



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico Farmacobiología

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA



QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M.C.S. MERCEDES VICTORIA URQUIZA MARTÍNEZ

LA TESIS TITULADA:

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIPOBESIGÉNICO Y ANTIINFLAMATORIO DE UNA DIETA ADICIONADA
CON HARINA DE NOPAL (*Opuntia ficus-indica*) SOBRE LA REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL
METABOLISMO ENERGÉTICO EN UN MODELO DE RATÓN.**

ASESORADA POR:

D.C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

CO- ASESORADA POR:

D.C. OMAR GUZMÁN QUEVEDO

MORELIA, MICHOACÁN. OCTUBRE 2020.

ÍNDICE

ÍNDICE	
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	
ABREVIATURAS	
RESÚMEN	ii
ABSTRACT	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.I OBESIDAD	1
I.II BALANCE ENERGÉTICO	2
I.II.I REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL BALANCE ENERGÉTICO	3
I.II.II ALTERACIONES HIPOTALÁMICAS POR UNA DIETA HIPERLIPÍDICA	4
I.II.III MICROGLIA E INFLAMACIÓN POR UNA DIETA HIPERLIPÍDICA	6
I.III ALIMENTOS FUNCIONALES COMO TRATAMIENTO PARA LA OBESIDAD	7
I.III.I COMPUESTOS FENÓLICOS	8
I.III.II NOPAL (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	9
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVO GENERAL	14
V.I OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
V. METODOLOGÍA	15
V.I HARINA DE NOPAL	15
V.II MODELO DE RATON OBESO INDUCIDO POR DIETA	15
V.III FORMULACIÓN DE DIETAS	16
V.IV SECUENCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDAD	17
V.V TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA	17
V.VI TEST DE TOLERANCIA A INSULINA	18
V.VII INMUNOHISTOQUÍMICA	18
V.VIII PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y PESO TEJIDO ADIPOSO	19
V.IX ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
VI. RESULTADOS	20
VI.I INDUCCIÓN OBESIDAD	20
VI.II PESO, CONSUMO DE ALIMENTO Y EFICIENCIA ALIMENTARIA CON HARINA DE NOPAL	21
VI.III SECUENCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDAD	23
VI.IV TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA E INSULINA	25
VI.V INMUNOHISTOQUÍMICA	26
VI.VI BIOQUÍMICA	28
VI.VII PESO TEJIDO ADIPOSO	29
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
VIII. CONCLUSIONES	34
IX. PERSPECTIVAS	34
X. BIBLIOGRAFÍA	35
XI. ANEXOS	40

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1.	Composición de cladodios de Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	12
2.	Ingredientes y composición de dietas	16
3.	Los pesos semanales de cada grupo	21

FIGURAS

FIG 1	Determinación de sobrepeso u obesidad según el IMC	1
FIG 2	Balance energético	2
FIG 3	Hipotálamo y regulación del balance energético	3
FIG 4	Activación de microglia por dieta hiperlipídica	5
FIG 5	Cambio morfológico microglía activada	7
FIG 6	Metabolismo secundario de plantas para elaboración de compuestos fenólicos	8
FIG 7	Estructura de compuestos fenólicos	10
FIG 8	Nopal <i>Opuntia ficus-indica</i>	11
FIG 9	Proceso para obtención de harina de nopal	15
FIG 10	Peso corporal de ratones alimentados con Dieta Estándar (SD) o Dieta Hiperlipídica (HFD), durante 12 semanas	20
FIG 11	Peso corporal y Eficiencia Alimentaria	22
FIG 12	Consumo acumulado de alimento en: gramos y kilocalorías	22
FIG 13	Secuencia comportamental de Saciedad	24
FIG 14	Curva de Tolerancia a Glucosa y tolerancia a insulina con Área Bajo la Curva	25
FIG 15	Micrografías de cortes de cerebro de ratón, localizando hipotálamo y el núcleo arqueado (Arc), se toma como referencia el tercer ventrículo. Densidad (células totales/mm ²) y Células activadas/mm ² .	27
FIG 16	Parámetros bioquímicos	29
FIG 17	Peso tejido adiposo epididimal y retroperitoneal	30

ABREVIATURAS

AIN-93	American Institute of Nutrition Rodent Diets	IRS	Insulin Receptor Substrate
ARC	Arcuate Nucleus Hypothalamus-	ITT	Insulin Tolerance Test
BSS	Behavioral satiety sequence	JNK	c-Jun N-terminal kinases
CCK	Cholecystokinin	NF-κB	Nuclear factor kappa B
BW	Body weight	NO	Nitric oxide
CF	Cactus flour	NPH	Neutral Protamine Hagedorn insulin
D2	Iodothyronine deiodinase	POMC	Pro-opiomelanocortin
FE	Feed efficiency	PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
FI	Feed intake	PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B
GLP-1	Glucagon-like peptide 1	PYY	Peptide YY
GLUT2	Glucose transporter 2	SD	Standard Diet
GTT	Glucose Tolerance Test	SD-CF	Standar Diet and Cactus Flour
HFD	High Fat Diet	SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
HFD-CF	High Fat Diet and Cactus Flour	T3	Thyroid hormone
IKK	The inhibitor of nuclear factor-κB (IκB) kinase	TLR4	Toll Like Receptor 4
Il	Interleukins	TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
i-NOS	Inducible nitric oxide synthase		

RESUMEN

La obesidad y las enfermedades relacionadas a ella, por ejemplo la diabetes, son un gran problema de salud pública en el mundo y requieren una solución urgente. Dada la poca efectividad de las terapias farmacológicas para resolver este problema surgen como una alternativa atractiva las estrategias nutricionales. Estudios han demostrado que el consumo de *Opuntia ficus-indica* mejora la obesidad; sin embargo, los mecanismos implicados son poco comprendidos. El objetivo de este trabajo fue investigar la respuesta anti-inflamatoria a nivel hipotalámico y la regulación del metabolismo en ratones obesos inducidos con dieta adicionada con *Opuntia ficus-indica*. Se usaron ratones adultos macho C57Bl/6j, se les administro una dieta hiperlipídica –HFD- (60% kcal/lípidos) durante 12 semanas para desarrollar obesidad. Posteriormente a la misma dieta HFD se le adicionó harina de nopal -CF- (17%) y fue administrada por 4 semanas. Durante el tratamiento se evaluó el peso corporal, el consumo de alimento y la tolerancia a glucosa e insulina. Además, se realizó la Secuencia Comportamental de Sacidad –BSS-, y *post mortem* se evaluaron niveles bioquímicos en suero, activación y densidad de microglía en el hipotálamo, así como cantidad de tejido adiposo. Los datos fueron analizados mediante ANOVA (una o dos vías) y se consideró significativa una $p \leq 0.05$. El consumo de CF normalizó el peso y la adiposidad, así como el consumo calórico. La eficiencia alimentaria disminuyó significativamente ($p < 0.0001$); la tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina también se vieron mejoradas de manera significativa ($p = 0.001$ y $p < 0.0001$) con el tratamiento de CF. En la BSS se mostró una disminución en el tiempo de descanso y aumento la de acicalamiento en animales con HFD-CF, estos animales además presentaron mejor función renal relacionada con menores niveles de urea en sangre ($p = 0.03$). Finalmente, el consumo de CF normalizó la densidad de microglía en el núcleo arqueado del hipotálamo de ratones obesos y disminuyó significativamente ($p = 0.01$) su activación. Éste estudio provee nueva evidencia en el entendimiento de los efectos bien conocidos del nopal sobre el peso corporal, la adiposidad y el metabolismo de glucosa, sugiriendo un mecanismo anti-inflamatorio a nivel hipotalámico como parte clave de estos beneficios.

Palabras clave: obesidad, metabolismo energético, microglía, neuroinflamación, insulina.

ABSTRACT

Obesity and obesity-related diseases, e. g. diabetes, are a major public health problem over the world that requires an urgent solution. Given the poor effectiveness of pharmacological approaches to solve this problem, nutritional strategies can be a valuable alternative. It had been demonstrated that *Opuntia ficus-indica* consumption improves obesity condition; however, the involved mechanism is poorly understood. The aim of this work was to investigate the anti-inflammatory response at hypothalamic level and metabolism regulation of *Opuntia ficus-indica* in diet-induced obese mice. Adult male C57Bl/6j mice underwent high-fat diet –HFD- (60% kcal/fat) exposure over 12weeks to develop obesity. The same type of HFD added with cactus flour –CF- (17%) was administrated for 4weeks. Body weight (BW), feed intake, and glucose and insulin tolerance were measured during treatment. Also, Behavioral satiety sequence (BSS) was performed, blood parameters and adiposity along with microglia activation and density in the arcuate nucleus was determined *post mortem*. Data were analyzed by ANOVA (one way or two way) and considered as significant when $p \leq 0.05$. CF normalized body weight and adiposity as well as calorie intake. Feed efficiency was significantly decreased ($p < 0.0001$); glucose tolerance and insulin sensitivity were also improved with CF treatment ($p = 0.001$ and $p < 0.0001$). BSS showed a decreased resting time and increased grooming for animals with a HFD-CF, these animals also showed renal function improvement showed by lower urea blood levels ($p = 0.03$). Finally, CF consumption normalized microglia density in the arcuate nucleus of the hypothalamus in obese mice and significantly decreased their activation ($p = 0.01$). This study provided new light in the understanding of the well-known effects of cactus over body weight, adiposity and glucose metabolism, suggesting an anti-inflammatory mechanism at hypothalamic level involved in its benefits.

Keywords: obesity, energy metabolism, microglia, neuroinflammation, insulin.

I. INTRODUCCIÓN

I.I OBESIDAD

El sobrepeso y la obesidad son el principal problema de salud pública en el mundo ya que, según datos de la Organización Mundial de la Salud del 2014, tiene una prevalencia de 39% y 13% en personas adultas, respectivamente. Definido por la OMS como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, se determina mediante el Índice de Masa Corporal (IMC = kg/m^2) (**FIG 1**). Este problema de salud está asociado con: desórdenes de aprendizaje, cáncer, enfermedades cardiovasculares, hepáticas y neurodegenerativas, y principalmente, diabetes mellitus tipo 2, que se presenta en 8 de cada 10 personas con sobrepeso u obesidad; éstas enfermedades son las principales causas de mortalidad en México (Catania, Lonati *et al.* 2010; INEGI 2013). De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2016, 72.5 % de la población mexicana a partir de los 20 años presenta sobrepeso u obesidad; de mantenerse la tendencia actual, el problema podría llegar a afectar al 90% de los mexicanos en el año 2050 (Gutiérrez, *et al.* 2012). Datos recientes señalan que las cifras van en aumento, alcanzando niveles sin precedentes, sin indicio que vayan a bajar pese a las estrategias públicas y privadas, sosteniéndose como un serio problema de salud pública que requiere acciones drásticas e investigación continua (Seidell y Halberstadt, 2016).

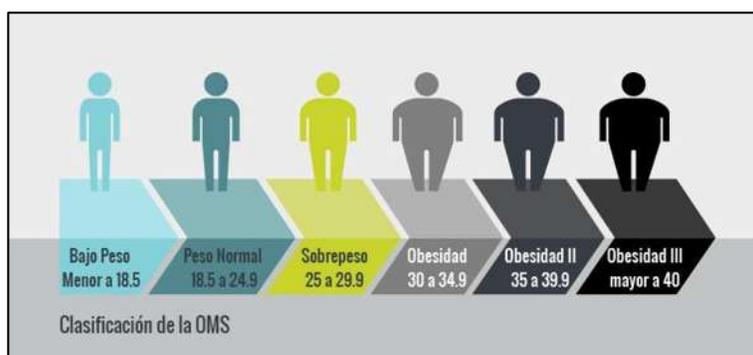


FIG 1. Determinación de sobrepeso u obesidad según el IMC

(Fuente: <https://blogconsciente.home.blog/2019/02/17/la-obesidad-y-el-imc/>)

I.II BALANCE ENERGÉTICO

El peso y la composición corporal están determinados por el equilibrio a largo plazo entre la ingesta y el gasto de energía (**FIG 2**), el cual es definido como Balance Energético (BE) (Hill *et al.*, 2003); la interacción de factores genéticos, ambientales y psicosociales influyen sobre ella. El BE es positivo si la ingesta calórica (alimentos) supera el gasto energético (actividad física, metabolismo basal y termogénesis); si la ingesta es inferior, el BE es negativo (Sun, *et al.*, 2008). Un estado prolongado del BE positivo conduce al sobrepeso o la obesidad, dada la síntesis de lípidos aumentada debido al excedente calórico, la cual es almacenada en el tejido adiposo.

