Flores, el Dr. José Luis Gómez Olivares y la asesoría del Dr. Noé Salinas Arreortua.

A todos ellos mi más profundo agradecimiento por sus enseñanzas, dedicación y constante apoyo para la realización y desarrollo de este trabajo.

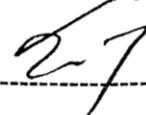
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Influencia de Nicotinamida Sobre el Perfil de Lipidos y su Repercusión en la Actividad de Esterasas Circulantes en un Modelo de Síndrome Metabólico". Que presento Juan David Villeda González el día 19 de Julio del 2016.



Presidenta
Dra. Catarina Munguía Miranda
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI



Secretario
Dr. Noé Salinas Arreortua
Laboratorio de Biomembranas
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal
Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función
FES-Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal
Dr. Benjamín Pérez Aguilar
Laboratorio de Fisiología Celular
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Laboratorio de Fisiología Celular
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Gómez Olivares por abrirme las puertas de su laboratorio desde el primer día que lo conocí, por ayudarme y guiarme en cada momento, por todas sus enseñanzas y consejos, por la comida y convivencia de cada viernes en los seminarios, así como ser parte fundamental de este trabajo y finalmente por la gran amistad brindada.

A la Dra. Margarita Díaz Flores por permitirme ser parte de este gran grupo de trabajo, por toda su ayuda, dedicación y paciencia. Por enseñarme una de las lecciones más importantes en mi vida; “nunca dejar de aprender”.

Por la convivencia y los ricos desayunos al termino de los seminarios, por las valiosas aportaciones y enseñanzas que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Por toda su ayuda en cada aspecto de mi formación, por la confianza y por su forma de ser con migo. Mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Noé Salinas Arreortua por su valiosa amistad, su apoyo y sus consejos en la realización de este trabajo, por la gran ayuda y sobre todo por haberme presentado a la Dra. Margarita.

Por los gratos momentos en la cancha de futbol, y por ser además de mi asesor un gran amigo.

A mis compañeros del “Peine 2” sus charlas y convivencias hicieron que cada momento valiera la pena. Martita Saraí, Sergio, Julio, Carmen, Osiris, Selene, mi querido amigo Rubén y la recién llegada Mariana, Gracias por su amistad y sus enseñanzas. Los quiero amigos!!!

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biomembranas.

A mis compañeros de grupo que durante el primer año de maestría fue muy grato compartir momentos de tensión y estrés. Por las reuniones y charlas que contribuyeron a mi formación.

A mis padres por su infinito amor, comprensión y apoyo en cada etapa de mi vida, a mis hermanos por creer en mí y apoyarme siempre, son mi orgullo y mi fortaleza.

A mis abuelos por todos sus sabios consejos y su eterno amor.

A mi compañera de vida Karen, sin tu ayuda y apoyo tal vez no estuviera aquí. Gracias por haberme dado la mejor dicha que puede experimentar un hombre; y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Este trabajo lo dedico a mi hijo: Mateo

Llegaste en un momento exacto a mi vida.

**Eres mi motor, mi inspiración y mi mejor
“experimento”.**

RESUMEN

Acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa y paraoxonasa-1 son glicoproteínas que además de regular el sistema colinérgico neuromuscular y desintoxicar al cuerpo sus actividades son asociadas con factores de riesgo del síndrome metabólico (SM). El objetivo fue evaluar la participación de nicotinamida (NAM) sobre la actividad y patrón de glicosilación de esterasas circulantes en un modelo de síndrome metabólico. Ratas macho distribuidas en seis grupos recibieron los siguientes tratamientos: 1) Control, 2) NAM5mM, 3) Fructosa, 4) F-NAM5mM, 5) F-NAM10mM, 6) F-NAM15mM. Fructosa al 40% fue administrada en el agua de beber por 16 semanas *ad libitum*; 30 días posteriores inició el tratamiento de NAM (5, 10 y 15mM) en el agua de beber por 5 hr diariamente. Los parámetros evaluados fueron, peso corporal, prueba de tolerancia a la glucosa, presión arterial, perfil de lípidos, transaminasas, actividad específica de esterasas circulantes y patrón de glicosilación de colinesterasas mediante interacción con lectinas de distinta especificidad. Fructosa aumentó colesterol, triacilgliceroles, ácidos grasos, transaminasas y la presión arterial. Así como las actividades de ambas colinesterasas y también disminuyó la actividad de paraoxonasa-1 todo con respecto al grupo control. En contraste, NAM disminuyó las alteraciones metabólicas y las actividades de colinesterasas con valores similares al control. Además de aumentar la actividad de paraoxonasa-1. Lo destacado del patrón de glicosilación para acetilcolinesterasa fue que fructosa disminuyó 80% la interacción con lectina de trigo comparado con el control, recuperando NAM 15% de la interacción. Para butirilcolinesterasa, fructosa disminuyó 50% la interacción

con lectina de lenteja comparado con el control, la cual fue restablecida por NAM. Concluyendo; fructosa disminuyó la actividad de paraoxonasa-1 y aumentó la actividad de colinesterasas además de modificar su glicosilación impidiendo la incorporación de lectina de lenteja a los residuos de manosa presentes en la proteína, así como la incorporación de lectina de trigo a los residuos de N-Acetilglucosamina y ácido siálico, NAM restableció dichas alteraciones dadas por el SM. Estas variaciones estructurales de oligosacáridos presentes en la colinesterasas contribuyen a su plegamiento, estabilidad y función biológica. La dieta es considerada como un factor exógeno encargado de modular el efecto protector y antioxidante de la paraoxonasa-1.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and paraoxonase-1 are glycoproteins that besides regulating the neuromuscular cholinergic system and detoxify the body its activities are risk factors associated with metabolic syndrome (MS). The objective was to evaluate the participation of nicotinamide (NAM) on the activity and glycosylation pattern of circulating esterases in a model of metabolic syndrome. Male rats divided into six groups received the following treatments: 1) Control, 2) NAM5mM, 3) Fructose, 4) F-NAM5mM 5) F-NAM10mM, 6) F-NAM15mM. 40% fructose was administered in the drinking water ad libitum for 16 weeks; 30 days after treatment began NAM (5, 10 and 15 mM) in drinking water for 5 hr daily. The parameters evaluated were, body weight, tolerance test glucose, blood pressure, lipid profile, transaminases, specific activity of circulating esterase and cholinesterase glycosylation pattern by interaction with lectins of different specificity. Fructose increased cholesterol, triacylglycerols, fatty acids, transaminases and blood pressure. And the activities of both cholinesterases and also decreased the activity of paraoxonase-1 whole relative to the control group. In contrast, NAM decreased metabolic alterations and cholinesterase activities with similar values to the control. Besides increasing paraoxonase-1 activity. Highlights glycosylation pattern for acetylcholinesterase was decreased to 80% fructose interaction with lectin wheat compared to the control, 15% of NAM recovering interaction. For butyrylcholinesterase, it decreased 50% fructose interaction with lentil lectin compared to the control, which was restored by NAM. In conclusion; fructose decreased the activity of paraoxonase-1 and increase cholinesterase

activity in addition to modifying its glycosylation prevents incorporation lentil lectin to mannose residues present in the protein, and the incorporation of lectin wheat residues of N- acetylglucosamine and sialic acid, NAM restored these changes given by the SM. These structural variations of oligosaccharides present in the cholinesterases contribute to its folding, stability and biological function. The diet is considered an exogenous factor responsible for modulating the protector and antioxidant paraoxonase-1 the effect.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1. <i>Síndrome metabólico</i>	- 3 -
1.2. <i>Propiedades generales de las paraoxonasas</i>	- 5 -
1.3. <i>Propiedades generales de las colinesterasas</i>	- 6 -
2. ANTECEDENTES	- 8 -
4. HIPÓTESIS	- 13 -
5. OBJETIVO GENERAL	- 13 -
5.1. <i>Objetivos particulares</i>	- 14 -
6. MATERIAL Y METODOS	- 14 -
6.1. <i>Curva de tolerancia a la glucosa</i>	- 15 -
6.2. <i>Obtención de muestras biológicas</i>	- 16 -
6.3. <i>Perfil bioquímico y actividad de colinesterasas en suero</i>	- 17 -
6.5. <i>Cuantificación de TNF-α, IL-6, insulina y ácidos grasos</i>	- 18 -
6.6. <i>Patrón de glicosilación de las colinesterasas</i>	- 18 -
6.7. <i>Análisis estadístico</i>	- 20 -
7. RESULTADOS	- 20 -
6.1 Efecto de nicotinamida sobre el peso corporal, consumo de alimento y bebidas en ratas suplementadas con fructosa.....	- 20 -
6.2 Efecto de nicotinamida sobre el perfil de lípidos y transaminasas en suero de ratas suplementadas con fructosa.....	- 25 -
6.3 Efecto de nicotinamida sobre la presión arterial de ratas suplementadas con fructosa.....	- 28 -
6.4 Efecto de nicotinamida sobre la tolerancia a la glucosa en ratas suplementadas con fructosa.	- 29 -
6.5 Efecto de nicotinamida sobre los niveles de insulina plasmática en ratas suplementadas con fructosa.....	- 31 -
6.6 Efecto de nicotinamida sobre marcadores de inflamación en ratas suplementadas con fructosa.....	- 31 -

6.7 Efecto de nicotinamida sobre la actividad de esterasas circulantes en ratas suplementadas con fructosa.....	- 33 -
6.8 Efecto de nicotinamida sobre la glicosilación de colinesterasas circulantes en ratas suplementadas con fructosa.....	- 36 -
8. DISCUSIÓN.....	- 40 -
9. CONCLUSIÓN.....	- 48 -
10. BIBLIOGRAFÍA.....	- 50 -

Abreviaturas más empleadas

SM: Síndrome Metabólico

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

BuChE: Butirilcolinesterasa

ChE's: Colinesterasas

PON-1: Paraoxonasa-1

NAM: Nicotinamida

Kcal: Kilocalorias

OMS: Organización Mundial de la Salud

ATP-III: Panel Para el Tratamiento de las Dislipidemias

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

TAG: Triacilgliceroles

AGL: Ácidos Grasos Libres

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

AGE's: Productos de Glicación Avanzada

ALT: Alanino-amino-transferasa

AST: Aspartato-amino-transferasa

NAD⁺: Nicotinamida adenina di nucleótido

NADH: Nicotinamida adenina di nucleótido reducido

NADP⁺: Nicotinamida adenina di nucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina di nucleótido fosfato reducido

ATP: Adenosín tri-fosfato

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de salud que México enfrenta, es el sobrepeso y la obesidad (Figura 1). Existen diversos factores que condicionan su avance, entre los que destacan la predisposición genética, el estilo de vida sedentaria y los inadecuados hábitos en la alimentación; el consumo de dietas hipercalóricas, hipercolesterolémicas y con altos niveles de carbohidratos, han sustituido la dieta tradicional del mexicano. Debido a estas razones, México ocupa el segundo lugar con mayor índice de obesidad y sobrepeso en adultos mayores de veinte años (1) y primer lugar en obesidad y sobrepeso infantil a nivel mundial (2). Estas condiciones favorecen el desarrollo de diversas alteraciones metabólicas, que comúnmente se conocen como: “**Síndrome Metabólico**”, el cual es principal desencadenante de diversas patologías crónico-degenerativas donde es común encontrar la presencia de desórdenes metabólicos.

Se han realizado estudios prospectivos donde se asegura que para el año 2050, la cifra de obesidad y sobrepeso aumentará considerablemente, para hombres un 88% y para mujeres un 74% (3), favoreciendo el desarrollo del síndrome metabólico.

Uno de los principales inductores de sobrepeso y obesidad es el aumento en el consumo de alimentos procesados; adicionados con altas cantidades de grasas y carbohidratos. Actualmente, los alimentos industrializados son endulzados con jarabe de maíz de alta fructosa el cual aporta de 85 a 100 gramos diarios de fructosa, obteniendo un aporte de un 25% o más de calorías

requeridas diariamente. Los alimentos endulzados con fructosa que más destacan son: las bebidas gasificadas, dulces, golosinas, botanas y la comida rápida. En la actualidad, México es un país potencialmente consumidor de bebidas gasificadas con un promedio de 1631 litros por persona al año; el alto consumo de este carbohidrato se ha relacionado con los índices de sobrepeso y obesidad.

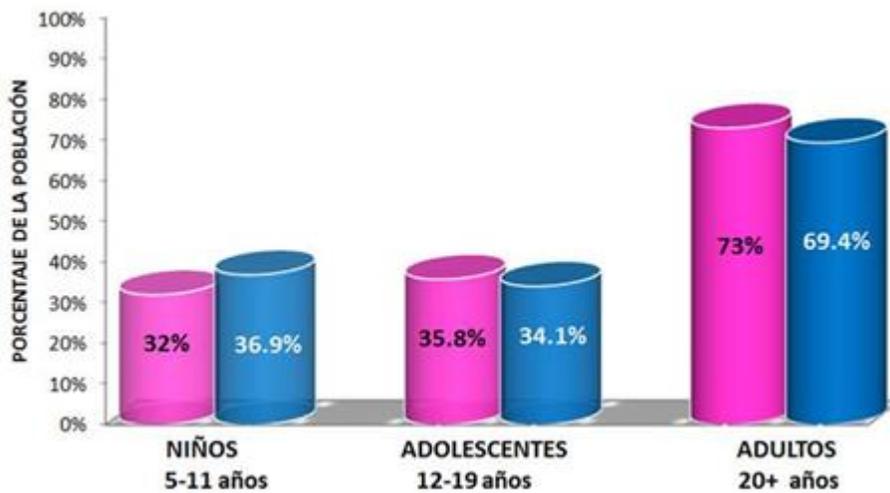


Figura 1. Porcentaje de la población con peso excesivo. Agrupada por edad y género en el período comprendido entre el 2006 y 2012 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012).