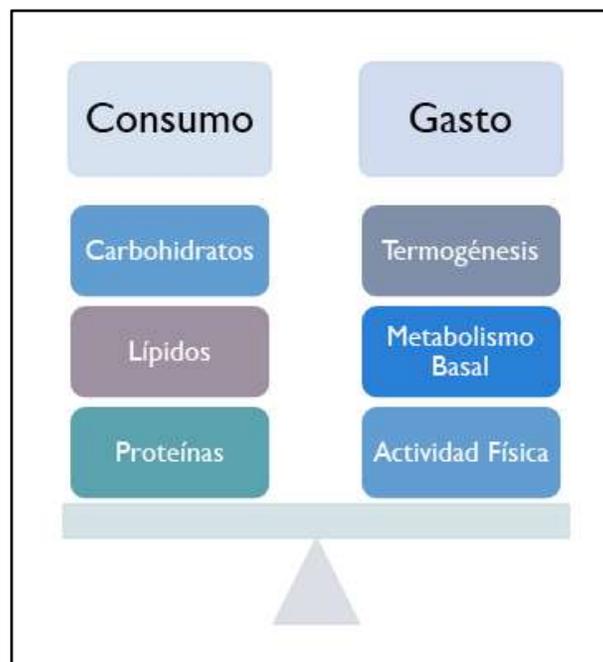


FIG 2. Balance energético.

(Fuente: Creación propia)

Dicho BE es monitoreado por el sistema nervioso central, detectando e interpretando señales de nutrientes como glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y de hormonas como leptina, insulina, ghrelina o colecistoquinina, por mencionar algunos; éste proceso es regulado por el hipotálamo (Cota *et al.*, 2007).

I.II.I REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL BALANCE ENERGÉTICO

Esta estructura localizada en la parte basomedial del cerebro, contiene diferentes agrupaciones neuronales llamadas núcleos hipotalámicos; conformado por 10 núcleos con funciones diversas, al menos la mitad de ellas se relacionan con el mantenimiento de la homeostasis energética, ya sea participando en las sensaciones de hambre o saciedad o actuando sobre el gasto/consumo de energía.

Primordialmente, el núcleo arqueado (ARC), compuesto por neuronas de primer orden, juega un rol central en el BE. Existen dos poblaciones antagónicas de neuronas en este núcleo constituidas por neuronas POMC/CART (*proopiomelanocortin/cocain anfetamin related transcript*) que expresan el neuropéptido supresor del apetito -péptido anorexigénico- α -MSH (α -*Melanocyte-stimulating hormone*) y las neuronas NPY/AgRP (*neuropeptide Y/agouti-related protein*) que expresan por su parte los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP (**FIG 3**).

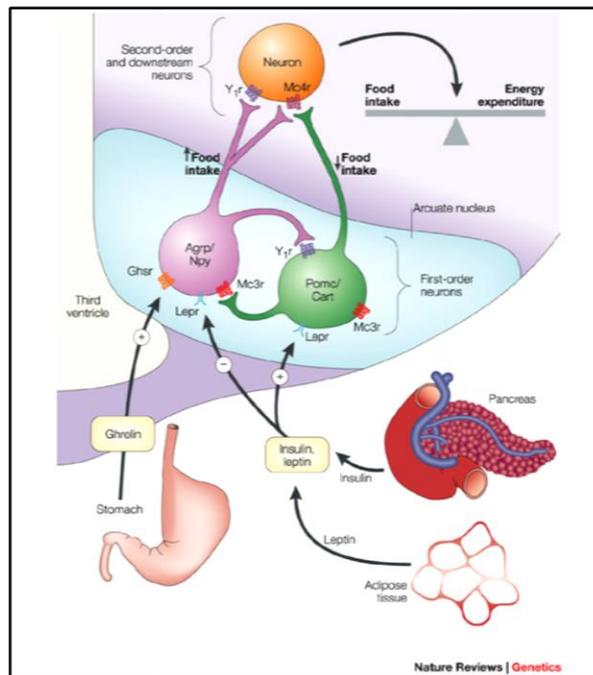


FIG 3. Hipotálamo y regulación del balance energético.

(Fuente: G. S. Barsh and M. W. Schwartz: Nature Reviews Genetics 3:589-600, 2002)

Éstos dos tipos de neuronas son reguladas principalmente por la activación de receptores de leptina e insulina, dos hormonas que circulan en la sangre en cantidades proporcionales al contenido de grasa corporal y glucosa, respectivamente, disminuyendo o aumentando su actividad; creando así un equilibrio en la expresión de estos neuropéptidos, que tienen la capacidad de actuar sobre neuronas de segundo orden localizadas en el núcleo ventromedial (VMH), paraventricular (PVH), dorsomedial (DMH) y lateral (LH) que a su vez transmiten la información codificada a diferentes sistemas cerebrales que regulan la ingesta, almacenamiento y utilización de energía por el organismo (Arble y Sandoval, 2013; Cota *et al.*, 2007).

A nivel neuronal, la vía del sensor nutricional, la proteína cinasa “diana de rapamicina en células de mamífero complejo 1” (mTORC1) interpreta las señales nutricionales que llegan al hipotálamo regulando río abajo procesos vitales para la célula como síntesis de proteínas a través de la activación de la proteína ribosomal S6, proliferación celular, inhibición del apetito y supresión de la autofagia (Catania *et al.*, 2010; Cota *et al.*, 2006).

Debido a las funciones de supervisión nutricional desempeñadas por el hipotálamo, en ésta área particular del cerebro la Barrera Hematoencefálica (BHE) es más permisiva, lo que la hace eficaz en su función (Abbott *et al.*, 2006).

I.II.II ALTERACIONES HIPOTALÁMICAS POR UNA DIETA HIPERLIPÍDICA

Sin embargo, es también esa permisividad la que hace susceptible al hipotálamo a la inflamación inducida por una dieta hiperlipídica (*High-Fat Diet –HFD-*), ya que primordialmente la microglía – célula glial con función inmune en el SNC-, junto con los tanicitos, que son células gliales especializadas que contribuyen al transporte en la BHE y que pueden servir de progenitores neuronales, de la mano de células progenitoras de oligodendrocitos, promueven la ganancia de peso al limitar el acceso de la leptina y producir nuevas neuronas que incrementan el consumo de alimento y disminuyen el gasto de energía (Dorfman y Thaler, 2015).

Varios estudios en modelos animales han mostrado la alteración de los sistemas hipotalámicos de regulación del BE por el consumo de alimentos con alto contenido calórico y principalmente ácidos grasos saturados, lo que tiene una implicación en el

desarrollo de obesidad. Por ejemplo, ratones obesos inducidos por dieta (André, *et al.* 2017) presentaron un aumento de las concentraciones plasmáticas de leptina asociada a una disminución de sus efectos anoréxicos (Frederich *et al.*, 1995); sin embargo, la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de leptina restaura estos efectos sugiriendo que el problema se encuentra en el transporte de leptina a través de la BHE, impidiendo su acción en el hipotálamo (ElHaschimi *et al.*, 2000).

Los efectos de la insulina en el hipotálamo regulando el consumo de alimento y la producción hepática de glucosa han sido bien documentados (Vogt y Brüning, 2013). Una resistencia hipotalámica a los efectos anoréxicos de la insulina ha sido igualmente observada en ratas expuestas 3 días a una dieta hiperlipídica (HFD), sugiriendo un rol causal de la insensibilidad a la insulina en el desarrollo de obesidad (Clegg *et al.*, 2011). La literatura sugiere que la respuesta inflamatoria hipotalámica observada inmediatamente después de la exposición a una HFD por microglía activada, mediaría la respuesta alterada a la leptina y la insulina (FIG 4). Precozmente, tras 24 h de la exposición a una HFD, se presenta un aumento de la expresión de los mediadores de la inflamación IL-6 (interleucina-6), TNF α (*Tumor necrosis factor α*) y SOCS3 (*supresor of cytokine signaling 3*), que son reguladores negativos de la señalización de leptina e insulina en el hipotálamo (Howard y Flier, 2006; Thaler *et al.*, 2013).

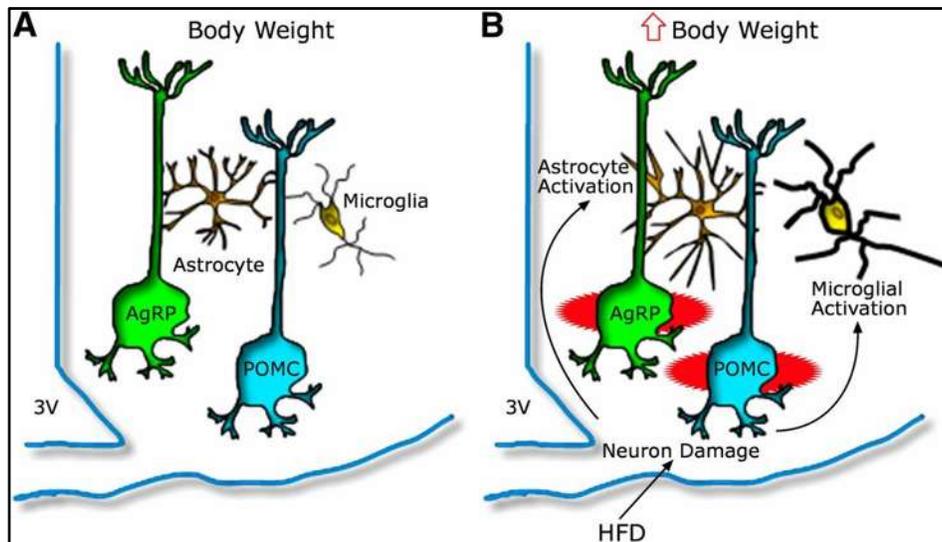


FIG 4. Activación de microglía por dieta hiperlipídica.

(Fuente: Thaler, *et al.* 2013)

I.II.III MICROGLIA E INFLAMACIÓN POR UNA DIETA HIPERLIPÍDICA

La microglía, mencionada anteriormente, es considerada como los macrófagos del SNC, se encuentran normalmente en un estado latente o “vigilante” con morfología ramificada y monitoreando el ambiente, cuando detecta toxinas ambientales, daño mecánico o un estímulo inmune (por virus o bacterias, por ejemplo), se activa modificando su morfología ramificada por una más grande, redondeada, tipo ameboide (**FIG 5**) presentado en su superficie moléculas como CD14, complejo mayor de histocompatibilidad, receptores para quimiocinas, entre otros (Block *et al.*, 2007).

Tras consumir una HFD se ha observado un aumento en el número y activación de la microglía debido a la activación del TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) que funge como mediador de inflamación por ácidos grasos saturados y que se expresa abundantemente en ésta (Milanski *et al.*, 2009). Su activación estimula la generación de factores solubles como factor neurotrófico derivado de glía (benéfico para la supervivencia neuronal); sin embargo, en su mayoría expresa factores proinflamatorios y neurotóxicos, tales como la enzima proinflamatoria óxido nítrico sintasa, citocinas como $IL-1\beta$ y $TNF\alpha$, factores transcripcionales como $NF-\kappa B$ y la producción de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (Mingrone, Panunzi *et al.* 2015) como $O_2^{\cdot-}$ y NO que generan daño oxidativo a moléculas como proteínas, lípidos y material genético, desencadenando apoptosis celular, lo que se ha visto que puede resultar hasta en un 25% menos de neuronas POMC/CART en el núcleo ARC (Lau *et al.*, 2007; Thaler *et al.*, 2012).

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

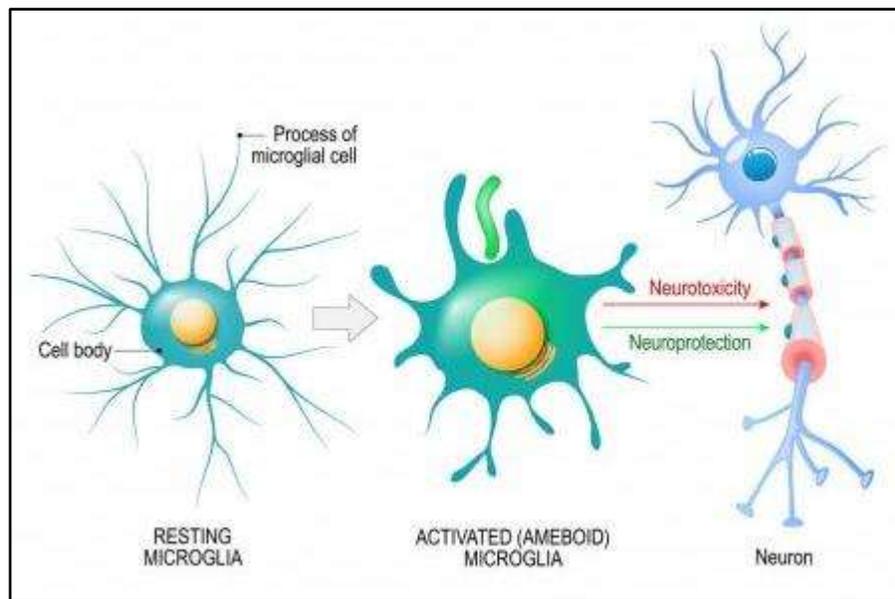


FIG 5. Cambio morfológico microglía activada.

(Fuente: <https://sp.depositphotos.com/vector-images/microgl%C3%ADa.html>)

I.III ALIMENTOS FUNCIONALES COMO TRATAMIENTO PARA LA OBESIDAD

A pesar del alto costo económico y humano de esta enfermedad, no existen a la fecha terapias efectivas para su tratamiento, a excepción de la cirugía (Flier 2004; Barja-Fernández, *et al.*, 2015), la cual no es accesible a todo público e implica riesgos a la salud propios del procedimiento. Lo que hace, como se mencionó anteriormente, a la investigación de su etiología y tratamiento un ente vigente.

Un área que ofrece una amplia gama de alternativas es aquella enfocada en alimentos funcionales, ya que existe una relación bien establecida entre nutrición, respuestas biológicas y estado de salud (Riccardi, Capaldo *et al.*, 2005). En lo que respecta al sobrepeso y obesidad, la función de los alimentos funcionales radica en la regulación del consumo de alimento promoviendo la sensación de saciedad (Halford y Harrold, 2012) o, por otro lado, en la eficiencia del gasto de energía, ambos regulados por el hipotálamo (Spiegelman y Flier, 2001).

Los alimentos funcionales, se definen por ser aquellos que afectan de manera benéfica una o más funciones específicas en el organismo, ya sea mejorando el estado de salud

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

Estudios hechos con extractos ricos en compuestos fenólicos de té verde (50 mg/kg de peso/día), de ginseng (ginsenoso Rb1- 14 mg/kg de peso/día-) y de canela (cinnamaldehído- 10 mg/kg de peso/día) han mostrado tener un efecto antiobesigénico al actuar sobre el peso corporal, depósitos de masa grasa, consumo de alimento, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina y la leptina, todo ello revirtiendo el efecto inflamatorio de una HFD en el hipotálamo, ya que disminuyó la expresión de marcadores inflamatorios (IL-6, IL-1 β y pIKK), así como reguladores negativos de la señalización de leptina (SOCS3 y PTP1B) (Khare *et al.*, 2016; Okuda *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos comprenden un grupo heterogéneo de más de 8,000 estructuras ampliamente distribuidas en diferentes tejidos vegetales que se consumen como frutas, verduras, vino, té, especias, chocolate o granos; se componen de uno o más anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilo (-OH) (Urquiaga y Leighton, 2000).

Se clasifican en:

- Ácidos fenólicos: hidroxibenzoico e hidroxicinnámico
- Flavonoides: incluye a las antocianinas y a las antioxiantinas (flavonas, flavononas, flavonoles -quercetina, kaempferol, miricetina, entre otros-, flavan-3-oles, isoflavonas, chalconas y sus glicósidos).
- Amidas polifenólicas: capsaiscinoides y avenantramidas.
- Otros no flavonoides: taninos, estilbenos, ácido elágico, lignanos, entre otros (Tsao 2010).

Su relación con la prevención de enfermedades es ampliamente estudiada, ya que protegen contra estrés oxidativo, enfermedad cardiovascular, cáncer, osteoporosis, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas (D'Archivio *et al.*, 2007). Se muestra su estructura química básica en la **FIG 7**.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

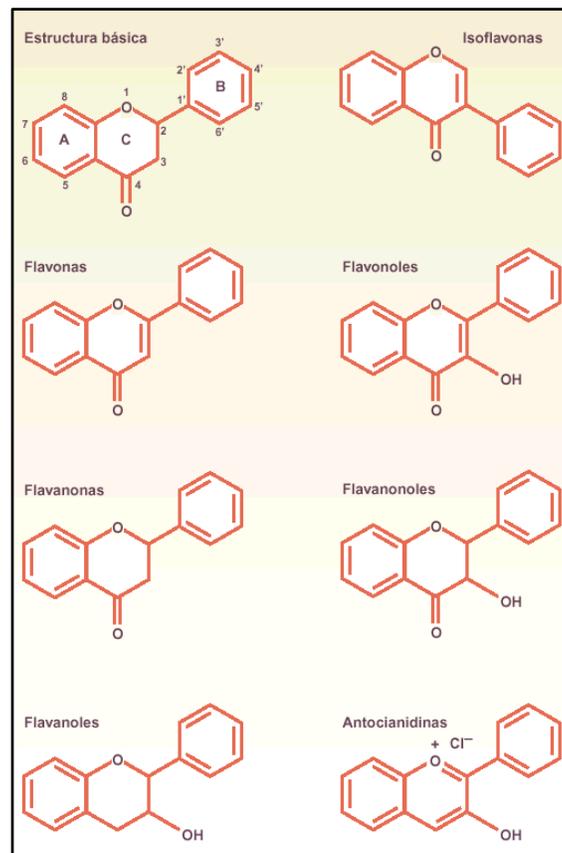


FIG 7. Estructura de compuestos fenólicos

(<https://multimedia.elsevier.es/PublicationsMultimediaV1/item/multimedia/13054406:4v22n10-13054406tab03.gif?idApp=UINPBA00004N>)

I.III.II NOPAL (*Opuntia ficus-indica*)

El nopal (*Opuntia spp.*), alimento funcional ampliamente consumido y estudiado en México, es una cactácea originaria de América (**FIG 8**), contiene carbohidratos digeribles, fibra, antioxidantes (carotenoides y betalaínas, potenciales agonistas de TGR5), calcio, potasio, vitamina A, vitaminas del complejo B y vitamina C, además de tener un alto contenido en compuestos fenólicos y polifenólicos (80-90 mg/100g de peso seco) como quercetina, kaempferol, ácido ferúlico y nicotiflorino, entre otros (Bensadón *et al.*, 2010; Valencia-Sandoval *et al.*, 2010). En la Tabla 1 se muestra su composición.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón



FIG 8. Nopal *Opuntia ficus-indica*.

(Fuente: Foto propia)

El nopal se emplea extensivamente tanto como alimento, así como en la medicina tradicional como antipirético, antiinflamatorio, diurético, analgésico y antiespasmódico (El-Mostafa *et al.*, 2014). A través de la activación de la vía antitumoral p53, el nopal ejerce efectos anticancerígenos. Por su alto contenido en fibra y mucílago inmoviliza sales biliares y colesterol, reduciendo su concentración en la circulación, protegiendo así de enfermedades cardiovasculares (Mulas, 1992). El nopal presenta capacidad de reducir niveles de glucosa en sangre, estimulando la secreción de insulina y por ende, la glucogénesis hepática (Feugang *et al.*, 2006), dos procesos controlados por el hipotálamo (Lam *et al.*, 2005; Ramnanan *et al.*, 2011). Un estudio utilizando un modelo experimental de diabetes inducida con estreptozotocina en ratas, mostró que la adición de harina de nopal a la dieta disminuyó las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y glucosa, asociado con un aumento de insulina plasmática y una mejora del daño tisular inducido. En otra serie de experimentos realizados por nuestro equipo de trabajo (Cysneiros *et al.*, 2018) mostraron que la harina de nopal protege a ratas de

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

los efectos negativos de una dieta hipercalórica occidentalizada alta en grasa, tales como: ganancia de peso corporal ($p=0.05$), insensibilidad a la insulina ($p=0.05$) y una tendencia a disminuir el aumento de masa grasa abdominal, dislipidemia y de marcadores de daño hepático.

Tabla 1. Composición de cladodios de Nopal (*Opuntia ficus-indica*). (Tomado de: Bensadón, *et al.*, 2010)

Nopal (g/100g peso seco)	
Humedad	5.73 ± 0.36
Proteína	1.13±0.39
Grasa	1.32±0.08
Fibra Dietética	
Soluble	9.3±0.41
Insoluble	53.7±2.47
Cenizas	16.41±0.35

Estudios *in vitro* mostraron la capacidad antiinflamatoria de un extracto etanólico de antioxidantes fenólicos del nopal. Específicamente, sobre células microgliales, expuestas a lipo-polisacáridos (inductor de la inflamación); el extracto (a dosis de 30, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) suprimió de manera dosis-dependiente la respuesta inflamatoria al inhibir la expresión de la Óxido Nítrico Sintasa inducible, y con ello la producción de óxido nítrico, mediante la inactivación de la vía NF- κB (*nuclear factor- κB*) (Lee *et al.*, 2006). Este resultado muestra la capacidad de los componentes bioactivos del nopal para modular la respuesta inflamatoria de la microglía, la cual se ha encontrado sobreactivada en roedores alimentados con HFD y en pacientes obesos donde reemplaza neuronas muertas a través de la activación de un proceso conocido como gliosis (Thaler *et al.*, 2012).

Los datos de la literatura presentados previamente muestran el papel central desempeñado por el hipotálamo en la regulación de la homeostasis energética y la implicación de sus alteraciones, inducidas por el consumo excesivo de alimentos hipercalóricos, en el desarrollo de patologías asociadas a la obesidad, como intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y la leptina, dislipidemia, entre otras. Así como el efecto benéfico que tienen alimentos funcionales como el nopal para su tratamiento.

II. JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el sobrepeso, presentes en más del 70% de la población adulta en México, son la principal amenaza a la salud pública nacional y mundial (con casi un 40% de adultos afectados) al ser factor de riesgo para el desarrollo de desórdenes de aprendizaje, de reproducción, estar asociados con algunos tipos de cáncer y representar el principal factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

El hipotálamo, desempeña un rol importante en la regulación del metabolismo energético, modulando su gasto y consumo; su susceptibilidad a los daños inducidos por la ingesta excesiva de calorías/lípidos que desencadena el desarrollo de la obesidad, intolerancia a la glucosa, resistencia tanto a la insulina como a la leptina y dislipidemia, lo hacen objeto de estudio para revertir dicho padecimiento.

El uso de alimentos que poseen compuestos bioactivos capaces de modificar favorablemente funciones fisiológicas ha surgido como una alternativa real, de acuerdo con múltiples estudios realizados en las últimas décadas.

El nopal posee un gran número de beneficios sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos, disminuyendo el contenido de estas biomoléculas en sangre y con ello el riesgo de enfermedades relacionadas a ellas. El nopal protege de la inflamación y de los efectos negativos de una dieta hipercalórica, como lo muestran resultados obtenidos previamente por nuestro equipo de investigación, la cual es conocida por inducir una inflamación hipotalámica dentro del concepto de “neuroinflamación metabólica”. Sin embargo, no existen en la literatura estudios que muestren los mecanismos precisos del nopal que medien los efectos en el control de dichos desórdenes metabólicos.

Es, por lo tanto, esencial el estudio de la interacción entre los componentes del nopal y el hipotálamo que muestren la participación de esta estructura cerebral en los beneficios metabólicos de su consumo. La elucidación de estos mecanismos proporcionará herramientas para el desarrollo de estrategias alimenticias mejor adaptadas y aportarán bases para desarrollar terapias efectivas contra la obesidad y sus comorbilidades.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

III. HIPÓTESIS

La administración de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) tiene un efecto antiobesigénico y antiinflamatorio sobre la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de la administración de una dieta adicionada con harina de nopal sobre la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón.

IV.I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del consumo de harina de nopal (*cactus flour* -CF-) sobre el comportamiento alimenticio y peso corporal de ratones obesos inducidos por dieta.
2. Determinar si el consumo prolongado (4 semanas) de harina de nopal en ratones obesos inducidos por dieta: aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce la intolerancia a la glucosa observada en animales obesos.
3. Analizar en animales obesos inducidos por dieta, el estado de inflamación del hipotálamo, como efecto del consumo de harina de nopal, potencialmente implicando sus beneficios metabólicos.
4. Determinar los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol, triglicéridos, enzimas hepáticas y adiposidad en animales obesos tratados durante 4 semanas con CF.

V. METODOLOGÍA

V.I HARINA DE NOPAL (CF)

Para la obtención de la CF se colectaron los cladodios de *Opuntia ficus-indica* en el municipio de Ziracuaretiro en Michoacán, localizado en la parte central del estado, en las coordenadas 29°16' de latitud norte y 101°55' de longitud oeste, a una altura de 1,380 metros sobre el nivel del mar, según establece el Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Una muestra fue previamente identificada por el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH (oficio con número de folio 27587, Anexo 1).