1.1. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un término que se acuñó en el año 1998, por la Organización Mundial de la Salud (OMS). A partir de esa fecha, muchos grupos de investigación han tratado de definirlo y establecer los parámetros adecuados para su diagnóstico. Todos concuerdan que está directamente relacionado con el índice de obesidad y sobrepeso, la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la hiperlipidemia y la hipertensión (4).

En consecuencia, el SM puede definirse como un conjunto de alteraciones antropométricas, bioquímicas y clínicas que predisponen al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (5); como la diabetes tipo 2, la enfermedad arterial coronaria, enfermedades cardiovasculares, dislipidemias y diferentes tipos de cáncer, por mencionar algunas.

Diversas organizaciones y asociaciones en materia de salud, en todo el mundo, han desarrollado propuestas que incluyen diversos factores para identificar al SM, una de estas propuestas es la presentada por el panel para el tratamiento de las dislipidemias (ATP-III, por sus siglas en inglés) (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de riesgo utilizados por la ATP III considerados para población mexicana para el diagnóstico de SM.

Identificación clínica del Síndrome Metabólico Solo 3 de los siguientes	
Factor de riesgo	Nivel considerado
Obesidad abdominal	Circunferencia de cintura
Hombre	>102 cm (>40)
Mujer	>88 cm (>35)
Triacilgliceroles	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL	
Hombre	<40 mg/dL
Mujer	<50 mg/dL
Presión Sanguínea	$\geq 130/\geq 85$ mmHg
Glucosa en ayuno	≥ 110 mg/dL

La mayoría de las asociaciones puntualizan que una persona que presente alteraciones, en mínimo tres de estos factores, debe ser considerada que padece SM. A partir de la aplicación de estos criterios parece ser sencillo identificar al SM. Sin embargo, los diferentes estilos de vida, la genética poblacional y la diferencia de razas no facilitan a un estándar en cuanto a los criterios establecidos por las diferentes asociaciones. Es por ello, que surge la necesidad de contar con marcadores biológicos para el diagnóstico del SM; entre los que destacan enzimas involucradas en procesos de lipólisis y lipogénesis, como el grupo de paraoxonasas y colinesterasas, cuyos reportes previos asocian su actividad enzimática con diversos factores de riesgo típicos del SM.

1.2. *Propiedades generales de las paraoxonasas*

Las paraoxonasas (EC 3.1.8.1. arildialquil fosfatasa; hidrolasa de organofosfatos, paraoxonasa; paraoxón hidrolasa. PON-1, PON-2, PON-3) son enzimas del tipo lactonasas (7). Las enzimas PON-1, PON-2 y PON-3 están codificadas en la región 7q21.3-q22.1 del brazo largo del cromosoma 7., Las proteínas PON-1 y PON-3 son proteínas expresadas en hígado y excretadas al torrente sanguíneo, donde se relacionan con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Mientras, que PON-2 no se excreta al torrente sanguíneo, pero se detecta en células vasculares, riñón, corazón, etc. (8).

La PON-1 (E.C. 3.1.1.2. aril-esterásica,) posee además es una actividad enzimática del tipo éster-hidrolasa con la capacidad de romper los fosfolípidos e hidroperóxidos oxidados presentes en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), esta propiedad antioxidante permite frenar el proceso oxidativo de dichas moléculas previniendo o retrasando el desarrollo de una fase aterosclerótica en las arterias, restaurando así a la LDL, para que se acople a su receptor (9).

La PON-1 es una enzima extracelular específica de HDL asociada a la apolipoproteína A1. Se le atribuyen dos funciones: la hidrólisis de compuestos organofosforados (paraoxón) que son metabolitos tóxicos derivados de los plaguicidas (insecticidas), de ésta propiedad se le conoce su primera clasificación otorgada por la unión internacional de bioquímica y biología molecular E.C. 3.1.8.1. Posteriormente, se estableció su capacidad de hidrolizar ésteres aromáticos como el fenil-acetato proponiendo una nueva

actividad de PON-1 que se conoció como la actividad aril-esterasa o antioxidante, que se clasificó como E.C. 3.1.1.2.

1.3. *Propiedades generales de las colinesterasas*

Las colinesterasas (ChEs) son proteínas con una capacidad única de hidrolizar esteres de colina, y se distinguen por ser inhibidas por pequeñas cantidades del alcaloide natural fisostigmina (eserina, nombre comercial). Los vertebrados poseen dos tipos de colinesterasas: La acetilcolinesterasa (AChE) o colinesterasa verdadera, que se clasifica como E.C.3.1.1.7 (acetil-colina hidrolasa) y la butirilcolinesterasa (BuChE), o también llamada colinesterasa sérica o pseudocolinesterasa clasificada como E.C.3.1.1.8, según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. Entre ellas se pueden distinguir por la especificidad del substrato. La AChE posee una afinidad óptima por acetilcolina (ACh), un neurotransmisor. Por otro lado, la BuChE tiene como substrato específico a la butirilcolina, aunque también puede hidrolizar a la acetil- o a la propionilcolina. En la Tabla 2, se muestran algunas diferencias entre ambas colinesterasas.

Las colinesterasas son glicoproteínas que a través de su maduración experimentan modificaciones postraduccionales en donde se incorporan oligosacáridos preformados en el residuo de asparagina (Asn) dentro de determinadas secuencias de la proteína, este procesamiento se lleva a cabo dentro del lumen del retículo endoplásmico rugoso, donde los sitios potenciales de glicosilación son distinguidos por una secuencia consenso caracterizada por

una secuencia de tres aminoácidos: Asn-X (aminoácido cualquiera), Serina (Ser) o treonina (Thr).

AChE posee cuatro sitios potenciales de N-glicosilación sin embargo no se conoce realmente si todos se encuentran glicosilados, la eliminación de estos residuos reduce su secreción y afecta su actividad. BuChE posee nueve sitios de glicosilación unidos a residuos de Asn, estos oligosacáridos representan el 26% de su peso molecular. Lo relevante respecto al proceso de glicosilación es que ambas enzimas experimentan una glicosilación específica por tejido, por lo que el peso de la molécula dependerá del tejido donde se produzca (52).

El estudio de la glicosilación en estas proteínas ha podido esclarecer el mecanismo de protección frente al ataque proteolítico definiendo su circulación plasmática.

La función tradicional de las ChEs es la hidrólisis del neurotransmisor, ACh en las uniones nerviosas y neuromusculares. En el caso de la BuChE, esta función se confirmó en animales carentes de AChE, en los que ésta enzima hidroliza a la ACh.

Sin embargo, las ChEs también se han detectado en los vasos sanguíneos, el hígado, el intestino, el páncreas, las meninges y las células sanguíneas, participando en el metabolismo energético, en la maduración de neuropéptidos, en la eliminación de drogas (cocaína y heroína), y un posible papel como proteína de adhesión. Se reporta que no se encuentran en líquidos de excreción como saliva, lágrimas, orina y sudor (10).

2. ANTECEDENTES

Las actividades enzimáticas de PON-1 y BuChE son consideradas como desintoxicantes a nivel de suero (11). La actividad de estas enzimas se ve relacionada con alteraciones bioquímicas tradicionales durante el SM. Por ejemplo, se ha observado una correlación positiva entre el aumento de triacilglicéridos, el IMC y el colesterol total con la actividad enzimática de BuChE, así como una correlación negativa con los niveles de HDL (12, 13).

Se ha propuesto que la actividad BuChE podría estar relacionada con el metabolismo de lípidos, ya que al ser sintetizada en el hígado experimenta modificaciones postraduccionales de glicosilación; que favorece la interacción de carbohidratos con lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son liberadas al torrente sanguíneo. Este mecanismo se lleva a cabo en el retículo endoplásmico de los hepatocitos, donde también se almacena el glucógeno, se esterifican los ácidos grasos y se realiza la síntesis de ácidos grasos *de novo* este último proceso utiliza carbohidratos provenientes de la dieta. Por lo que, su actividad pudiera ser importante para la evaluación de la funcionalidad hepática (14).

También, la actividad de AChE y de BuChE se han encontrado aumentadas en diabetes tipo 2 (15). Este hecho favorece la idea de considerar la actividad tanto de AChE como de BuChE como posibles marcadores biológicos para el diagnóstico de SM.

Por otra parte, PON-1 posee propiedades antioxidantes asociadas con HDL, previniendo la formación de la placa aterosclerótica por acción de la oxidación de LDL. Sin embargo, se ha observado una disminución en su actividad durante el SM, aumentando también el estrés oxidante y la lipoperoxidación (16). Además, en personas con hipercolesterolemia y que han presentado infarto al miocardio, el contenido se ha visto disminuido (17). Resultados similares se han observado en niños con obesidad y sometidos a hemodiálisis (18). La actividad de PON-1, también ha sido asociada con la estimulación de la liberación de insulina protegiendo de cierto modo a las células β -pancreáticas y evitando el desarrollo de diabetes mellitus (19). Asimismo, se ha observado que las HDL contribuyen en modular la actividad de PON-1 (19).

La posible relación entre BuChE y PON-1, aún no ha sido estudiada y se desconocen los mecanismos en que estén involucradas, específicamente en el desarrollo y el diagnóstico del SM. Existen evidencias que señalan, que PON-1 protege de cierta forma la actividad colinesterásica al romper moléculas derivadas de compuestos organofosforados y carbamatos que inactivan la función de las colinesterasas (20). Los daños de estos plaguicidas en el Sistema Nervioso Central (SNC) pueden conducir a desarrollar diferentes patologías neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson o la Enfermedad de Alzheimer. Que suelen ser producto de una sobre-estimulación por parte del neurotransmisor ACh, al ser inactivadas las actividades AChE y BuChE por una alta exposición a plaguicidas que compiten por el residuo de la

Ser²⁰⁰ en el sitio catalítico, o bien, por un déficit de ACh para realizar estimulación nerviosa, respectivamente (21).

El SM, como un paso previo, al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, representa un atractivo punto de control, donde es posible frenar su avance; incluso revertirlo, mediante el uso de diversos productos de origen natural o sintético utilizados en la industria farmacéutica.

Un ejemplo, es la nicotinamida (NAM), la cual es una vitamina hidrosoluble del grupo de las denominadas vitaminas B, es un precursor de nucleótidos de piridina-adenina (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH). Con base a diversos estudios NAM, ha sido de mucho interés para diversos grupos de investigación a nivel mundial; debido a sus capacidades antioxidantes, inmunoregulatoras, antiapoptóticas, antilipémicas, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas.

Se ha reportado que protege a las células beta del páncreas disminuyendo los niveles de citocinas pro-inflamatorias y la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, la cual puede generar especies reactivas de nitrógeno. Por otra parte, NAM, también estimula la producción de ATP mediante el incremento de cofactores necesarios en la cadena respiratoria como NADH y NADPH, además de que estos mismos cofactores son utilizados en vías biosintéticas y mecanismos de protección contra especies reactivas de oxígeno (ERO), reduciendo la muerte por necrosis o apoptosis (22-23). Estas coenzimas se someten a procesos reversibles de oxidación y reducción para transferir electrones, apoyando la actividad catalítica de las enzimas manteniendo el estado Redox de la célula (22)

Siendo precursor de NAD^+ puede activar a la AMP cinasa por medio de la vía de sirtuínas, cuya función es inhibir enzimas como las lipasas reguladas hormonalmente, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa; que están relacionadas con el metabolismo de los lípidos (23).

Se considera a NAM como un poder reductor. Estudios recientes donde se induce diabetes tipo 2 mediante dietas hipercalóricas y con saturación de grasas, la NAM aumentó la síntesis de NAD^+ mejorando la sensibilidad a la insulina, al disminuir la expresión de genes relacionados con la producción de estrés oxidante; en respuesta a procesos de inflamación de bajo grado (24).

El desarrollo del SM experimental ha sido estudiado en diversos modelos animales. La cepa de ratas *Sprague Dawley* ha demostrado ser susceptibles a dietas hipercalóricas, hipercolesterolémicas y con altos contenidos de carbohidratos, por esto desarrollan rápidamente obesidad y desórdenes metabólicos.