Los cladodios se lavaron y desinfectaron (solución de hipoclorito al 5%), posteriormente, se quitaron espinas y se seccionaron en trozos de 1cmX1cm para ser deshidratados a una temperatura de 50°C por 24 a 36h y posteriormente fueron pulverizados para ser utilizados como harina. Se obtuvo un polvo fino, de color verde claro con olor *sui generis*. El proceso se ilustra en la **FIG 9**.



FIG 9. Proceso para obtención de harina de nopal.

V.II MODELO DE RATÓN OBESO INDUCIDO POR DIETA (DIO)

Para el estudio se usaron ratones macho de la cepa C57BL/6 adultos (8 semanas de edad), en condiciones de luz/oscuridad (12h/12h) y temperatura (22±2 °C) reguladas, con acceso a agua y alimento *ad libitum*.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

Se les indujo obesidad por una exposición de 12 semanas a una dieta con 60% de calorías provenientes de grasa saturada –manteca de cerdo- (HFD). El tratamiento con harina de nopal (CF) se hizo a través de la adición de ésta última a la HFD para obtener la dieta experimental (HFD-CF) que fue administrada por 4 semanas después de la inducción de la obesidad. Se utilizaron 7 ratones por experimento y grupo experimental. Se conformaron 4 grupos experimentales de ratones:

- 1) Dieta estándar (*Standard Diet –SD-*),
- 2) Dieta estándar + Harina de Nopal (SD-CF) ,
- 3) Dieta Hiperlipídica (HFD) y
- 4) Dieta Hiperlipídica + Harina de Nopal (HFD-CF).

Las dietas fueron elaboradas en base a lo establecido para la elaboración de dieta de mantenimiento purificada para roedores de laboratorio por el *American Institute of the Nutrition (AIN-93)* (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) y la composición de HFD comercial con 60% de energía proveniente de lípidos del laboratorio TestDiet™ (Anexo 2, ficha técnica).

V.III FORMULACIÓN DE DIETAS.

Tabla 2. Ingredientes y composición de dietas.

g/kg	Dieta Estándar	Dieta Estándar + Harina Nopal	Dieta Hiperlipídica	Dieta Hiperlipídica + Harina de Nopal
Almidón	615	581	256	227
Sacarosa	100	100	100	100
Caseína	140	138	180	178
Celulosa	91	0	91	0
Guar	16	0	16	0
Aceite de soya/Manteca de cerdo	40	40	358	354
Mezcla Minerales	35	10	35	10
Mezcla Vitaminas	10	7	10	7
Harina de Nopal	-	170	-	170
%kcal Proteína	14.8	14.9	13.4	13.5
%kcal Carbohidratos	75.6	73.5	26.5	24.8
%kcal Lípidos	9.5	9.7	60.0	60.4
Kcal/gr	3.7	3.7	5.3	5.2

V.IV SECUENCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDAD

Al pasar las 12 semanas de inducción de obesidad, se inició con la dieta experimental HFD-CF, la cual se administró por 4 semanas. El peso corporal y el consumo de alimento fueron pesados tres veces por semana en báscula digital (marca Sartorius^{MR}. Modelo AY-5101, 5100g X 0.1g). Para determinar un posible efecto de la CF sobre la saciedad, animales HFD-CF y su grupo control (HFD) fueron sometidos a un análisis del comportamiento de secuencia de saciedad al final (25 días) del experimento del tratamiento (Dos Santos Oliveria, 2011). Dicho análisis consistió en dejar sin alimento a los animales por 2 h, posteriormente se proporcionó una cantidad conocida de alimento y se registró en video (40 minutos, analizados en 8 periodos de 5 minutos cada uno) utilizando la metodología descrita por Vickers, *et al* (1999), adaptada de Halford, *et al* (1998). Se mide el tiempo (segundos) que pasa el animal comiendo (ingiriendo comida, masticando, deglutiendo o sosteniendo comida en patas), acicalándose (movimientos relacionados con su limpieza ya sea con boca o patas) y descansando (posición de descanso o durmiendo), además se pesó el alimento antes y después de cada sesión.

Evaluar en los grupos experimentales los efectos de la administración intraperitoneal de insulina y glucosa exógena sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa. Estas pruebas son conocidas como test de tolerancia a la insulina (TTI) y a la glucosa (TTG), y fueron realizados a los 25 días de tratamiento.

V.V TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA

El TTG, consistió en dejar en ayuno por 6 h (6am-12pm) a los animales, se midió la glucosa basal con glucoméetro (One Touch Ultra 2, de Johnson & Johnson) mediante una gota de sangre obtenida de la cola. Se inyectó glucosa (1g/kg peso corporal i.p.) y se midió glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

V.VI TEST DE TOLERANCIA A INSULINA

El TTI, consistió en dejar por 6 h en ayuno a los animales (6am-12pm), se midió glucosa basal con glucómetro (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson^{MR}) mediante una gota de sangre obtenida de la cola. Se inyectó insulina (1 U/kg peso corporal i.p.) y se midió glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 min.

V.VII INMUNOHISTOQUÍMICA

Determinar por inmunohistoquímica el estado de activación y cantidad de microglía en hipotálamo de ratones obesos alimentados 4 semanas con HFD-CF vs controles. Para ello, al finalizar el periodo de dieta HFD-CF, se inyectó a cada ratón con pentobarbital (100mg/kg peso corporal), se realizó una perfusión cardiaca (insertando en el ventrículo izquierdo una cánula con Solución Salina Amortiguada con Fosfatos –Phosphate Buffered Saline o PBS- y posteriormente con Paraformaldehído al 4% a 4°C, se extrajo el cerebro, se colocó por 24h en paraformaldehído para ser fijado a 4°C y posteriormente se pasó a una solución de Sacarosa al 10% y a las 24 h a una de 30%. Se empleó un criostato para realizar los cortes histológicos a 30µm de espesor en posición coronal para ser inmunoteñidos con antígeno específico de microglía anti-Iba1 (dilución 1:10,000, FUJIFILM Wako Chemicals, USA), seguido de una incubación con un anticuerpo secundario biotinilado y una solución de avidina-biotina (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA).

Los análisis morfológicos fueron realizados en ciego a un aumento de 10X con un sistema de análisis de imagen (Axioskop 40 Zess® microscope, Zeiss). Se delimitó el área de conteo en el núcleo arqueado ($0.0613 \pm 0.0017 \text{ mm}^2$) tanto del lado izquierdo como del derecho en 6 animales por grupo. Se consideraron el número de microglia iba+ totales para después ser clasificadas como “activadas” o “no activadas” según los criterios de Roque *et al* 2016.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

V.VIII PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y PESO TEJIDO ADIPOSEO

Se obtuvo sangre central la cual se dejó coagular y se centrifugó para obtener el suero. Posteriormente se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol, triglicéridos en la Central de Patología Clínica Veterinaria, de modo doble ciego. Al sacrificio, se determinó la adiposidad disecando y pesando los depósitos de masa grasa epididimal y retroperitoneal.

V.IX ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el Programa GraphPad Prism Versión 6.00 (La Jolla, California, EUA). Se obtuvieron media y error estándar de la media (Saleem, Kim *et al.*) de todas las mediciones, para ser evaluadas posteriormente con T- student, análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías. Se consideró como significativo el resultado con $p \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS

VI.I INDUCCIÓN OBESIDAD

Al final de las 12 semanas, tal como se muestra en la **FIG 10**, se obtuvo un aumento del 25.3% peso del grupo de ratones DIO con HFD (60% de kcal provenientes de lípidos) respecto al grupo alimentado con SD (33.33 ± 0.71 y 26.59 ± 0.88 respectivamente, $n=14$ en cada grupo). Se consideraron obesos a los ratones con peso 20% mayor al control (Hariri & Thibault. 2010).

Al concluir las 12 semanas de inducción de obesidad, se repartieron cada grupo en dos grupos más, obteniendo los 4 grupos experimentales siguientes:

- Dieta estándar -SD- ($n=7$)
- Dieta estándar + Harina de nopal -SD-CF- ($n=7$)
- Dieta hiperlipídica -HFD- ($n=7$)
- Dieta hiperlipídica + Harina de nopal -HFD-CF- ($n=7$)

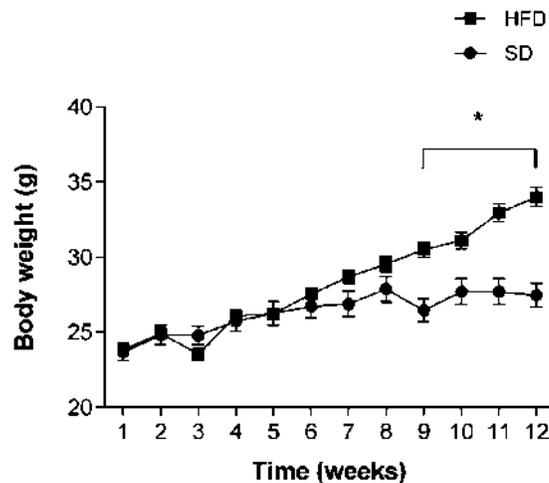


FIG 10. Peso corporal de ratones alimentados con Dieta Estándar (SD) o Dieta Hiperlipídica (HFD), durante 12 semanas. Se analizaron por ANOVA de dos vías, $n=14$ en ambos grupos, $*p<0.05$.

VI.II PESO, CONSUMO DE ALIMENTO Y EFICIENCIA ALIMENTARIA CON HARINA DE NOPAL

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los diferentes grupos -tanto tratados con harina de nopal (CF) como los que tuvieron una dieta sin nopal pero ajustada en fibra (soluble en insoluble)- en peso corporal (inicial y final) y su efecto neto, la eficiencia alimentaria, consumo de alimento (g y kcal), curvas de tolerancia a insulina y glucosa, la secuencia comportamental de saciedad, el conteo de microglía en el núcleo arqueado del hipotálamo, los niveles bioquímicos de glucosa, colesterol, triglicéridos, urea y creatinina, así como la cantidad de tejido adiposo.

En la siguiente tabla (Tabla 3) y **FIG 11**, se muestran el peso en gramos (media±error estándar) en cada grupo y el porcentaje de cambio de peso que tuvieron los ratones durante el tiempo que consumieron harina de nopal (4 semanas).

Tabla 3. Los pesos semanales de cada grupo y el porcentaje de cambio de peso. (n=7 en cada grupo) analizado con ANOVA de dos vías y un *posthoc* de Bonferroni, *p<0.05 vs SD. Grupos SD=Dieta Estándar, SD-CF=Dieta estándar + Harina de Nopal, HFD= Dieta Hiperlipídica y HFD-CF= Dieta Hiperlipídica + Harina de Nopal.

Grupo	Peso inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	% Cambio de peso
SD	27.1±1.50	26.22±1.43	26.18±1.57	28.18±1.40	30.07±1.78	+10.9%
SD-CF	28.65±0.76	25.85±0.51	24.87±0.59	27.21±0.88	29.51±0.93	+3.0%
HFD	34.02±1.53*	34.54±1.65*	34.20±1.60*	35.38±1.70*	36.57±1.90*	+7.49%
HFD-CF	33.55±0.85*	31.41±0.84*	29.75±0.66	29.75±0.64	29.6±0.75	-11.77%

La eficiencia alimentaria es un valor que hace referencia a la cantidad de kcal del alimento consumido aprovechadas por el organismo para almacenarlas como peso corporal. Se obtiene mediante la fórmula: $(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / (\text{Kcal consumidas}) \times 100$.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

En seguida se muestran la gráfica de Eficiencia Alimentaria que se obtuvo al finalizar las 4 semanas de tratamiento con Harina de Nopal (CF). En donde se observa como el grupo HFD tuvo un mayor aprovechamiento calórico para aumentar de peso, no así el grupo HFD-CF que normalizó su eficiencia y gastaba la misma cantidad de energía que consumía.

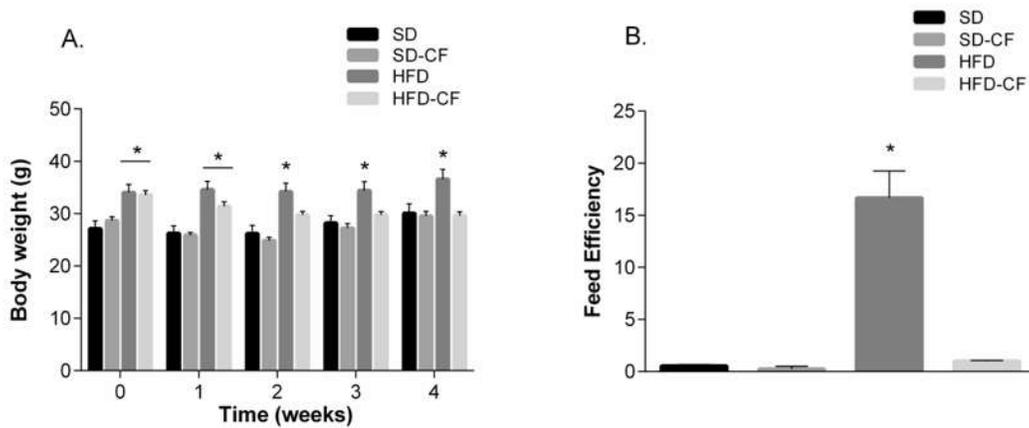


FIG 11. A. Peso corporal semanal y B. Eficiencia Alimentaria de ratones alimentados con Dieta Estándar (SD), Dieta Estándar + Harina de Nopal (SD-CF), Dieta Hiperlipídica (HFD) y Dieta Hiperlipídica + Harina de Nopal (HFD-CF). Peso inicial vs peso final (4 semanas después). Se analizaron con ANOVA dos vías y pos hoc Bonferroni, n=7 en cada grupo, *p<0.05 vs SD.

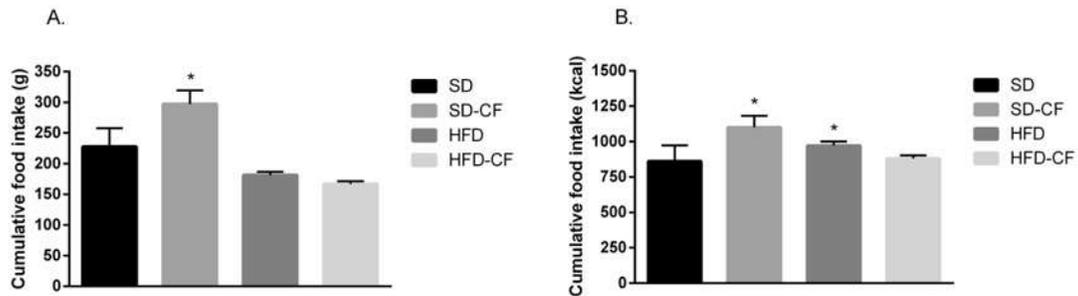


FIG 12. Consumo acumulado de alimento en: A. gramos y B. kilocalorías de los diferentes grupos Dieta Estándar (SD), Dieta Estándar + Harina de Nopal (SD-CF), Dieta Hiperlipídica (HFD) y Dieta Hiperlipídica + Harina de Nopal (HFD-CF). Se analizaron con ANOVA y pos hoc Bonferroni, n=7 en cada grupo, *p<0.05 vs SD.

VI.III SECUENCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDAD

La secuencia comportamental de saciedad permite identificar el proceso fisiológico normal del comportamiento alimenticio. Este comienza por un periodo de consumo de alimento, luego el animal pasa tiempo acicalándose (lamiéndose y/o rascándose) y finalmente descansa/duerme. Dicho comportamiento es cíclico, es decir, se repite a lo largo del día varias veces.

Los resultados muestran que el grupo HFD-CF tuvo un punto de saciedad más temprano (en el periodo 1.9) al igual que HFD en el 1.8, a comparación de los otros grupos SD fue 3, SD-CF fue en el 6.6. Este punto de saciedad se refiere al momento en que el animal deja de comer y descansa, indicando que está satisfecha su ingesta de comida. La cantidad de comida consumida (en gramos y kilocalorías) durante esta evaluación fue de $0.45 \pm 0.12\text{g}$ y $1.70 \pm 0.44\text{kcal}$ para el grupo SD, $0.38 \pm 0.06\text{g}$ y $1.42 \pm 0.22\text{kcal}$ para SD-CF, $0.12 \pm 0.02\text{g}^*$ y $0.63 \pm 0.09\text{kcal}^*$ para HFD, para el grupo HFD-CF fue $0.50 \pm 0.13\text{g}$ y $2.64 \pm 0.67\text{kcal}$, se indica con un asterisco ($*p < 0.05$) los resultados que fueron significativamente diferentes al grupo SD. A continuación, se muestran las gráficas que se obtuvieron para cada grupo, **FIG 13**.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

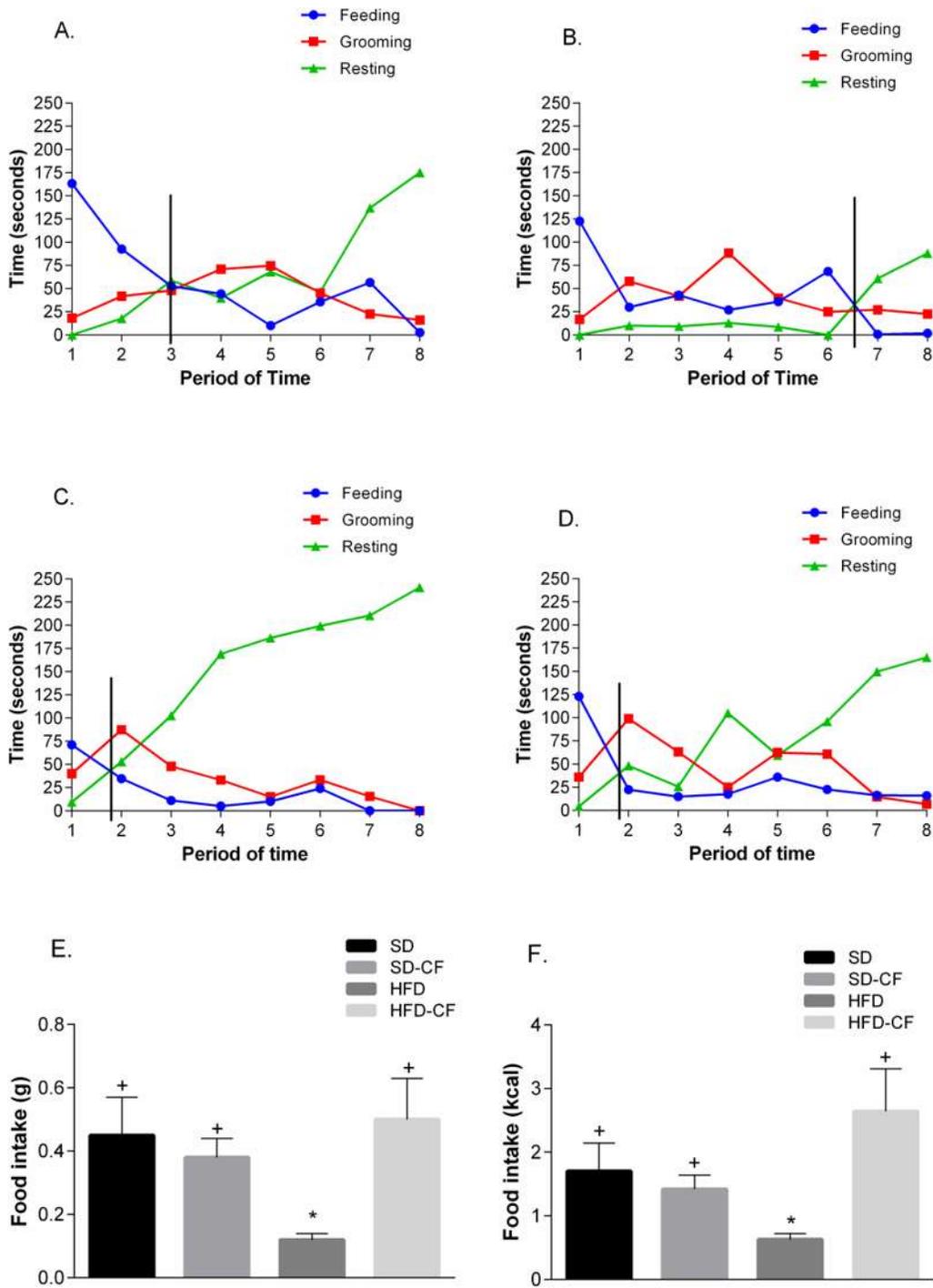


FIG 13. Secuencia comportamental de Sacidad. A. Grupo SD, B. SD-CF, C. HFD, D. HFD-CF, E. Consumo de alimento en gramos y F. Consumo de alimento de kilocalorías (analizado con ANOVA de una vía, * $p < 0.05$ vs SD, + $p < 0.05$ vs HFD).

VI.IV TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA E INSULINA

Como parte de las alteraciones metabólicas desarrolladas de la mano de la obesidad, se encuentran la intolerancia a la glucosa y la insensibilidad a la insulina, que pueden desencadenar en Diabetes Mellitus tipo 2. A continuación se muestran las curvas de Tolerancia a Glucosa e insulina, así como el Área Bajo la Curva obtenidas de los diferentes grupos **FIG 14**.

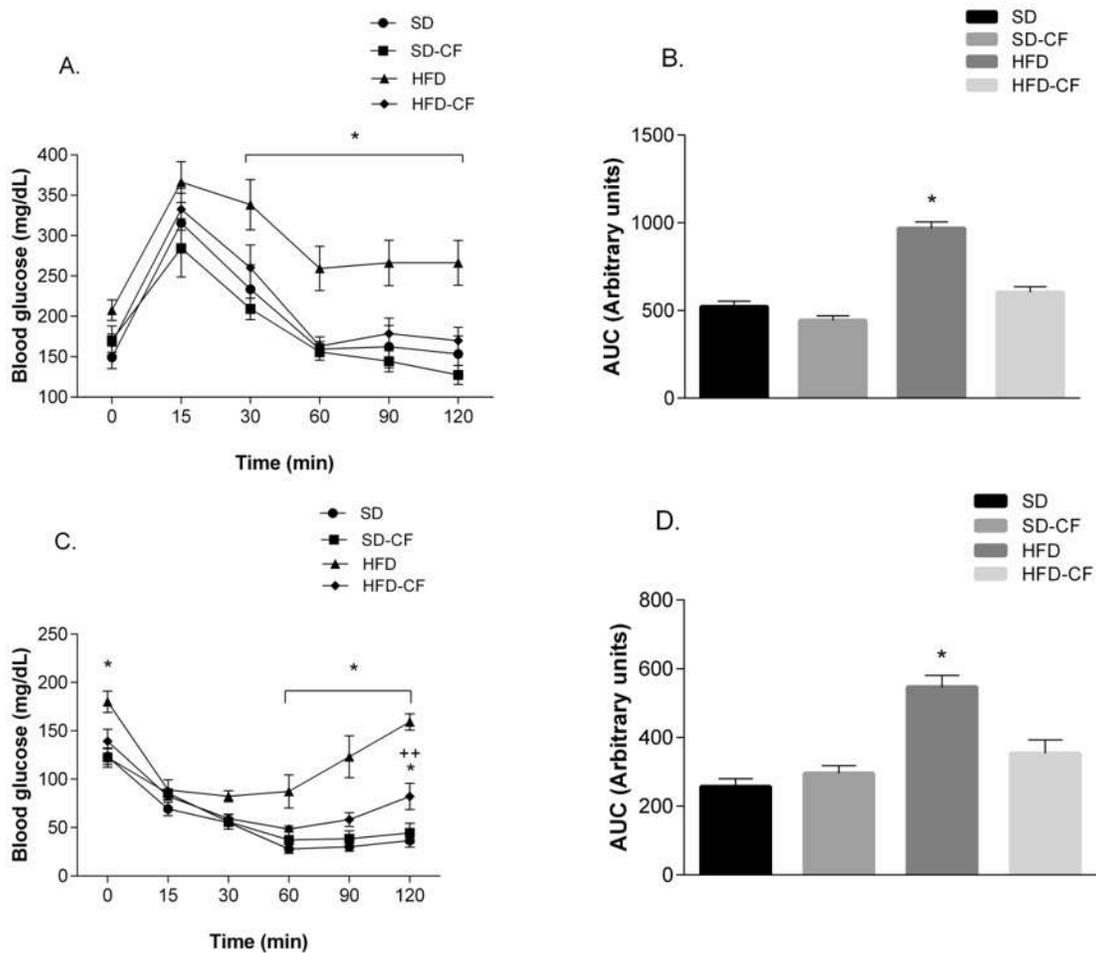


FIG 14. A. Curva de Tolerancia a Glucosa y C. Tolerancia a insulina con Área Bajo la Curva para cada una (B y D). Los grupos SD, SD-CF, HFD y HFD-CF cada uno con una n=7. Se muestra el análisis de ANOVA dos vías *p<0.05 vs SD, *p<0.05 vs HFD.

VI.V INMUNOHISTOQUÍMICA

Las pruebas de inmunohistoquímica, nos permitieron determinar la densidad (células/mm²) y estado de activación de la célula inmune del sistema nervioso central, la microglía. Ésta, al presentarse ante algún estímulo nocivo aumenta su tamaño y cambia de forma (de una tipo estrella a otra tipo ameboide). Así, se pueden detectar zonas que fueron expuestas a un insulto y se desarrolló inflamación como se observa en las micrografías (**FIG 15 A-D**).