El uso de fructosa como desencadenante de SM experimental refleja su uso diario en el ser humano, debido a que la fructosa fue introducida a la industria alimentaria como sustituto de la azúcar de mesa, siendo este carbohidrato utilizado mayormente en la elaboración de golosinas, caramelos, jugos y bebidas gasificadas, debido a su poder dulcificante -edulcorante- el cual es mucho mayor al de la sacarosa (26). En los últimos años su consumo ha aumentado exponencialmente considerándose como un factor dentro de la dieta con un poder desencadenante de la obesidad, y por consecuencia SM, favoreciendo la lipogénesis y la hiperlipidemia (27). Los mecanismos

implicados en el desarrollo del SM por la ingesta de fructosa han sido poco estudiados.

Se ha demostrado que éste monosacárido aumenta la síntesis de apolipoproteína B (ApoB), cuya finalidad es el aumento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), disminuyendo la actividad de la proteína lipasa (26, 27). También, se ha comprobado que la ingesta desmedida de la fructosa disminuye la sensibilidad a la insulina pudiendo ocasionar patologías más graves como diabetes mellitus (28). Además, la fructosa dentro del hígado proporciona triosas-fosfato, que son precursores para la formación de ácidos grasos induciendo el desarrollo la esteatosis hepática (29), y aumentando el daño a tejidos por la formación de productos de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) (30).

Según, lo descrito en las líneas anteriores la fructosa puede inducir la obesidad y el síndrome metabólico (31-33), que va asociado con alteraciones en los niveles de triacilglicéridos, glucosa, colesterol, obesidad visceral, hipertensión arterial y ganancia en el peso corporal de los animales.

3. JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la síntesis de lípidos y lipoproteínas, la inflamación y el estrés oxidante, pueden ser factores que determinen el avance del SM, esta condición puede modificar la actividad de enzimas involucradas en estos procesos.

Se conoce la actividad de NAM en procesos inflamatorios y como antioxidante. Sin embargo se desconoce su acción en el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas.

4. HIPÓTESIS

Si NAM promueve un efecto anti-lipémico y antiinflamatorio entonces se verá reflejado en la actividad de AChE, BuChE y PON1, esterasas involucradas en procesos de lipogénesis e inflamación, en el modelo de SM inducido por fructosa.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la NAM sobre el perfil de lípidos y cómo influye en la actividad de AChE, BuChE y PON-1 en el modelo de SM.

5.1. Objetivos particulares

- Evaluar factores de riesgo presentes en el SM inducido por fructosa.
- Determinar el efecto NAM evaluando el perfil lipídico en el modelo de SM.
- Valorar el daño hepático producido por la ingesta de fructosa.
- Evaluar la actividad de AChE, BuChE y PON-1 en el modelo de SM y con el efecto de NAM.
- Determinar marcadores de inflamación en el modelo de SM y con el efecto de NAM.
-

6. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron treinta ratas de la cepa *Sprague Dawley* con un peso de 250 gramos \pm 5 g en condiciones controladas de temperatura (22.5 °C), humedad (50 %) y periodos luz/oscuridad (12h/12h), alimentadas con dieta chow 5008 (Purina, México). Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, conforme a la Norma Oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999), revisada en 2014, para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los roedores se dividieron en seis grupos (n=5) y mantenidos en jaulas de acrílico de 90 X 50 X 30 cm (cada jaula con dos y tres roedores). En la Tabla 2 se describen los tratamientos que recibió cada grupo:

Tabla 2. Grupos de experimentación y tratamientos	
Grupo 1	Control
Grupo 2	Nicotinamida 5mM
Grupo 3	Fructosa 40%
Grupo 4	F. 40% + NAM 5mM
Grupo 5	F. 40% + NAM 10mM
Grupo 6	F. 40% + NAM 15mM

Se administró fructosa 40% en agua de beber (P/V) durante los primeros 30 días a los grupos 3, 4, 5 y 6, para inducir SM. En el día 31 se inició el tratamiento con NAM a diferentes dosis a los grupos: 4 (NAM 5mM), 5 (NAM 10mM) y 6 (NAM 15mM) diariamente por cinco horas (de 9:00 am a 2:00 pm). Posteriormente, se colocaba de nuevo el bebedero con fructosa hasta completar los 120 días de tratamiento. Alternó a esto, al grupo 2 se inició el tratamiento de NAM 5mM a la par de los demás grupos, pero no tuvo inducción de SM. Este grupo se mantuvo con agua natural, al igual que al grupo control.

6.1. Curva de tolerancia a la glucosa

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó ocho días antes de sacrificar a los animales; para esto previamente se tomó registro de la glucosa basal de todos los animales con un ayuno de seis horas, mediante un pequeño corte en la cola

de la cual se tomó una gota de sangre- Posteriormente, vía intraperitoneal se administró la glucosa en solución (50%) (Kabipack, México) a una concentración de dos gramos sobre kilogramo de peso corporal. A partir de ahí se tomaron registros de glucosa cada treinta minutos con un glucómetro y tiras reactivas (Accu-chek, México).

Una vez finalizado el tratamiento se sacrificaron los roedores para la obtención de muestras sangre total y fragmentos de hígado.

6.2. Obtención de muestras biológicas

Una semana antes del sacrificio se midió la presión arterial de todos los animales utilizando el equipo CODA-2 10180 (Kent Scientific, USA), mediante el software se realizó el análisis de las presiones; sistólica y diastólica a cada uno de los animales de todos los grupos. A lo largo de todo el tratamiento, se realizó cada tercer día mediciones de peso, consumo de alimento, líquido bebido y NAM consumida en los grupos correspondientes.

Finalizado el tratamiento los animales se anestesiaron con Pentobarbital sódico concentrado (5% del peso, vía I.P.) (Sedalpharma, México) para realizar una punción cardiaca y obtener sangre total, posteriormente, el hígado completo. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm (425 g) durante 15 minutos a 4 °C para obtener el suero, y formar alícuotas de 100 uL, para las determinaciones bioquímicas y enzimáticas correspondientes.

6.3. Perfil bioquímico y actividad de colinesterasas en suero

El perfil bioquímico evaluó los contenidos séricos de: Triacilgliceroles, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, utilizando el equipo ILab 350 (Instrumentation laboratory SpA, E.U.A.) mediante el procedimiento de rutina.

La cuantificación de la actividad colinesterásica se realizó mediante el método de Ellman; cuyo método consiste en utilizar los tioanálogos específicos e inhibidores selectivos de cada enzima, al hidrolizar al tioanálogo respectivo se obtiene acetato o butirato y tiocolina, ésta última reacciona con el ácido di-tio-benzoico (DTNB) formando un cromóforo (tiobenzoato) cuya producción es proporcional a la actividad de cada enzima, y pudiéndose seguir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas de microtitulación (BioRad, E.U.A.) (51).

6.4. Determinación de proteínas totales por el método de Bradford.

El contenido de proteínas se estimó por el método de Bradford (1976), cuyo método implica la unión del colorante azul de Comassie G-250 con los residuos de aminoácidos básicos como: Arg, en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe de las proteínas, el cual provoca un cambio en el máximo de absorbancia del colorante de 465nm a 595nm. La intensidad del color es proporcional con el contenido de proteínas. Inicialmente se realizó una curva de titulación utilizando como estándar albumina, en concentraciones crecientes (0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg en 10 ml). Para la determinación de proteínas en las

muestras de suero se tomaron; 1 μ l de suero y se realizó una dilución 1:20 con solución salina, posteriormente se agregó 1ml del reactivo de Bradford y se leyó en un espectrofotómetro. Para el análisis se tomó en cuenta la ecuación de la recta obtenida de la curva.

Para calcular la actividad específica de las enzimas, se realizó un cociente entre la actividad estimada (U/ml), entre el contenido de proteínas totales (mg/ml), el resultado de la actividad específica se reporta en U/mg de proteína. Que representa un micromol de sustrato hidrolizado por un lapso de 60 minutos por miligramo de proteína.

6.5. Cuantificación de TNF- α , IL-6, insulina y ácidos grasos

El análisis de los marcadores de inflamación TNF- α e Interleucina-6, se realizó por medio de un kit comercial, siguiendo las indicaciones del proveedor (R&D system. Minneapolis, USA). La cuantificación de insulina también se realizó mediante un kit comercial de radio-inmunoensayo (RIA), siguiendo las instrucciones especificadas del proveedor (ALPCO. Boston, USA). Asimismo, el contenido de ácidos grasos fue evaluado mediante un kit de Inmunofluorescencia (Calbiochem. Darmstadt, Germany) siguiendo las instrucciones del proveedor.

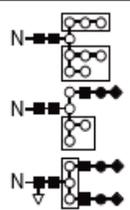
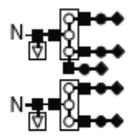
6.6. Patrón de glicosilación de las colinesterasas

Para este ensayo se utilizaron lectinas de distinta especificidad, las cuales tienen la capacidad de reconocer de manera específica diversos carbohidratos terminales unidos a las proteínas: *Concanavalina ensiformis* (Con-A); que

reconoce manosas, *Lens culinaris* (LCA); que reconoce manosas asociadas a centros de fucosa y *Triticum vulgare* (WGA); que tiene la capacidad de reconocer N-acetilglucosamina y/o ácido siálico (Sigma Aldrich, USA). En la tabla 3 se detallan propiedades de reconocimiento por cada lectina.

Las diferentes lectinas se dejaron interaccionar cada una con las diferentes muestras por 24 h en una cámara fría en agitación constante. Posteriormente, las matrices con los complejos lectina-colinesterasa formados, se centrifugaron a 5000 rpm, por 5 min. Para separar las colinesterasas que no se unieron a la matriz con las lectinas adsorbidas, y se midió la actividad nuevamente mediante por el método de Ellman. Finalmente, para obtener el porcentaje de interacción se comparó con la unión de colinesterasas con un control negativo de Sefarosa.

Tabla 3. Estructura de Oligosacáridos reconocidos por las lectinas utilizadas

Nombre	Abr.	Reconoce	Estructura
<i>Canavalia ensiformis</i> lectin (Concanavalin A)	Con A	N-glicanos Manosa	
<i>Lens culinaris</i> Agglutinin (Lentil lectin)	LCA	N-glicanos Fucosa con manosa	
<i>Triticum vulgare</i> Agglutinin	WGA	Poli-lactosamina Ácido siálico	

6.7. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm D.E. de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. La comparación multi-grupos se realizó con la prueba de ANOVA y el análisis entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Todos los cálculos estadísticos se analizaron mediante el software GraphPad Prism 5 software. Una $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

7. RESULTADOS

6.1 Efecto de nicotinamida sobre el peso corporal, consumo de alimento y bebidas en ratas suplementadas con fructosa.

La administración de fructosa al 40% disuelta en el agua de beber durante dieciséis semanas provocó aumento del 30% del peso corporal comparado con el grupo control, esta diferencia fue estadísticamente significativa. Los grupos que consumieron fructosa más el tratamiento de NAM a las diferentes concentraciones se observó que un decremento (60%) del peso corporal comparado con el grupo de fructosa, esta diferencia también fue estadísticamente significativa en las tres concentraciones de NAM (5, 10 y 15mM). El grupo que sólo consumió NAM (5mM) no mostró cambios en la ganancia de peso corporal, sus valores fueron similares al grupo control. (Figura 1)

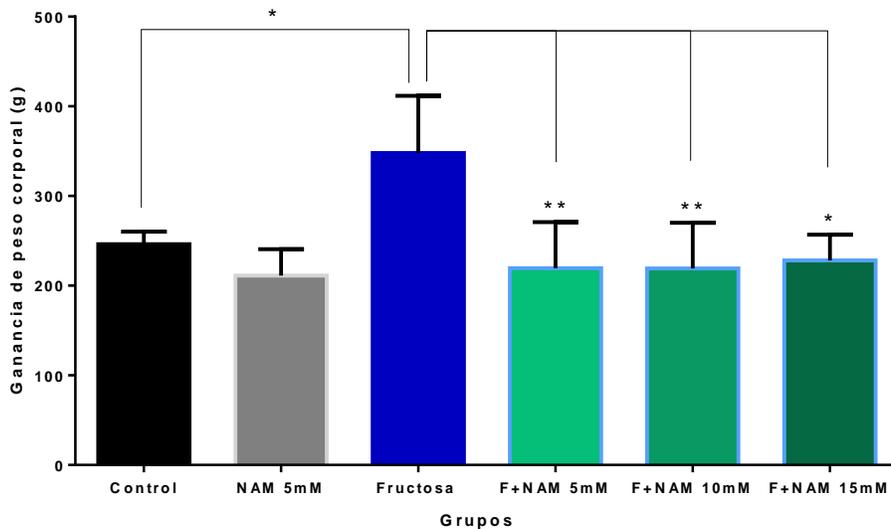


Figura 1. Efecto de nicotinamida sobre la ganancia de peso corporal inducido por fructosa. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes por grupo. Análisis de ANOVA de una vía con una comparación de grupos por Tukey. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al grupo de fructosa.