Los resultados de esta prueba indican que la densidad de microglia (células/mm²) fue estadísticamente igual en los grupos SD (1003.31 ± 77.94) y SD-CF (986.06 ± 114.09). El grupo HFD aumentó significativamente su densidad (1431.48 ± 82.16 p=0.04) en comparación al grupo SD y el tratamiento con CF restauró la densidad a niveles comparables al estándar (SD) (HFD-CF: 1016.02 ± 93.76) como se muestra en la **FIG 15 (E)**. La presencia de células activadas (caracterizadas por un mayor tamaño y una forma más redondeada), fue contabilizada del total de células microgliales presentes en el área de interés (núcleo Arqueado). El grupo HFD presentó un aumento significativo de células activadas (p<0.0001 vs SD) y el tratamiento con nopal mostró una reducción significativa (p=0.01 vs HFD) sin embargo, no alcanzó a ser similar a los grupos SD y SD-CF (mostrando diferencia con estos grupos también) (p=0.046).

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

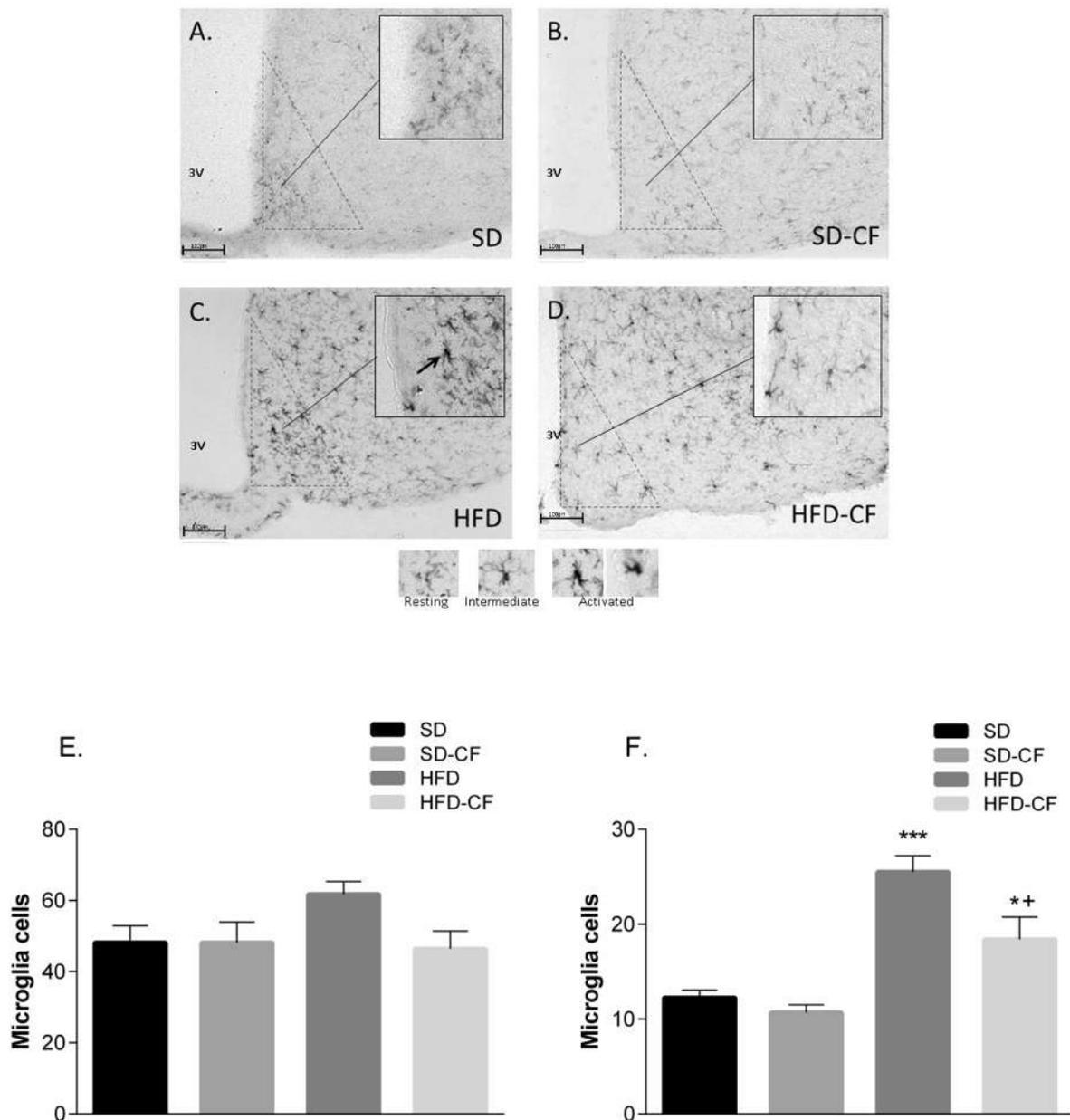


FIG 15. Micrografías de cortes de cerebro de ratón, localizando hipotálamo y el núcleo arqueado (Arc), se toma como referencia el tercer ventrículo. A. Grupo SD (dieta estándar), B. Grupo SD-CF (dieta estándar con harina de nopal), C. Grupo HFD (dieta hiperlipídica) y D. HFD-CF (dieta hiperlipídica con harina de nopal). E. Densidad (células totales/mm²) y F. Células activadas/mm². Analizados con ANOVA una vía con pos hoc Bonferroni, *p<0.05 vs SD, **p<0.05 vs HFD.

VI.VI BIOQUÍMICA

A continuación (**FIG 16 A-E**) se muestran los resultados obtenidos de diversos parámetros bioquímicos producto del metabolismo.

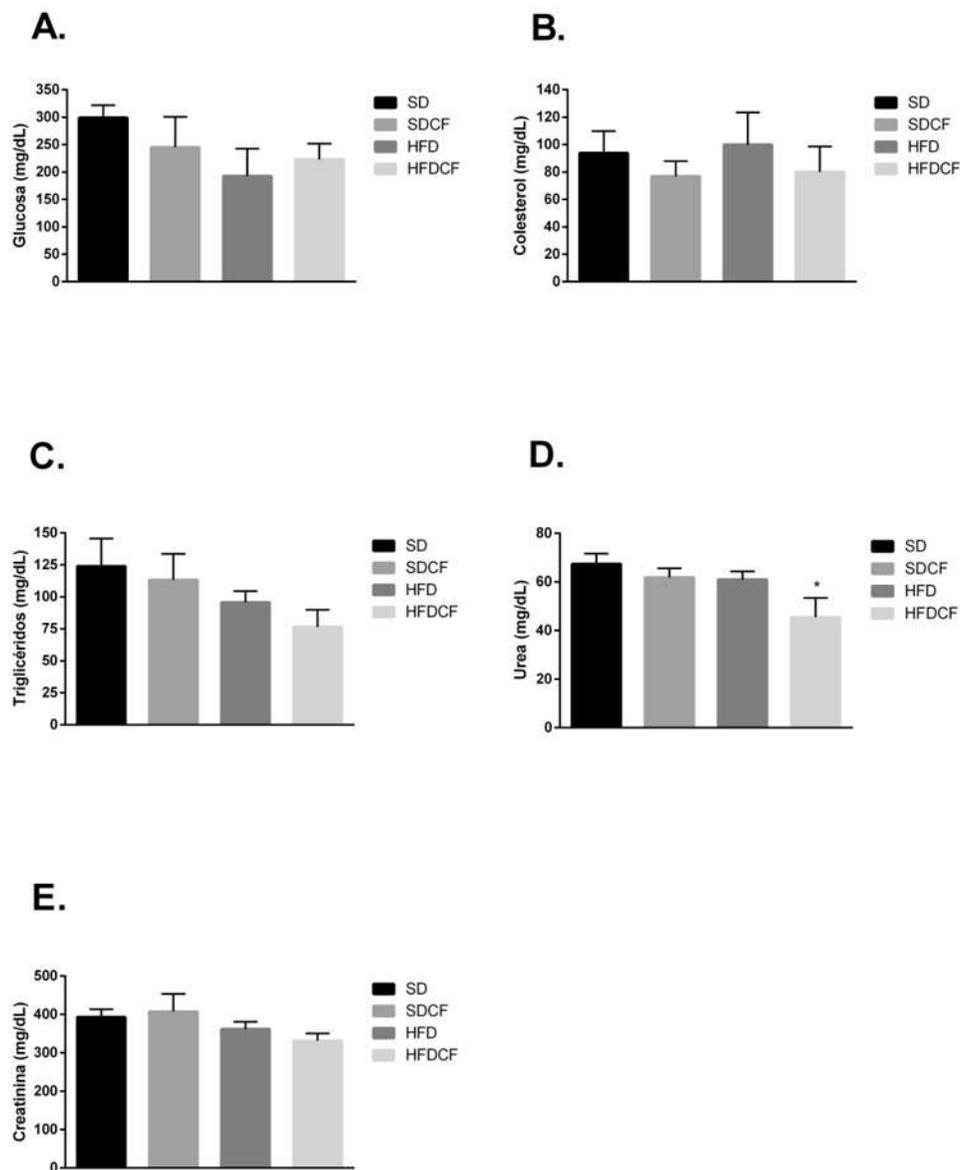


FIG 16. Parámetros bioquímicos en los grupos SD, SDCF, HFD, HFDCF. Se muestran en las figuras A niveles de glucosa, B de colesterol, C de triglicéridos, D de urea y E de creatinina (mg/dL). Analizados con ANOVA de una vía, con *p<0.05 vs SD.

VI.VII PESO TEJIDO ADIPOSO

Los depósitos de tejido adiposo epididimal y retroperitoneal, son considerados como parte de las reservas de tejido adiposo blanco, las cuales funcionan como depósitos de energía y para la protección de órganos (Mann, *et al.*, 2014). Se muestran las cantidades obtenidas en los diferentes grupos en la **FIG 17**. Se puede observar que fueron normalizados los pesos del tejido adiposo en los animales que iniciaron como obesos y recibieron CF (Epididimal $0.88\pm 0.07\text{g}$ y Retroperitoneal $174.25\pm 22.2\text{mg}$ $p>0.99$ vs SD). No así en los animales que tenían una HFD (Epididimal = $2.09\pm 2.9\text{g}$ y Retroperitoneal = $587.67\pm 101.91\text{mg}$ $p=0.002$ y $p<0.0001$ vs SD).

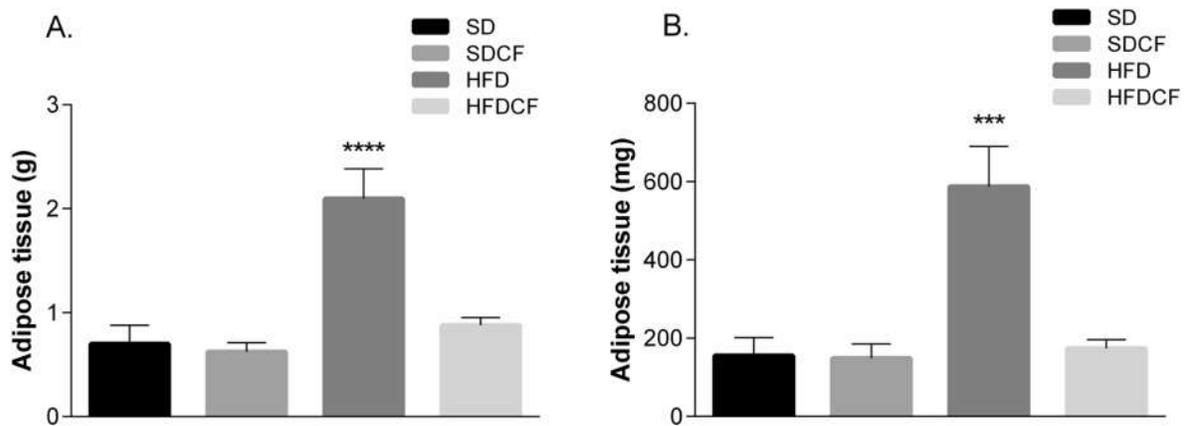


FIG 17. Peso tejido adiposo A. epididimal y B. retroperitoneal. Los grupos SD, SD-CF, HFD y HFD-CF cada uno con una $n=7$. Se muestra el análisis de comparaciones múltiples (ANOVA de una vía), $*p<0.05$ vs SD.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran un efecto reductor en cuanto al peso corporal en ratones obesos tratados con harina de nopal (HFD-CF), al mostrar una disminución de peso ($p=0.0009$) y cantidad de tejido adiposo ($p=0.0003$) de manera significativa. Además, se observó una mayor eficiencia alimentaria en dicho grupo, ya que aunque consumían la misma cantidad de alimento (tanto en gramos como en kcal) que el grupo obeso sin harina de nopal (HFD), no mostraron la misma capacidad de generar peso corporal a partir de las kcal ingeridas igual que ellos. Los grupos normopesos (SD y SD-CF) no mostraron diferencias entre sí, lo que indica que el consumo *per-se* de harina de nopal no afecta la absorción nutrimental. Los grupos que no recibieron CF tuvieron un ajuste en la cantidad de fibra (soluble e insoluble) para que fueran equivalentes. Lo que nos confirma que el efecto obtenido no pudo ser causado por la fibra que contiene el nopal.

El consumo de alimento en la Secuencia Comportamental de Sacidad mostró una ingesta significativamente menor en el grupo HFD respecto a SD ($p=0.01$); el grupo que recibió la misma clase de dieta alta en grasa, pero adicionada en nopal tuvo un consumo igual –g y kcal- al grupo control SD. A su vez, al alcanzar un estado de sacidad más temprano que los grupos con una dieta normolipídica, indica una optimización en la economía del metabolismo energético promoviendo un consumo mayor, pero a su vez aumentando el gasto energético, posiblemente aumentando la actividad locomotora y/o la termogénica. De acuerdo con estudios realizados, al estimular el sistema de melanocortina en el arqueado por acción de neuronas POMC (Proopiomelanocortina), se promueve dicho gasto energético (Gautron, *et al.* 2015). Dicha capacidad se ha observado en otros compuestos naturales derivados del té verde, el ginseng y la canela (Khare *et al.*, 2016; Okuda *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Además, estudios han mostrado que componentes dietarios no energéticos como micronutrientes y componentes no-nutrimientales (como calcio, vitaminas, fibra y compuestos fenólicos) son capaces de modular la sacidad al promover el aumento de hormonas anorexigenicas (PYY) y/o participando en la síntesis de péptidos y neurotransmisores que controlan la ingesta de alimento (Tremblay, *et al* 2015).

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

La prueba conductual realizada en este estudio muestra que la adición de CF no altero el punto de saciedad en el grupo HFD-CF respecto a HFD (periodo 1.9 y 1.8, respectivamente); pero si tuvo un efecto en el grupo SDCF respecto a SD (periodos 6.6 y 3, respectivamente). Se observaron otros efectos interesantes para el estudio como un mayor interés por descansar en el grupo HFD respecto a los otros grupos, que tuvieron una mayor movilidad lo que concuerda con el estudio de Keeley *et al* (2019), donde usaron un modelo de obesidad para medir actividad locomotora respecto a un modelo transgénico de FGF1.

Diversos estudios muestran que dentro de los componentes dietarios que pueden influir en la saciedad están las proteínas, los carbohidratos y en menor proporción las grasas, pero también componentes de los alimentos considerados como no-nutrientes y otros micronutrientes. Algunos ejemplos de ellos son el calcio, algunas vitaminas, la fibra y compuestos fenólicos. Se ha demostrado que actúan aumentando niveles de hormonas promotoras de saciedad como PYY y/o participando en la síntesis de péptidos y neurotransmisores que controlan la ingesta de alimentos (Temblay & Bellisle, 2015). *Opuntia ficus-indica* resulta ser rico en fibra (9.8g soluble y 54.45g insoluble/100g de materia seca), polifenoles (2.69g equivalentes de Ácido Gálico/100g de materia seca), calcio y vitaminas del complejo B y C, principalmente (Bensadón, *et al.* 2010).

Parte de las alteraciones derivadas de la obesidad son la intolerancia a glucosa y menor sensibilidad a insulina que se relacionan con la señalización de la proteína cinasa Akt y otras vías como defectos en el receptor de insulina o en IRS (*Insulin Receptor Substrate*) (Czech, 2017). Sin embargo, bajo el tratamiento de harina de nopal, ambas alteraciones se normalizaron, probando un efecto correctivo en el metabolismo de glucosa, la cual se encuentra dentro de las funciones que modula el hipotálamo de manera central (De Souza, *et al.* 2005) y el páncreas, hígado, músculo y tejido adiposo en la periferia. Varios estudios que involucran obesidad, diabetes y tratamientos con *Opuntia spp* probaron mejoras en la integridad de islotes pancreáticos, proliferación de células β e inducción en la secreción de insulina; además de funcionar como

antioxidante, antiinflamatorio y disminuyendo lípidos circulantes al mostrar un ratio mayor de pAkt:Akt, mayor expresión del transportador de glucosa 2 (GLUT2) y de PPAR γ , lo que se tradujo en un mayor gasto de energía, disminuyó el tamaño de los adipocitos, aumentó la fosforilación de ISR y la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos (Rodríguez-Rodríguez, *et al.* 2015; Angulo-Bejarano, *et al.* 2014).

Dado que la microglía (densidad y activación) en el núcleo arqueado del hipotálamo se ve alterada con una dieta hiperlipídica y está relacionada al desarrollo de obesidad, nos dimos a la tarea de evaluar estos parámetros con una dieta adicionada con nopal.

Los datos obtenidos en este trabajo indican una tendencia a presentar menor proliferación (densidad= células/mm²) y activación de microglía en ratones obesos que consumieron una dieta con nopal (HFD-CF) vs aquellos que no la consumieron (HFD). Estudios han mostrado que compuestos en el nopal son capaces de inhibir la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) *in vitro* (Lee, *et al.* 2006), la cual está directamente relacionada con procesos inflamatorios debido a la capacidad que tiene de formar un potente oxidante, el peroxinitrito (Calabrese, *et al.* 2007). Cabe mencionar que dicha inflamación se ha relacionado con la pérdida de neuronas POMC, encargadas de promover el gasto de energía en el núcleo arqueado (Berkseth, *et al.* 2014).

Además al ser rico en polifenoles como la quercetina y el kaempferol, puede regular el metabolismo energético estimulando la hormona tiroidea (T3) mediante el aumento en cantidad y duración de la D2 vía proteína cinasa A (Da Silva, *et al.* 2007), pueden también disminuir la absorción de grasa proveniente de la dieta, disminuir la inflamación, estimular la termogénesis simpática y, como se mencionó antes, modular neuropéptidos involucrados en la ingesta de alimento (Panickar, 2013; Magrone *et al.* 2013; Mohamed 2014).

Los resultados obtenidos del análisis bioquímico fueron, hasta el momento, no concluyentes. El análisis estadístico de los diversos parámetros (glucosa, colesterol, triglicéridos, urea y creatinina) únicamente mostraron diferencia significativa en Urea en

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

el grupo HFDCF vs SD. Éste es un parámetro que indica función renal y que suele alterarse en la obesidad debido al estrés oxidativo y la inflamación (Cheng, *et al.* 2019). Los demás parámetros pudieron verse alterados por diversos factores, inclusive su manejo, pese a las medidas tomadas.

Estudios similares en los que se evaluó el efecto de compuestos polifenólicos en inflamación hipotalámica inducida por una dieta alta en grasa, observaron una reducción en marcadores inflamatorios como interleucinas 6 (IL-6) y IL-1 β así como en moduladores negativos de la señalización de leptina (SOCS 3 y PTP1B), que se traducen en una reducción de peso corporal, depósitos de masa grasa, ingesta de alimento y una mejora en tolerancia a insulina, glucosa y leptina (Okuda, *et al* 2014; Wu, *et al* 2014;Khare, *et al* 2016).

VIII. CONCLUSIONES

En conclusión, el tratamiento con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) mostró ser eficaz para corregir diversas alteraciones dadas por la obesidad. De las que se pueden destacar la normalización de peso corporal, mediante una optimización en el consumo/gasto de energía. Mejora significativa en el metabolismo de glucosa al mejorar la sensibilidad a insulina y la tolerancia a glucosa, propias de las alteraciones que acompañan a la obesidad. Se mostró, además, que el consumo de harina de nopal, a pesar de acompañarse con una dieta alta en grasas saturadas promueve el gasto energético por medio de un aumento en la actividad locomotora y termogénesis, disminuyó el volumen de los depósitos de masa grasa y previene daño de la función renal.

Principalmente, se demostró que la ingesta de *Opuntia* es capaz de alcanzar el SNC y modular el proceso inflamatorio que se desencadena con la ingesta de una dieta hiperlipídica. Al disminuir dicha inflamación en el centro modulador del balance energético, el núcleo arqueado del hipotálamo, se reestableció su funcionamiento normal y fue capaz de corregir las alteraciones que se presentaron con su inflamación.

IX. PERSPECTIVAS

Como perspectivas a partir de este trabajo sería conveniente realizar nuevamente los análisis bioquímicos; falta realizar valoraciones moleculares de expresión de genes en

el hipotálamo relacionados al balance energético e inflamación con el tratamiento de *Opuntia*. Además, se puede complementar con diversas pruebas conductuales, evaluaciones de microbiota en sistema digestivo e incluso, valorar en ratones del género femenino. Enriquecer este trabajo permitirá establecer otros mecanismos dañados por una HFD y a su vez, descubrir mecanismos implicados en el efecto benéfico de *Opuntia ficus-indica*, ya sea de manera completa o haciendo extracciones.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N Joan, Rönnbäck, Lars, & Hansson, Elisabeth. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *NATURE REVIEWS| NEUROSCIENCE*, 7, 41.
- André, C., O. Guzman-Quevedo, C. Rey, J. Rémus-Borel, S. Clark, A. Castellanos-Jankiewicz, E. Ladeveze, T. Leste-Lasserre, A. Nadjar and D. N. Arous (2016). "Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation." *Diabetes*: db160586.
- Angulo-Bejarano PI, Martínez-Cruz O, Paredes-López O (2014) Phytochemical content, nutraceutical potential and biotechnological applications of an ancient Mexican plant: nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Curr Nutr Food Sci*. 10(3):196-217.
- Arble, Deanna M, & Sandoval, Darleen A. (2013). CNS control of glucose metabolism: response to environmental challenges. *Frontiers Neuroscience*, 7, 20.
- Barja-Fernández, S., C. Folgueira, C. Castelao, R. Leis, F. F. Casanueva and L. M. Seoane (2015). "Peripheral signals mediate the beneficial effects of gastric surgery in obesity." *Gastroenterology research and practice* 2015.
- Benjamin, Sailas, & Spener, Friedrich. (2009). Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition & Metabolism*, 6(1), 1.
- Bensadón, Sara, Hervert-Hernández, Deisy, Sáyago-Ayerdi, Sonia G, & Goñi, Isabel. (2010). By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 210-216.
- Block, Michelle L, Zecca, Luigi, & Hong, Jau-Shyong. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *NATURE REVIEWS| NEUROSCIENCE*, 8, 57.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., & Stella, A. M. G. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 766.
- Catania, Anna, Lonati, Caterina, Sordi, Andrea, Carlin, Andrea, Leonardi, Patrizia, & Gatti, Stefano. (2010). The melanocortin system in control of inflammation. *The Scientific World Journal*, 10, 1840-1853.