Se observó una disminución del 30% en el consumo de alimento en el grupo suplementado con fructosa 40%; así como en los grupos que recibieron NAM a las diferentes concentraciones, comparando con el grupo control. El grupo de NAM 5mM tuvo una tendencia a aumentar el consumo de alimento en comparación con el grupo control, sin encontrarse significancia estadística. (Figura 2)

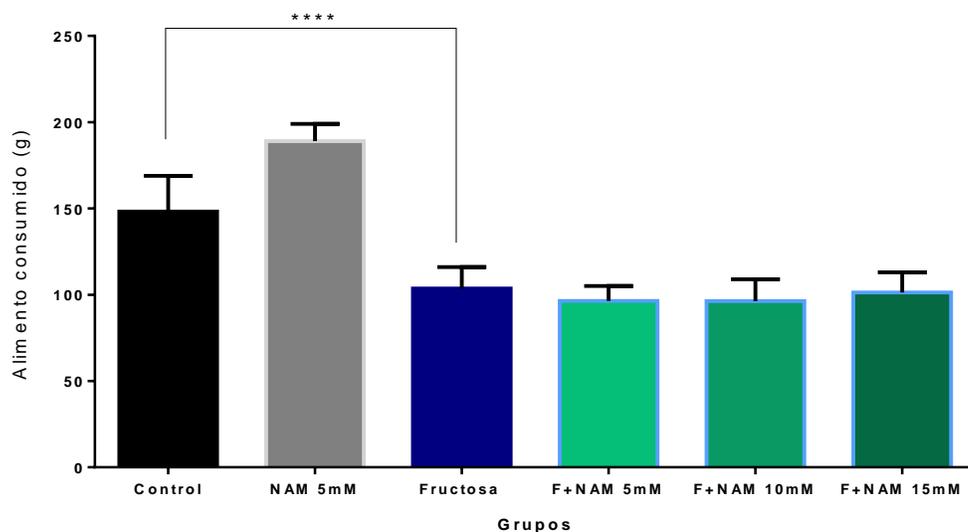


Figura 2. Efecto de NAM sobre el consumo de alimento. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.0001$ (****)

En cuanto al consumo de líquidos, los resultados muestran un decremento significativo del 20% en el grupo de fructosa con respecto al grupo control. Los grupos que recibieron fructosa y el tratamiento de NAM presentaron un comportamiento similar al grupo de fructosa (Figura 3).

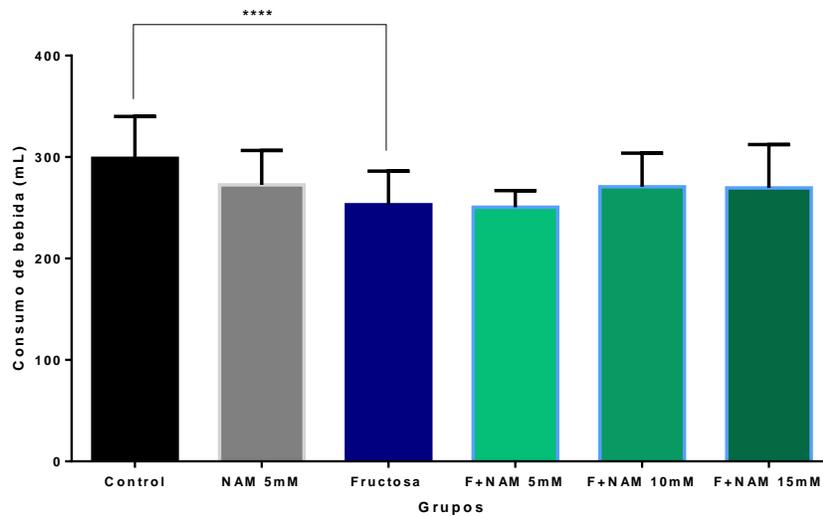


Figura 3. Efecto de NAM sobre el consumo de bebida. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.001$ (****)

Cuando se comparó el consumo de NAM entre los grupos que consumieron el carbohidrato y la vitamina a las diferentes dosis se observó un decremento significativo del 20% durante el tiempo que duró el estudio con respecto al grupo control de NAM 5 mM (Figura 4).

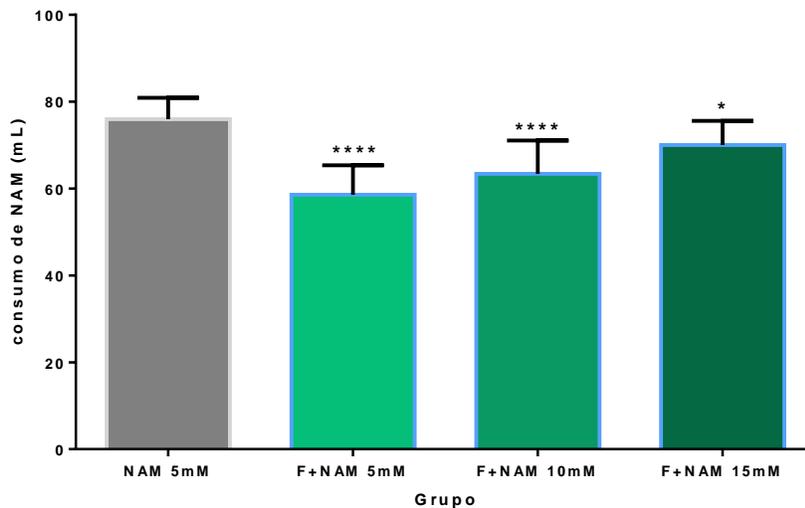


Figura 4. Efecto sobre el consumo de NAM. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*) y $P < 0.0001$ (****)

En cuanto a las calorías consumidas en los diferentes grupos, el análisis demostró que el grupo de fructosa incrementó significativamente el aporte calórico (20%) Los grupos que consumieron además de la fructosa el tratamiento de NAM a las diferentes dosis no mostraron diferencias con respecto al grupo de fructosa. Tampoco se observaron diferencias significativas en el grupo que recibió solo NAM 5mM en comparación con los demás grupos (Figura 5).

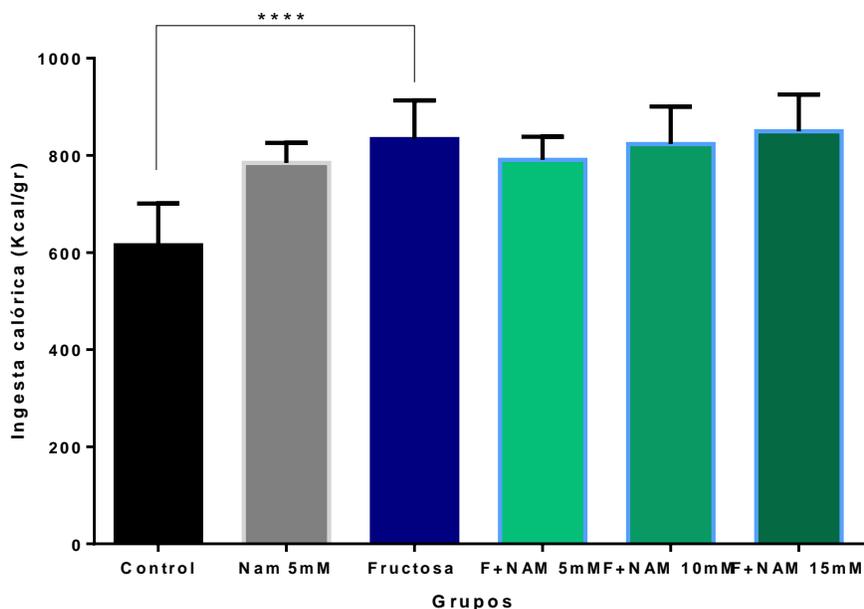


Figura 5. Efecto de fructosa sobre la ingesta calórica. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.0001$ (****).

6.2 Efecto de nicotinamida sobre el perfil de lípidos y transaminasas en suero de ratas suplementadas con fructosa

Dentro del perfil lipídico que se evaluó en el suero de las ratas se observó, que el grupo de fructosa incrementó significativamente LDL (10%), TG (50%), ácidos grasos libres (90%) y ácidos grasos hepáticos (100%). comparado con el grupo control. Además se observó disminución en HDL (10%) sin ser significativo. Todos estos cambios en relación al grupo control. (Tabla 1)

El grupo de fructosa con NAM 10mM disminuyó 50% de ácidos grasos hepáticos y circulantes con respecto al grupo de fructosa, diferencia estadísticamente significativa. Además, F+NAM 5 y F+15mM también

disminuyeron los ácidos grasos hepáticos y circulantes, 35 y 30%, respectivamente (Tabla 1).

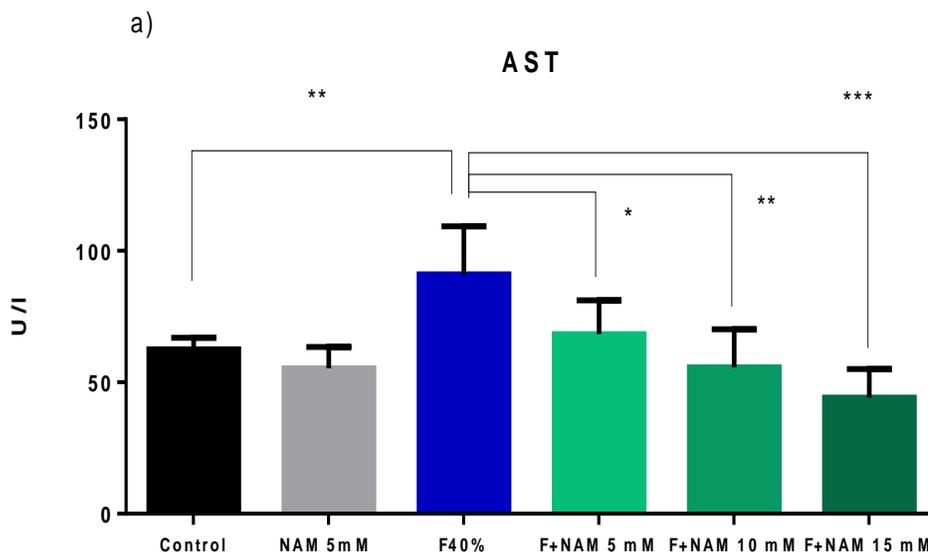
Otros efectos benéficos fueron observados en los grupos que además del consumo del carbohidrato fueron suplementados con la vitamina, destacando; disminución del 40% del colesterol total a la dosis de 15 mM, así como aumento del 10% en las HDL a las dosis de 5 y 10 mM. (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil Lipídico

	Control	NAM 5mM	Fructosa 40%	F+NAM 5mM	F+NAM 10mM	F+NAM 15mM
Colesterol total (mg/dL)	86.5±4.9	93±6.2	101.2±11.7	97.25±10.7	100±4.1	66.2±6.6*
HDL (mg/dL)	57.5±9.5	49.33±1.5	47.25±4.2**	53±3.7	53.3±2.5	34.75±5.3*
LDL (mg/dL)	21.5±2.1	20±2.4	29.4±5.5*	31±4.2	33.8±8.5	24.17±3.9
TAG (mg/dL)	68.25±3.7	129.3±51.7	144±36.1****	128±42.5	94.5±2.9*	121±4.96
AGL séricos (nmol/μL)	2.62±0.3	2.4±0.6	4.0±0.6	2.26±0.1*	2.25±0.4*	1.52±0.4*
AGL hepáticos (nmol/μL)	1.08±2.4	1.59±0.1	13.61±1.8****	9.58±1.7*	6.52±1***	8.76±0.4***

Se incluyó dos marcadores séricos de daño hepático, ALT y AST. El análisis estadístico demostró que las actividades de las transaminasas del grupo de fructosa aumentaron aproximadamente 20% comparado con el grupo control. Los grupos que además del carbohidrato consumieron NAM en las diferentes concentraciones, AST disminuyó dosis dependiente; ya que a la dosis 5mM el decremento fue de 15%, a la dosis 10mM el decremento correspondió al 30% y con 15mM de NAM fue del 50% comparado con el grupo de fructosa. (Figura 6a).

Para ALT; la disminución dentro de los grupos que además del carbohidrato recibieron tratamiento de NAM fue homogénea, todas las dosis disminuyeron aproximadamente 35% (Figura 6b).



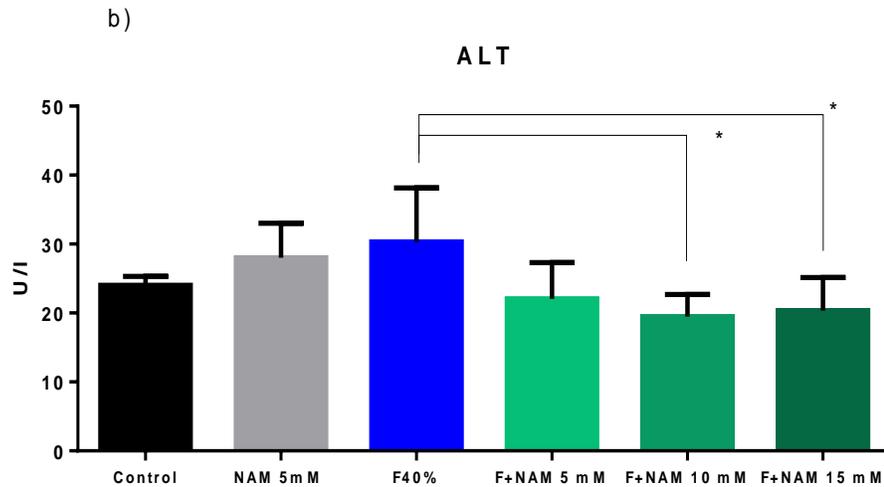


Figura 6. Efecto de NAM sobre transaminasas séricas: a) AST, b) ALT en animales expuestos a fructosa por 4 meses. Los valores representan la media de 5 experimentos independientes por grupo de estudio.

6.3 Efecto de nicotinamida sobre la presión arterial de ratas suplementadas con fructosa

El registro de la presión sistólica y diastólica mostró que el consumo de fructosa elevó 20% la presión con respecto al grupo control. Además, los grupos a los cuales se dio de beber fructosa más el tratamiento de NAM en las concentraciones 5 y 10 mM se observó decremento en la presión arterial aproximadamente del 25% comparando con el grupo de fructosa (Tabla 2).

Presión Sistólica y Diastólica

	Sistólica	Diastólica
<i>Control</i>	136.5±9.19	99.5±13.44
<i>NAM 5mM</i>	144.33±4.62	110.33±6.81
<i>Fructosa 40%</i>	160.33±5.65	121.67±5.01 *
<i>Fructosa+NAM 5mM</i>	124.75±10.47	93.25±6.99 ***
<i>Fructosa+NAM 10mM</i>	140.75±4.19	102.25±9.39 **
<i>Fructosa+NAM 15mM</i>	143.25±4.27	108.75±6.95

Tabla 2. Efecto de NAM sobre presión sistólica y diastólica en el modelo de SM. Los valores representan la media de 5 experimentos independientes por grupo de estudio.

6.4 Efecto de nicotinamida sobre la tolerancia a la glucosa en ratas suplementadas con fructosa.

El grupo de animales suplementados con fructosa obtuvo valores de glucosa circulante más altos en comparación con los demás grupos de experimentación; la determinación reportó que a los treinta minutos de la prueba se observó el pico más alto y en este mismo grupo el descenso en cuanto a los valores posteriores fue más lento; restableciéndose a valores semejantes a los demás grupos a los noventa minutos de la prueba.

Finalmente a los ciento veinte minutos todos los grupos experimentales reflejaron valores similares. Cabe destacar que los grupos que obtuvieron los valores más bajos (50% aproximadamente) fueron los tratados con NAM 5mM. (Figura 7)

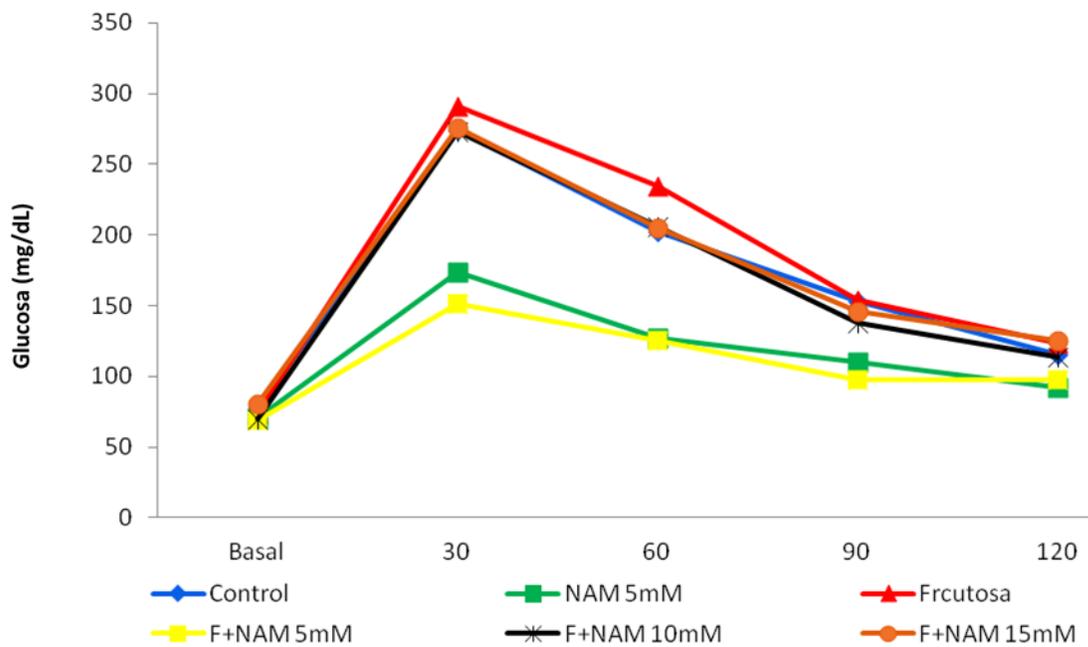


Figura 7. Efecto de NAM sobre el manejo de la glucosa en animales expuestos a fructosa por 4 meses. Los valores representan la media de 5 experimentos independientes por grupo de estudio.

6.5 Efecto de nicotinamida sobre los niveles de insulina plasmática en ratas suplementadas con fructosa.

El contenido de insulina plasmática en el grupo suplementado con fructosa tuvo un incremento de 50% en comparación con el grupo control. Por otro lado el tratamiento con NAM mostro una tendencia a reducir los niveles de insulina plasmática comparando con el grupo de fructosa, sin embargo no fue estadísticamente relevante. También se observa que el grupo control de NAM 5 mM solo; tuvo valores similares a los del grupo control. (Figura 8)

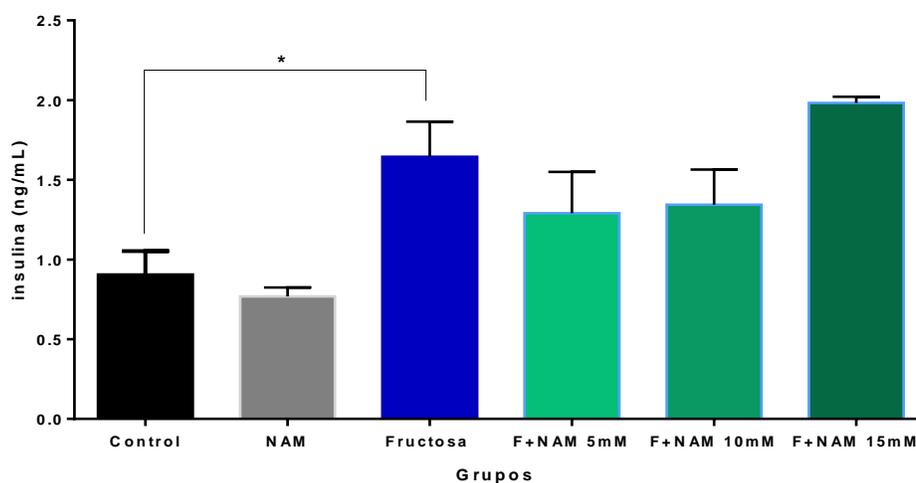


Figura 8. Efecto de NAM sobre los niveles de insulina plasmática. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*)

6.6 Efecto de nicotinamida sobre marcadores de inflamación en ratas suplementadas con fructosa.

El contenido sérico de TNF- α en el grupo suplementado con fructosa mostró un incremento en un 40% comparado con el grupo control. También, se observó una disminución dosis dependiente en los grupos que además de fructosa

recibieron el tratamiento de NAM a las diferentes concentraciones. Respecto al grupo control de NAM 5mM; se observaron valores similares al control, sin embargo en ambos casos la diferencia no fue significativa (Figura 9).

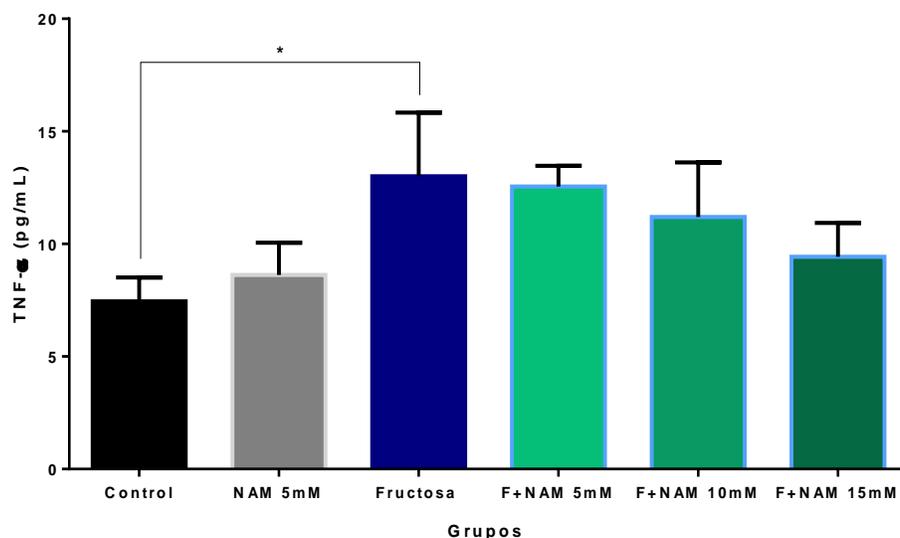


Figura 9. Efecto de la administración de NAM en ratas suplementadas con fructosa sobre los niveles de TNF- α . Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*)

En cuanto al contenido en suero de la interleucina-6, este marcador de inflamación tuvo un comportamiento similar al TNF- α , siendo mayor en el grupo suplementado con fructosa en comparación con el grupo control. Sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa dada la dispersión de los datos reportados. Por otro lado, el tratamiento de NAM a la concentración 10mM mostró una disminución cercana a un 50% en comparación con el grupo de fructosa. El tratamiento de NAM 15mM no tuvo efectos en comparación con

el grupo de fructosa. Cabe mencionar que en este ensayo no se pudo realizar la cuantificación de IL-6 en el grupo de fructosa-NAM 5mM (Figura 10).

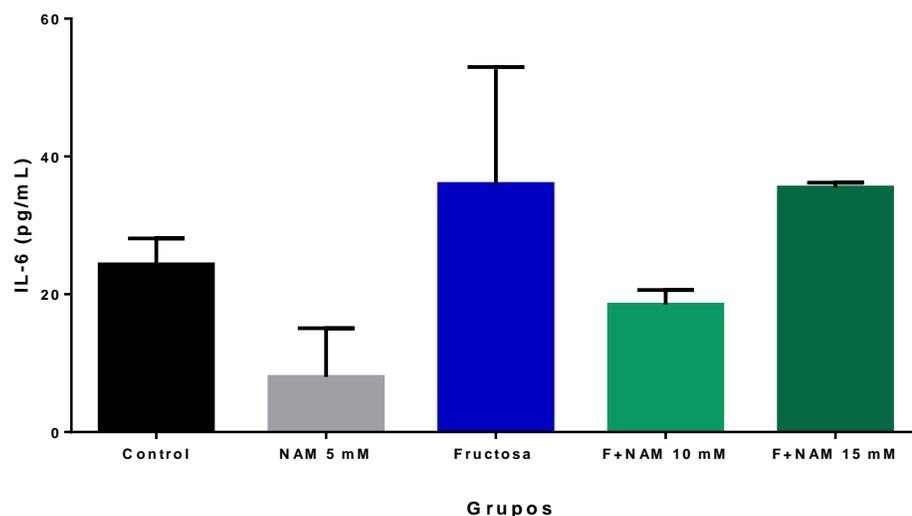


Figura 10. Efecto de NAM en ratas suplementadas con fructosa sobre los niveles de IL-6. Las barras representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*)

6.7 Efecto de nicotinamida sobre la actividad de esterasas circulantes en ratas suplementadas con fructosa.

La actividad específica de la actividad acetilcolinesterasa en el grupo de ratas suplementadas con fructosa se duplico en comparación con el grupo control. En cuanto a los grupos que además de fructosa tuvieron tratamiento de NAM, se observó una disminución en la actividad de esta enzima; siendo la más destacada el grupo de fructosa-NAM 10mM, en la cual se mostró una reducción en un 70% su actividad en comparación con el grupo de fructosa (Figura 11).

Los grupos de NAM 5mM, fructosa más NAM 5mM y fructosa más NAM 15mM tuvieron valores muy similares en la actividad de esta enzima (Figura 11).

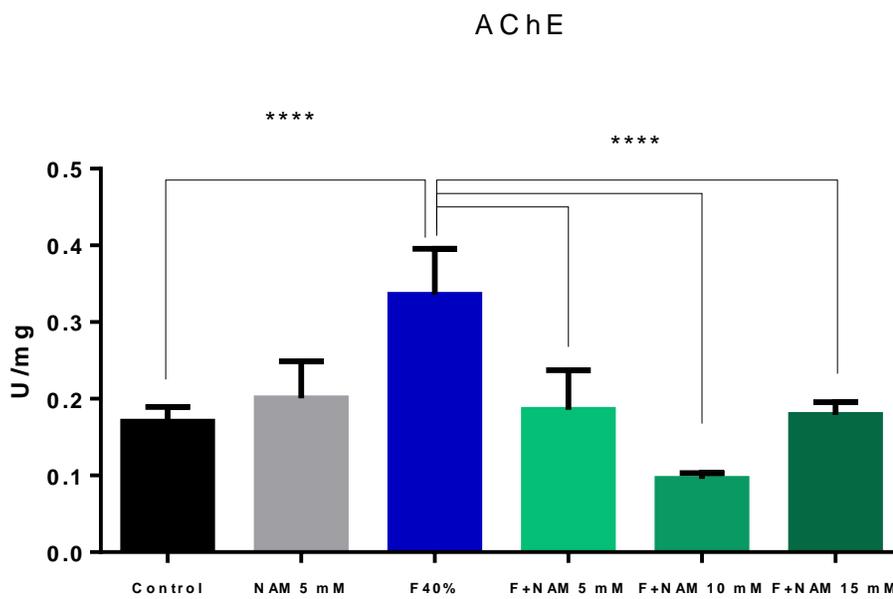


Figura 11. Efecto de NAM en ratas suplementadas con fructosa sobre la actividad de acetilcolinesterasa. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*). Una unidad (U) representan la hidrólisis de 1 $\mu\text{mol/h/mg}$.

La actividad de la butirilcolinesterasa en el grupo suplementado con fructosa, mostró un aumento en comparación con el grupo control, sin embargo no tuvo significancia según la prueba estadística. En los grupos que además de fructosa recibieron el tratamiento con NAM mostraron una actividad por debajo de la mostrada con el grupo de fructosa, alrededor en un 50% menos en los que recibieron el tratamiento de 5 y 15mM. El grupo que recibió NAM a

concentración de 10mM mostró una disminución en la actividad alrededor de un 70% en comparación con el grupo de fructosa. Estos valores fueron semejantes a los reportados al grupo control y al control de NAM 5 mM (Figura 12).

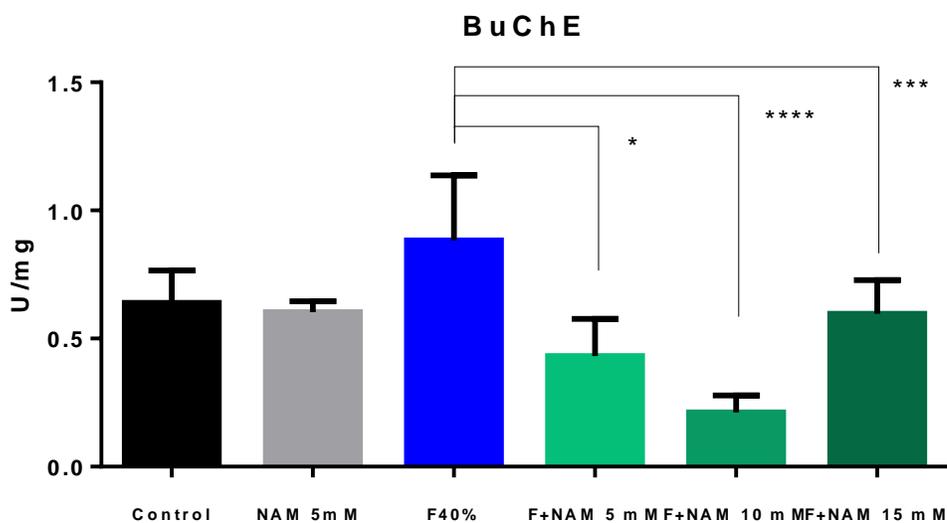


Figura 12. Efecto de NAM en ratas suplementadas con fructosa sobre la actividad butirilcolinesterasa. Las barras representan la media \pm DS de 5 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*). Una unidad (U) representan la hidrólisis de 1 $\mu\text{mol/h/mg}$.

La actividad de PON-1 en el suero de las ratas alimentadas con fructosa tratadas con NAM tuvo un comportamiento opuesto al descrito previamente en las colinesterasas. Primeramente; cabe señalar que en el grupo de fructosa, la actividad de PON-1 fue baja en comparación con el grupo control en un 25%, y tal como, se esperaba los grupos que recibieron el tratamiento a las diferentes dosis de NAM tuvieron una tendencia a incrementar la actividad de esta enzima. Las dosis que tuvieron un efecto más positivo fueron la de 10 y 15mM

respectivamente, con un aumento en un 20% en comparación al grupo de fructosa, siendo significativo dicho aumento (Figura 13).

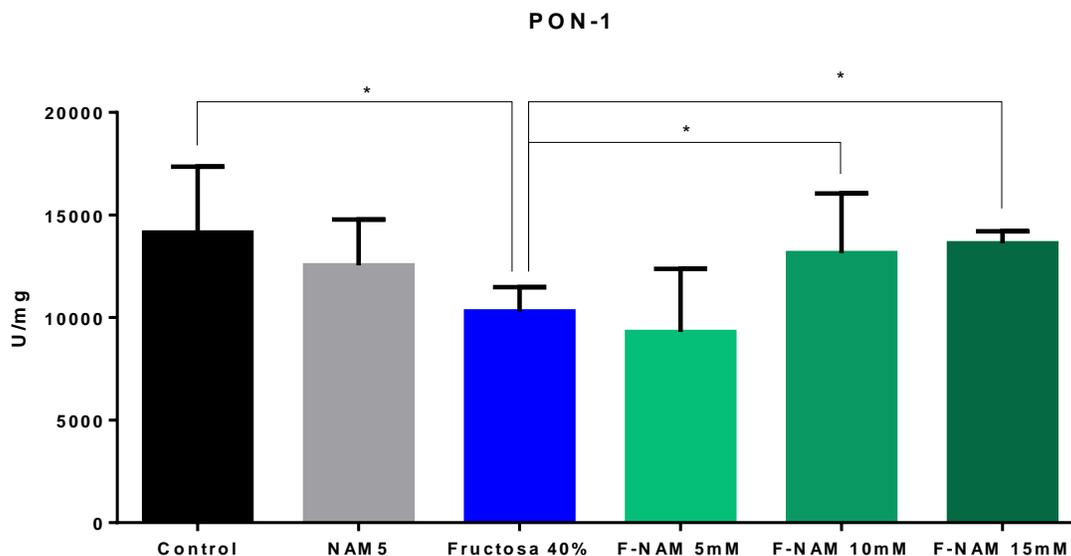


Figura 13. Efecto de NAM en ratas suplementadas con fructosa sobre la actividad de paraoxonasa-1 (sustrato paraoxón). Las barras representan la media \pm DS de 4 experimentos independientes. Análisis de ANOVA de una vía y comparación de grupos por Tukey. $P < 0.05$ (*). Una unidad (U) representan la hidrólisis de $1 \mu\text{mol/h/mg}$.

6.8 Efecto de nicotinamida sobre la glicosilación de colinesterasas circulantes en ratas suplementadas con fructosa.

Mediante la interacción con lectinas de alta especificidad que permiten el reconocimiento de manosa (Con-A), manosa asociada a centros de fucosa (LCA) y N-acetilglucosamina y ácido siálico (WGA) se pudo conocer el tipo de carbohidrato que permanece unido a las colinesterasas séricas en condiciones de síndrome metabólico y como se modifica cuando se administra NAM en las diferentes dosis. Mediante la interacción colinesterasa-lectina que presentaron

las muestras con las diferentes lectinas, se pudo establecer un patrón de glicosilación que efectivamente fue cambiante con las diferentes condiciones.

En el caso de la acetilcolinesterasa, se observó que mediante la interacción con la lectina Con-A que reconoce a las manosas, tanto el grupo de fructosa como los tratados con NAM no experimentaron cambios en cuanto a la interacción todas se mantuvieron en un mismo rango (Figura 14).

La interacción de las muestras con la lectina de lenteja (LCA) mostró que el grupo control, el grupo con fructosa y el grupo con fructosa y NAM 10mM tuvieron una interacción similar, y que no tuvo cambios con un porcentaje de 80% aproximadamente, los tres grupos restantes tuvieron una interacción por debajo de un 50% (Figura 14).

Lo más destacado del perfil de glicosilación en el caso de acetilcolinesterasa fue cuando se colocó la muestra con la lectina de trigo (WGA), la cual tuvo un efecto sobre el grupo de fructosa al perder la interacción aproximadamente en un 80% en comparación con el grupo control. A los grupos que además del carbohidrato se les administró NAM se observó un aumento en la interacción principalmente a las dosis de 5 y 15 mM asemejando se a los valores obtenidos por el grupo control (Figura 14).

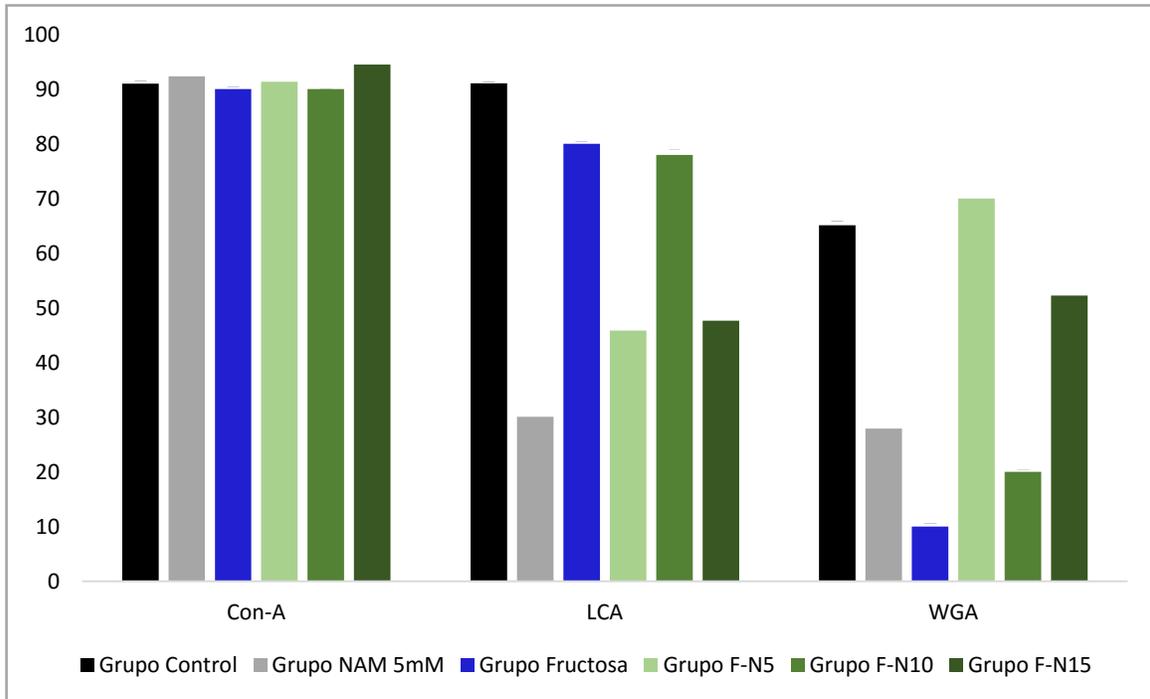


Figura 14. Efecto de NAM sobre la glicosilación de AChE plasmática en el modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa. Las barras representan la media \pm DS en valores porcentuales de 4 experimentos independientes.

En cuanto a la proteína butirilcolinesterasa, utilizando las mismas lectinas se observó que de igual forma existen cambios en el porcentaje de interacción lectina-proteína y estos representan a los diferentes tratamientos, principalmente las proteínas que interaccionaron con la lectina de lenteja (LCA) donde se observan los cambios más contundentes y significativos; el grupo de fructosa y los dos grupos tratados con NAM 5 mM mostraron una disminución aproximadamente en un 50% en comparación con el grupo control. Posteriormente, los grupos tratados con NAM 10 y 15 mM favorecieron la

interacción nuevamente con la lectina y recuperaron los valores asemejándose al control (Figura 15).

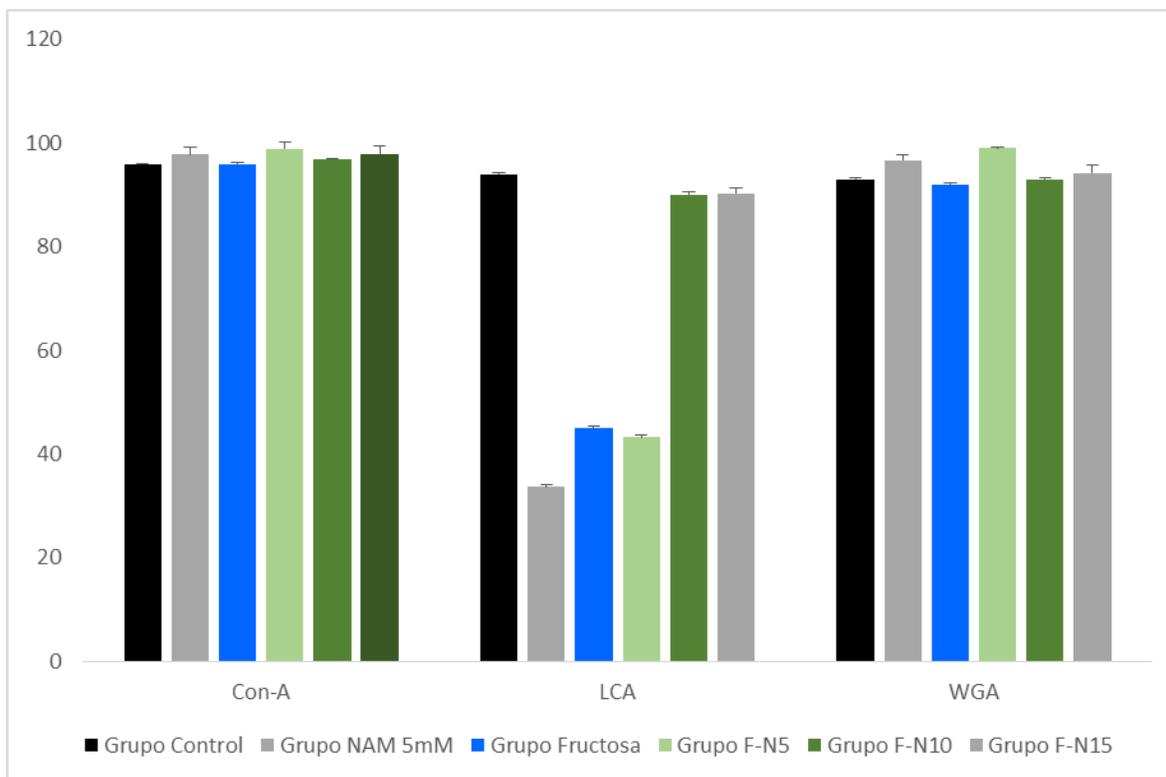


Figura 15. Efecto de NAM sobre la glicosilación de BuChE plasmática en el modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa. Las barras representan la media \pm DS en valores porcentuales de 4 experimentos independientes.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra evidencias que el consumo crónico de fructosa al 40% en el agua de beber provoca un conjunto de alteraciones metabólicas propios del síndrome metabólico incluidos, ganancia de peso, hiperinsulinemia, dislipidemia y aumento de presión arterial. Estas modificaciones metabólicas se presentaron junto con el aumento de la actividad y decremento del patrón de glicosilación de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, así como el decremento de la actividad de la paraoxonasa 1. El estudio además demostró que la administración de NAM disminuyó las alteraciones metabólicas inducidas por fructosa manifestándose en decremento de las actividades y restablecimiento del perfil de glicosilación de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, así como del aumento de la actividad de la paraoxonasa 1.

La ingesta alta de carbohidratos con alto contenido de fructosa se asocia con ganancia de peso en el humano (43, 44); y en modelos experimentales; lo cual está acorde con la ganancia de peso en el modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa. El efecto de fructosa sobre la ganancia de peso puede explicarse: 1) rápida absorción por los enterocitos a nivel de yeyuno y duodeno mediante el transportador específico de fructosa, GLUT 5 (32). En circulación, fructosa ingresa al hígado vena porta a través de los transportadores GLUT 2, 5 y 8, éste último asociado con micro y macrovesículas lipídicas. 2) metabolismo acelerado por falta de control por el estado de energía hepática (32). En hígado, la fructosa es fosforilada por la fructocinasa, enzima no regulada, que lleva a que la fructosa 1 fosfato dependa de la cantidad de

fructosa que ingresa al hígado. 3) tampoco existe vía para la desfosforilación de fructosa 1 fosfato; por lo que la exposición del hígado a la fructosa, lo obliga a introducirla en las vías metabólicas. Tanto la glucosa y la fructosa generan triosas fosfatos (dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3 fosfato) produciendo piruvato e inmediatamente formación de Acetil CoA (AcCoA). 4) y sobrecarga de AcCoA. Debido a que las reacciones entre las triosas fosfatos y la glucosa son reversibles, un destino de la fructosa es su conversión a glucosa y producción de glucógeno ó liberación de la glucosa al torrente circulatorio. Un punto clave y decisivo para la célula es el destino de AcCoA; cuando se necesita como fuente de energía es metabolizada por las mitocondrias para producir ATP. En el caso de que el suministro de energía sea abundante, AcCoA se desvía a la síntesis de ácidos grasos *de novo* y posteriormente los ácidos grasos se incorporan en triacilglicéridos. Durante el procesamiento de triacilglicéridos, se pueden crear lípidos derivados del exceso de ácidos grasos tipo lisofosfatidilcolina, implicados en la lipotoxicidad hepatocelular y desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica. Los triacilglicéridos formados a partir de ácidos grasos *de novo* pueden ser secretados como VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), por esta vía el exceso de fructosa contribuye a la hipertrigliceridemia. La formación y secreción de las VLDL es un proceso complejo y cuando se daña, los triacilglicéridos producidos a partir de la fructosa se acumulan en los hepatocitos en forma de gotas lipídicas y manifestado como esteatosis. Con esta apreciación, los estudios recientes demuestran que el consumo crónico de fructosa aumenta la síntesis de ácidos grasos mediante la activación del factor transcripcional SREBP-1 (Proteína de

unión al elemento regulador de esteroides-(SREBP-1), el cual aumenta la síntesis de enzimas lipogénicas: la sintasa de ácidos grasos, acetil-CoA carboxilasa y esteroil-CoA desaturasa. Además de sobre expresar al factor transcripcional ChREBP (Proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos) que junto con SREBP-1 aceleran el efecto de lipogénico inducido por fructosa (33). Con estas evidencias se justifica la ganancia de peso y la dislipidemia del grupo de ratas que consumieron fructosa al 40% por 120 días.

La homeostasis energética, dado por el balance entre apetito y saciedad, se lleva a cabo mediante señales hormonales entre insulina, leptina, grelina y el neuropéptido Y (NPY) a nivel de sistema nervioso central (SNC) y periférico. El incremento de glucosa plasmática postprandial estimula las células β -pancreáticas liberando y sintetizando insulina, que permite la captación de glucosa por órganos y tejidos insulino-dependientes. La glucosa además, incrementa las concentraciones de leptina circulante enviando señales de saciedad al SNC. De forma alterna la insulina regula la adiposidad al frenar la ingesta calórica y fomentar el gasto energético en conjunto con el NPY e inducir posteriormente la producción de leptina por el tejido adiposo. La función de leptina es inhibir la ingesta e incrementar el gasto energético. La grelina, hormona orexigénica, regula el comportamiento alimentario incrementando el NPY y a la AgRP (Proteína relacionada con aguti) a nivel de hipotálamo desencadenando el inicio de la ingesta. Posterior a la ingesta de glucosa grelina disminuye, con fructosa la señal de grelina no es suprimida del todo,

contribuyendo a una ganancia de peso corporal al incrementar la ingesta energética en respuesta a una baja secreción de insulina y leptina, así como disminución de la supresión postprandial de grelina provocada por el consumo de fructosa (36).

No obstante que no se observó hiperglucemia en el grupo con fructosa, la determinación de insulina demostró que los animales cursan con hiperinsulinemia compensatoria junto con alteración en la prueba de tolerancia a la glucosa al minuto 30 y 60 con valores altos de glucosa. El incremento de apoB durante el metabolismo de la fructosa, ocasiona que haya un decremento de su degradación y acumulación en retículo endoplásmico hepático activando la cascada de señalización inflamatoria I κ B cinasa/NF- κ B. El encendido de la vía induce la activación de la vía glucógeno sintasa y de la proteína cinasa activadora de mitogeno-7 (MKK7) mediante JNK (c-jun N-terminal cinasa) suprimiendo la señalización de la insulina, debido a la fosforilación en residuos de serina del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) ocasionando resistencia a la insulina. Por otra parte, el aumento de diacilglicerol puede activar a la proteína cinasa C (PKC) que disminuye la fosforilación en residuos de tirosina y aumenta la fosforilación en residuos de serina del receptor de insulina y IRS-1, lo que ocasiona una baja actividad en la vía de señalización de PI3K/Akt, impidiendo llevar a cabo la señalización correcta para translocar a los transportadores de glucosa a la membrana plasmática inhibiendo así su captación (33). Esto explica la baja captación de glucosa en tejidos y órganos

insulinodependientes al tiempo 30 y 60 minutos durante la prueba de la tolerancia a la glucosa.

Otra alteración metabólica inducida por el consumo de fructosa es la síntesis de ácido úrico. El aumento intracelular de ácido úrico induce disfunción endotelial relacionado con disminución de la masa mitocondrial y de la producción de ATP manifestándose en hipertensión y enfermedad vascular y renal (40). Estas evidencias justifican el incremento de la presión arterial en el grupo de fructosa. Durante la fosforilación de la fructosa ocurre una caída en las concentraciones del fosfato intracelular y de ATP (14-16). El decremento del fosfato intracelular estimula la actividad de la desaminasa dependiente de AMP (AMPD), que cataliza la degradación de AMP para el mono fosfato de inosina y finalmente ácido úrico (15). Evidencias previas han mostrado que la AMPD contrarresta los efectos de la AMPK (26,27). En hepatocitos induce la oxidación de ácidos grasos y la generación de ATP, la AMPD tiene efectos opuestos. La administración de compuestos con acción antioxidante estimula que la AMPK baje la presión arterial, aboliendo la producción de especies reactivas de oxígeno al regular negativamente la NADPH oxidasa (53).

El metabolismo de fructosa genera especies reactivas de oxígeno que provoca una disminución del glutatión reducido favoreciendo la lipoperoxidación (55) y producción de citosinas pro inflamatorias, mediante el factor nuclear Kappa B (NFκB). Los resultados del presente estudio confirmaron que el SM inducido con fructosa indujo una inflamación sistémica de bajo grado, así confirmado por

aumento de IL-6 y TNF- α . La sobre producción de citosinas pro-inflamatorias es característica importante de la obesidad y enfermedades metabólicas (46).

La ingesta alta y crónica de carbohidratos activa la vía de las pentosas, debido a que esta vía aporta NADPH para la síntesis de ácidos grasos de novo. La enzima que cataliza la reducción de NADP⁺ es la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Además de generar NADPH también incrementa en pasos avanzados de la vía fructosa 6 fosfato, que puede ingresar a la vía de las hexosaminas. La fructosa vía sorbitol contribuye en la activación de la vía de las hexosaminas, debido a que la formación de la glucosamina 6 fosfato proviene exclusivamente de la fructosa 6 fosfato y la glutamina, mediante una reacción irreversible catalizada por la glutamina: fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA), enzima que regula la vía. La glucosamina-6-fosfato a través de tres reacciones subsecuentes, finalmente da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y a la UDP-N-acetilgalactosamina, que se utilizan en la formación de las glicoproteínas y los proteoglicanos. El aumento del flujo a través de esta vía pudiera alterar el patrón de glicosilación de las colinesterasas que se puede reflejar en aumento de sus actividades e impedir su degradación.

El aumento en la actividad de las colinesterasas también se relaciona con la inflamación ya que el neurotransmisor acetilcolina (ACh) al unirse a su receptor nicotínico en la subunidad $\alpha 7$ de los macrófagos actúa como una molécula antiinflamatoria (27) evitando la producción y liberación de citocinas pro inflamatorias, la sobre actividad de las colinesterasas evita que ACh lleve a cabo su actividad antiinflamatoria favoreciendo la inflamación sistémica y local.

Nuestros resultados en cuanto a la disminución en la actividad de PON-1 correlacionan con los reportados en numerosos experimentos donde prevalecen alteraciones metabólicas, DT2, enfermedad cardiovascular y obesidad (16, 18, 19, 48), se cree que al disminuir las HDL disminuye la enzima y esto se ve reflejado en la actividad. Creemos que la fructosa es un factor exógeno encargado de modular el efecto protector y antioxidante de la PON-1. La actividad baja de PON-1 puede ser utilizada como un factor de riesgo considerable para predecir la enfermedad arterial coronaria, si bien también se sabe que la actividad de esta enzima desciende conforme pasan los años (42). Además, se trata de una glicoproteína que probablemente al igual que las colinesterasas pueda experimentar alteraciones en su patrón de glicosilación afectando de igual forma su actividad.

El daño celular hepático ocasionado por el consumo de fructosa se observó al evaluar las transaminasas, las cuales correlaciona con trabajos desarrollados con el modelo de fructosa; a una concentración menor pero durante un lapso de tiempo mayor, la permeabilidad de la membrana se ve modificada por el exceso de especies reactivas de oxígeno que genera el metabolismo celular y la inflamación hepática dada por TNF- α , permite que diferentes moléculas sean llevadas a circulación, ALT y AST se consideran como los principales marcadores de daño hepático (38). El uso de NAM que actúa como antiinflamatorio mediante la inhibición de PPAR- γ y sobre TNF- α lo que resulta en la protección celular y en una disminución en los niveles de transaminasas circulantes (39)

NAM como adyuvante en las enfermedades metabólicas constituye un enfoque novedoso en donde la investigación ha permitido conocer su capacidad antilipémica mediante el aumento de la coenzima NAD⁺ la cual se sabe actúa sobre un grupo de desacetilasas de histonas llamadas sirtuínas (SIRT, del inglés; Silent mating type Information Regulation two) las cuales juegan un rol importante en la homeostasis de lípidos y de la glucosa mediante la biogénesis mitocondrial y la beta-oxidación mediante la desacetilación del receptor de activación de proliferación del peroxisoma (por sus siglas en inglés: PPAR) sensor principal de daño al genoma. A nivel de SNC las sirtuínas regulan la homeostasis de la glucosa inhibiendo la producción de glucosa hepática y aumentando la sensibilidad a la insulina, la sobre expresión de SIRT-1 suprime al factor nuclear kappa-B (NFκB), que protege a las células beta-pancreáticas, y se ve reflejado también en la disminución de la inflamación sistémica mediante los marcadores contemplados (37).

Además de poseer actividad anti-inflamatoria disminuyendo el estrés oxidante mediante la activación de sistemas antioxidantes como el glutatión y el citocromo P450, los cuales utilizan a las coenzimas para poder efectuar su acción en contra de las especies reactivas de oxígeno y los compuestos tóxicos. Esto promueve la protección ante las complicaciones cardiovasculares, la disfunción endotelial y la hipertensión (35, 37).

La acción de NAM por la cual disminuye la actividad de las colinesterasas y aumenta la actividad de PON-1 en el modelo de SM aun no es esclarecida, requiere más estudios; sin embargo podemos inferir que el efecto inhibitor

hacia la PARP y a las sirtuínas son mecanismos claramente involucrados. Además NAM siendo precursor de NAD⁺ influye en los sistemas antioxidantes controlando las especies reactivas que ocasionan daño a las proteínas y al DNA.

En este contexto PARP responde al daño del DNA y utiliza como sustrato a la coenzima NAD⁺ para ADP-ribosilar enzimas involucradas en la reparación del DNA, pero también a otras proteínas como PPAR γ el cual al ser ribosilado pierde afinidad por el DNA reduciendo la transcripción de genes blanco y a su vez conduce a la activación de AMPK; frenando la lipogénesis a través de inhibir a SREBP o de reactivar a PARP evitando la síntesis de enzimas lipogénicas. Principal desajuste metabólico.

Es por ello que nuestros resultados muestran mejoramiento al consumir bajas dosis de NAM que proporciona un aumento en la poza de NAD⁺ teniendo un efecto protector en diversos parámetros donde el consumo de fructosa ocasiono alteraciones metabólicas.

9. CONCLUSIÓN

El modelo de síndrome metabólico inducido en ratas *Sprague Dawley* por la administración de fructosa al 40% en agua beber, es reproducible, y altera tres de los cinco factores de riesgo estipulados para el diagnóstico clínico en humanos. La dislipidemia, la hipertensión y las alteraciones en la actividad de enzimas contribuyen a la progresión de enfermedades crónico degenerativas.

Estos factores están asociados al síndrome metabólico, como la inflamación sistémica de bajo grado la cual juega un papel importante en el establecimiento y desarrollo de la patología.

El consumo de fructosa produjo un aumento significativo en la actividad específica de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en suero, probablemente para regular los niveles de acetilcolina circulante, y así evitar que ejerza su propiedad anti-inflamatoria a través de los macrófagos. Además provocó una disminución en la actividad específica de paraoxonasa-1 favoreciendo la dislipidemia y generando estrés oxidante mediante el descontrol de LDL-oxidadas.

El tratamiento con NAM mejora y regula las alteraciones dadas por el consumo de fructosa actuando como una molécula anti-lipémica y anti-inflamatoria, en las alteraciones metabólicas.

Es importante estudiar la vinculación entre la señalización colinérgica con la actividad metabólica y la respuesta inflamatoria, ya que las esterasas podrían ser un blanco terapéutico para evitar las complicaciones del síndrome metabólico.

Es importante vislumbrar el mecanismo por el cual nicotinamida ejerce un efecto benéfico sobre los parámetros analizados y sobre la actividad de estas esterasas, ello contribuiría a considerarla como un adyuvante en la patología del síndrome metabólico, ya que constituye un enfoque fundamentado teóricamente y experimentalmente, que por ser accesible e innovador conviene investigar.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. ENSANUT. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD Y NUTRICION. <http://ensanutinspmx>. 2012;1:1-4.
2. OMS. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmitibles. www.who.int. 2014.
3. Rtveladze K, Marsh T, Barquera S, Sanchez Romero LM, Levy D, Melendez G, et al. Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public health nutrition*. 2014;17(1):233-9.
4. Burguete-Garcia AI, Valdes-Villalpando YN, Cruz M. [Definitions for the diagnosis of metabolic syndrome in children]. *Gaceta medica de Mexico*. 2014;150 Suppl 1:79-87.
5. Ford ES, Li C. Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: will the real definition please stand up? *The Journal of pediatrics*. 2008;152(2):160-4.
6. AHA AHA. What is metabolic syndrome? *Learn and Live*. 2012.
7. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *The Indian journal of medical research*. 2009;130(4):361-8.
8. van Himbergen TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *The Netherlands journal of medicine*. 2006;64(2):34-8.
9. Navarro-Lopez F. [Genes and coronary heart disease]. *Revista española de cardiología*. 2002;55(4):413-31.

10. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews Neuroscience*. 2001;2(4):294-302.
11. Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Ahmadi R, Kiani A, Tavailani H, et al. Synergistic effects of BuChE non-UU phenotype and paraoxonase (PON1) 55 M allele on the risk of systemic lupus erythematosus: influence on lipid and lipoprotein metabolism and oxidative stress, preliminary report. *Lupus*. 2014;23(3):263-72.
12. Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clinical biochemistry*. 2005;38(9):799-805.
13. Stojanov M, Stefanovic A, Dzingalasevic G, Mandic-Radic S, Prostran M. Butyrylcholinesterase activity in young men and women: association with cardiovascular risk factors. *Clinical biochemistry*. 2011;44(8-9):623-6.
14. Jimenéz-Díaz MM-M, V. Validación de la determinación de colinesterasa plasmática humana a 340 nM. *Rev Biomed*. 2000;11:91-8.
15. Rao AA, Sridhar GR, Das UN. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*. 2007;69(6):1272-6.
16. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, et al. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(11):5422-6.
17. Garces C, Lopez, S. L., Rubio, R., Benavente, M., Cano, B., Viturro, E., de la Oya, M. . Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los

polimorfismos PON1 192 y PON1 55 en la población prepuberal del Estudio de Cuatro Provincias. *Clin Invest Arterioscl.* 2007;N° 19(6):page. 287 – 92.

18. Gomez-Diaz RA, Garcia-Bello JA, Mondragon-Gonzalez R, Diaz-Flores M, Valladares-Salgado A, Gallardo JM, et al. Metabolic syndrome in children with chronic kidney disease: PON1 and treatment modality. *Archives of medical research.* 2013;44(8):645-9.

19. Koren-Gluzer M, Aviram M, Meilin E, Hayek T. The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates beta-cell insulin release. *Atherosclerosis.* 2011;219(2):510-8.

20. Gonzalez V, Huen K, Venkat S, Pratt K, Xiang P, Harley KG, et al. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *Journal of exposure science & environmental epidemiology.* 2012;22(6):641-8.

21. Benmoyal-Segal L, Vander T, Shifman S, Bryk B, Ebstein RP, Marcus EL, et al. Acetylcholinesterase/paraoxonase interactions increase the risk of insecticide-induced Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2005;19(3):452-4.

22. Nakamura M, Bhatnagar A, Sadoshima J. Overview of pyridine nucleotides review series. *Circulation research.* 2012;111(5):604-10.

23. Rossmeisl M, Flachs P, Brauner P, Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, et al. Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *International journal of obesity and related*

metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity. 2004;28 Suppl 4:S38-44.

24. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell metabolism*. 2011;14(4):528-36.

25. Vallianou N, Evangelopoulos A, Bountziouca V, Bonou M, et al. Association of butyrylcholinesterase with cardiometabolic risk factors among apparently healthy adults. *J Cardiovasc Med* 2014, 15:377–383.

26. Lampón N, Hermida-Cadahia EF, Riveiro A, Tutor JC. Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Ann Hepatol*. 2012; 11 (3): 356-363.

27. Rosas-Ballina M, Tracey K.J. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009 June ; 265(6): 663–679.

28. Morales-Arroyo I, Actividad y glicosilación de las colinesterasas en ratones con hígado graso no alcohólico. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Posgrado en Biología Experimental. UAM-Iztapalapa.

29. Roth Z, Yehezkel G, Kahalaila I. Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. Volume 2012, Article ID 640923, 10 pages.

30. Tong D, Zhang D, Xiang D, Teng M, Jiang X, Hou J, Zhang Q, Huang Y. Nicotinamide Pretreatment Protects Cardiomyocytes against Hypoxia-Induced Cell Death by Improving Mitochondrial Stress. *Pharmacology* 2012;90:11–18.

31. Yamchuen P, Aimjongjun S, Limpeanchob N. Oxidized low density lipoprotein increases acetylcholinesterase activity correlating with reactive oxygen species production. *Neurochem Int.* 2014; 78:1-6.
32. Neuschwander-Tetri B. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013; 16:446-452.
33. Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2012; 23:203-208.
34. Ulrich J. Niacin as antidyslipidemic drug. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2015; 93:1043-1054.
35. Sauve A. NAD⁺ and vitamin B3: From metabolism to therapies. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2008; 324:883-893.
36. Perez-Cruz E, Serralde-Zuñiga A, Meléndez-Mier G. Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructosa. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 2007; 15(2):67-74.
37. Colak Y, Yesil A, Mutlu HH, Caklili OT, Ulasoglu C, Senates E, Takir M, Kostek O, Yilmaz Y, Yilmaz Enc F, Tasan G, Tuncer. A potential treatment of non-alcoholic fatty liver disease with SIRT1 activators. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2014; 23(3):311-9 .
38. Bibiloni Mdel M, Salas R, Nuñez GM, Villarreal JZ, Sureda A, Tur JA. Relation between Liver Transaminases and Dyslipidaemia among 2-10 y.o. Northern Mexican Children. *PLoS One.* 2016. 20;11.
39. Ibrahim SM, El-Denshary ES, Abdallah DM. Geraniol, alone and in combination with pioglitazone, ameliorates fructose-induced metabolic

syndrome in rats via the modulation of both inflammatory and oxidative stress status. PLoS One. 2015; 13;10(2).

40. Rosset R, Surowska A, Tappy L. Pathogenesis of Cardiovascular and Metabolic Diseases: Are Fructose-Containing Sugars More Involved Than Other Dietary Calories?. Curr Hypertens Rep. 2016. 18: 44

41. Nebel M, Schwoerer AP, Warszta D, Siebrands CC, Limbrock AC, Swarbrick JM, Fliegert R, Weber K, Bruhn S, Hohenegger M, Geisler A, Herich L, Schlegel S, Carrier L, Eschenhagen T, Potter BV, Ehmke H, Guse AH. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-mediated calcium signaling and arrhythmias in the heart evoked by β -adrenergic stimulation. J Biol Chem. 2013. 31;288(22):16017-30

42. Gamboa R, Regalado JC, Huesca-Gómez C, Posadas-Romero C, Verdejo Paris J, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Low paraoxonase and arylesterase plasma activities in Mexican patients with coronary artery disease. Arch Cardiol Mex. 2008 Oct-Dec;78(4):360-8

43. Klurfeld DM, Foreyt J, Angelopoulos TJ, Rippe JM. Lack of evidence for high fructose corn syrup as the cause of the obesity epidemic. Int J Obes (Lond). 2013; 37(6):771-3.

44. Bray GA. Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. Adv Nutr. 2013. 1;4(2):220-5.

45. Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. Dig Dis Sci. 2016. 61(5):1282-93.

46. Merino-Aguilar H, Arrieta-Baez D, Jiménez-Estrada M, Magos-Guerrero G, Hernández-Bautista RJ, Susunaga-Notario Adel C, Almanza-Pérez JC, Blancas-Flores G, Román-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ. Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Nutrients*. 2014. 29;6(2):591-604.
47. Baudoin L, Issad T. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015. 9;5:235.
48. Kota SK, Meher LK, Kota SK, Jammula S, Krishna SV, Modi KD. Implications of serum paraoxonase activity in obesity, diabetes mellitus, and dyslipidemia. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013; 17(3):402-12.
49. Kronman C1, Velan B, Marcus D, Ordentlich A, Reuveny S, Shafferman A. Involvement of oligomerization, N-glycosylation and sialylation in the clearance of cholinesterases from the circulation. *Biochem J*. 1995 Nov 1;311 (Pt 3):959-67.
50. Mahmoud AA, Elshazly SM. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One*. 2014 Sep 9;9(9).
51. Ellman GL, Cortney KD, Andres VJ, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. 1961. *Biochem. Pharmacol*. 7: 88-95.
- 52.....Gómez Olivares JL. Propiedades estructurales de las colinesterasas de corazón, eritrocito e hígado de ratones normales y distróficos Lama2. 2000. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España.

53. Cheng PW, Lee HC, Lu PJ, Chen HH, Lai CC, Sun GC, Yeh TC, Hsiao M, Lin YT, Tseng CJ. Resveratrol Inhibition of Rac1-Derived Reactive Oxygen Species by AMPK Decreases Blood Pressure in a Fructose-Induced Rat Model of Hypertension. *Sci Rep.* 2016 May 3;6:25342.