- Cheng, K., Song, Z., Chen, Y., Li, S., Zhang, Y., Zhang, H., ... & Wang, T. (2019). Resveratrol protects against renal damage via attenuation of inflammation and oxidative stress in high-fat-diet-induced obese mice. *Inflammation*, 42(3), 937-945.
- Clegg, Deborah J, Gotoh, Koro, Kemp, Christopher, Wortman, Matthew D, Benoit, Stephen C, Brown, Lynda M, . . . Woods, Stephen C. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiology & Behavior*, 103(1), 10-16.
- Cota, Daniela, Proulx, Karine, & Seeley, Randy J. (2007). The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology*, 132(6), 2158-2168.
- Cota, Daniela, Proulx, Karine, Smith, Kathi A Blake, Kozma, Sara C, Thomas, George, Woods, Stephen C, & Seeley, Randy J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 312(5775), 927-930.
- Cysneiros, G. F., Gonzalez, J. L. C., Marcelino da Silva, A. A., Cavalcante, T. C. F., Quevedo, O. G., Lira, E. C., ... & Flores, H. E. F. M. (2018). The addition of cactus flour (*Opuntia ficus indica*) to the Western-style diet attenuates the onset of metabolic disorders in rats. *Nutrition & Food Science*.
- Czech MP. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med*. 23(7):804.
- D Archivio, Massimo, Filesi, Carmela, Di Benedetto, Roberta, Gargiulo, Raffaella, Giovannini, Claudio, & Masella, Roberta. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- Da-Silva WS, Harney JW, Kim BW, Li J, Bianco SD, Crescenzi A, Christoffolete MA, Huang SA, Bianco AC (2007) The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. *Diabetes*, 56(3):767-776.
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., ... & Velloso, L. A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192-4199.
- Dorfman, M D, & Thaler, J P. (2015). Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 22(5), 325-330.
- Dos Santos Oliveria, L., Lopes de Souza, S., Manhães-De-Castro, R. . (2011). Behavioral Satiety Sequence: an experimental model for studying feeding behavior. *Revista de Nutrição*, 24(4), 10.
- Doyon, Maurice, & Labrecque, JoAnne. (2008). Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal*, 110(11), 1133-1149.
- El-Haschimi, Karim, Pierroz, Dominique D, Hileman, Stanley M, Bjørbæk, Christian, & Flier, Jeffrey S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(12), 1827-1832.
- El-Mostafa, Karym, El Kharrassi, Youssef, Badreddine, Asmaa, Andreoletti, Pierre, Vamecq, Joseph, El Kebbaj, M, . . . Cherkaoui-Malki, Mustapha. (2014). Nopal

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

- cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.
- Feugang, Jean Magloire, Konarski, Patricia, Zou, Daming, Stintzing, Florian Conrad, & Zou, Changping. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci*, 11(1), 2574-2589.
- Flier, Jeffrey S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116(2), 337-350.
- Frederich, Robert C, Hamann, Andreas, Anderson, Stephen, Löllmann, Bettina, Lowell, Bradford B, & Flier, Jeffrey S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, 1(12), 1311-1314.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, . . . M., Hernández-Ávila. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública
- Halford JC, Wanninayake SC, Blundell JE (1998) Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol Biochem Behav.* 61(2):159-168.
- Halford, Jason CG, & Harrold, Joanne A. (2012). Satiety-enhancing products for appetite control: science and regulation of functional foods for weight management. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(02), 350-362.
- Hariri N & Thibault L (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23(2), 270-299.
- Hill, James O, & Peters, John C. (2002). Biomarkers and functional foods for obesity and diabetes. *British Journal of Nutrition*, 88(S2), S213-S218.
- Hill, James O, Wyatt, Holly R, Reed, George W, & Peters, John C. (2003). Obesity and the environment: where do we go from here? *Science*, 299(5608), 853-855.
- Howard, Jane K, & Flier, Jeffrey S. (2006). Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17(9), 365-371.
- INEGI. (2013). Principales causas de mortalidad *Estadísticas Demográficas 2011*.
- Keeley, T., Kirov, A., Koh, W. Y., Demambro, V., Bergquist, I., Cotter, J., ... & Rosen, C. J. (2019). Resistance to visceral obesity is associated with increased locomotion in mice expressing an endothelial cell-specific fibroblast growth factor 1 transgene. *Physiological reports*, 7(7), e14034.
- Khare, Pragyanshu, Jagtap, Sneha, Jain, Yachna, Baboota, Ritesh K, Mangal, Priyanka, Boparai, Ravneet K, . . . Kondepudi, Kanthi K. (2016). Cinnamaldehyde supplementation prevents fasting-induced hyperphagia, lipid accumulation, and inflammation in high-fat diet-fed mice. *BioFactors*, 42(2), 201-211.
- Lam, Tony KT, Gutierrez-Juarez, Roger, Poci, Alessandro, & Rossetti, Luciano. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science*, 309(5736), 943-947.
- Lau, Francis C, Bielinski, Donna F, & Joseph, James A. (2007). Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

- lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 85(5), 1010-1017.
- Lee, Ming Hong, Kim, Jae Yeon, Yoon, Jeong Hoon, Lim, Hyo Jin, Kim, Tae Hee, Jin, Changbae, . . . Ryu, JaeHa. (2006). Inhibition of nitric oxide synthase expression in activated microglia and peroxynitrite scavenging activity by *Opuntia ficus indica* var. saboten. *Phytotherapy Research*, 20(9), 742-747.
- Magrone T, Perez de Heredia F, Jirillo E, Morabito G, Marcos A, Serafini M (2013) Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases. *Can J Physiol Pharmacol*. 91(6):387-396.
- Mann, A., Thompson, A., Robbins, N., & Blomkalns, A. L. (2014). Localization, identification, and excision of murine adipose depots. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (94).
- Milanski, Marciane, Degasperi, Giovanna, Coope, Andressa, Morari, Joseane, Denis, Raphael, Cintra, Dennys E, . . . Takahashi, Hilton K. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of Neuroscience*, 29(2), 359-370.
- Mingrone, G., S. Panunzi, A. De Gaetano, C. Guidone, A. Iaconelli, G. Nanni, M. Castagneto, S. Bornstein and F. Rubino (2015). "Bariatric–metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial." *The Lancet* 386(9997): 964-973.
- Mohamed, Suhaila. (2014). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology*, 35(2), 114-128.
- Mulas, M. (1992). *Medicinal properties and yield possibilities of the prickly pear (Opuntia spp.) in the Mediterranean environment*. Paper presented at the WOCMAP I-Medicinal and Aromatic Plants Conference: part 3 of 4 331.
- Okuda, Marcos H, Zemdegs, Juliane CS, de Santana, Aline A, Santamarina, Aline B, Moreno, Mayara F, Hachul, Ana CL, . . . Oyama, Lila M. (2014). Green tea extract improves high fat diet-induced hypothalamic inflammation, without affecting the serotonergic system. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(10), 1084-1089.
- Panickar KS (2013) Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity. *Mol Nutr Food Res*. 57(1):34-47.
- Ramnanan, Christopher J, Saraswathi, Viswanathan, Smith, Marta S, Donahue, E Patrick, Farmer, Ben, Farmer, Tiffany D, . . . Mari, Andrea. (2011). Brain insulin action augments hepatic glycogen synthesis without suppressing glucose production or gluconeogenesis in dogs. *The Journal of clinical investigation*, 121(9), 0-0.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

- Reeves, P. G., F. H. Nielsen and G. C. Fahey Jr (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, Oxford University Press.
- Riccardi, Gabriele, Capaldo, Brunella, & Vaccaro, Olga. (2005). Functional foods in the management of obesity and type 2 diabetes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 8(6), 630-635.
- Rodríguez-Rodríguez C, Torres N, Gutiérrez-Urbe JA *et al.* (2015) The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food Func* 6(3), 805-815.
- Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L (2016) Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun*. 55:39-48.
- Saleem, M., H. J. Kim, C. K. Han, C. Jin and Y. S. Lee (2006). "Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*." *Phytochemistry* 67(13): 1390-1394.
- Seidell, Jacob C., & Halberstadt, Jutka. (2016). Obesity: The obesity epidemic in the USA [mdash] no end in sight? *Nat Rev Endocrinol*, advance online publication. doi: 10.1038/nrendo.2016.121
- Siro, Istvan, Kapolna, Emese, Kapolna, Beata, & Lugasi, Andrea. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Spiegelman, Bruce M, & Flier, Jeffrey S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531-543.
- Sun, Yuxiang, Butte, Nancy F, Garcia, Jose M, & Smith, Roy G. (2008). Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology*, 149(2), 843-850.
- Thaler, Joshua P, Guyenet, Stephan J, Dorfman, Mauricio D, Wisse, Brent E, & Schwartz, Michael W. (2013). Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes*, 62(8), 2629-2634.
- Thaler, Joshua P, Yi, Chun-Xia, Schur, Ellen A, Guyenet, Stephan J, Hwang, Bang H, Dietrich, Marcelo O, . . . Maravilla, Kenneth R. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 153-162.
- Tremblay A, Bellisle F (2015) Nutrients, satiety, and control of energy intake. *Appl Physiol Nutr Metab*. 40(10):971-979.
- Tsao, Rong. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Urquiaga, Ines, & Leighton, Federico. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33(2), 55-64.
- Valencia-Sandoval, Karina, Brambila-Paz, José de J, & Mora-Flores, José S. (2010). Evaluación del nopal verdura como alimento funcional mediante opciones reales. *Agrociencia*, 44(8), 955-963.

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

- Vickers SP, Clifton PG, Dourish CT, Tecott LH (1999) Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Psychopharmacol.* 143(3):309-314.
- Vogt, Merly C, & Brüning, Jens C. (2013). CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism—from embryo to old age. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(2), 76-84.
- Wu, Y., Yu, Y., Szabo, A., Han, M., & Huang, X. F. (2014). Central inflammation and leptin resistance are attenuated by ginsenoside Rb1 treatment in obese mice fed a high-fat diet. *PloS one*, 9(3).

XI. ANEXOS

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón



A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se establece **LA CERTIFICACIÓN DEL NOMBRE CIENTÍFICO Y UBICACIÓN TAXONÓMICA** de la planta conocida como "Nopal Negro" cuyos ejemplares botánicos estaban constituidos por cladodios, en fresco, los cuales fueron entregados por M.C. Mercedes Victoria Urquiza Martínez, al personal del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con fecha 16 de enero 2017. El número de folio para el herbario EBUM corresponde a **27587**.

La determinación taxonómica a especie se realizó en base a las claves taxonómicas de:

Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Volumen I. Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp 741

Para las categorías taxonómicas nos basamos en la base de datos de la página web TROPICOS del Missouri Botanical Garden hasta el taxón de FAMILIA y para categorías inferiores se tomó los taxa de Bravo-Hollis, 1978:

Reino: Plantae
División: Magnoliidae
Clase: Equisetopsida C. Agardh
Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden: Caryophyllanae Takht.
Orden: Caryophyllales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
Familia: Cactaceae Juss.
Subfamilia: Opuntioideae
Tribu: Opuntieae
Género: **Opuntia** Mill.
Subgénero: Opuntia
Serie: Ficus-indicae
Especie: **Opuntia ficus indica**



De acuerdo con la revisión de las siguientes bases de datos disponibles en línea:

- Tropicos.org: Missouri Botanical Garden. 09 Feb 2017
<http://www.tropicos.org/Name/5108253> © 2017 Missouri Botanical Garden
- The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón



Se confirma que: ***Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. es un nombre aceptado.**

Nota: Esta especie ha estado sometida a procesos de domesticación, por lo que varios caracteres en estado silvestre han sido modificados en ejemplares que se utilizan en cultivos, para robustecer lo anterior se consultaron otras referencias bibliográficas para definir los caracteres de la especie:

- Reyes-Agüero J. A., Aguirre-Rivera J. R. y Héctor M. Hernández. 2005. **NOTAS SISTEMÁTICAS Y UNA DESCRIPCIÓN DETALLADA DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. (CACTACEAE).** Agrociencia, vol. 39, núm. 4, pp. 395-408.

Sin otro en particular nos despedimos de usted.

Atentamente



M.C. Mariene Gómez Peralta
Coordinadora General del Herbario EBUM
Facultad de Biología, UMSNH

Biól. Rosa Isabel Fuentes Chávez
Curadora de la Colección de Plantas Vasculares
Herbario EBUM, Facultad de Biología
UMSNH

Morelia, Michoacán a 13 de Febrero del 2017

Estudio del efecto antiobesigénico y antiinflamatorio de una dieta adicionada con harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la regulación hipotalámica del metabolismo energético en un modelo de ratón

DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat - Blue

58Y1

DESCRIPTION

Diet Induced Obesity Rodent Purified Diet with 60% Energy From Fat - Dyed Blue is based onAIN-75A Semi-Purified Diet, Rat or Mouse 5800-B. See Van Hest, et al., J. Clin. Invest. 66:365-380, 1977, for initial use of this formula. Originally manufactured as "D12462".

Storage conditions are particularly critical to TestDiet products, due to the absence of antioxidants or preservative agents. To provide maximum protection against possible changes during storage, store in a dry, cool location. Storage under refrigeration (2° C) is recommended. Maximum shelf life is six months. (If long term studies are involved, storing the diet at -20° C or colder may prolong shelf life.) Be certain to keep in an airtight container.

Product Forms Available ¹	Catalog #
1/2" Pellet	58128
1/2" Pellet, Irradiated	58233
Meal	1810473

¹Other Forms Available By Request

INGREDIENTS

Lard	31.0800
Casein - Vitamin Treated	25.8450
Maltodextrin	16.1530
Sucrose	6.8470
Powdered Cellulose	6.4810
Soybean Oil	3.2310
Potassium Citrate, Tribasic Monohydrate	2.1320
Calcium Phosphate	1.6800
DIO Mineral Mix	1.2620
AIN-75A Vitamin Mix	1.2620
Calcium Carbonate	0.7110
L-Cystine	0.3880
Choline Bitartrate	0.2580
FD&G Blue 1-8518 Lake	0.0500

Part of the TestDiet® "Blue-Pink-Yellow" DIO Series ("Van Hest" Series)

DIO Rodent Purified Diet w/10% Energy From Fat - Yellow
1/2" Pellet - Catalog # 58124 (58Y2)
Meal - Catalog # 58234 (58Y2)

DIO Rodent Purified Diet w/45% Energy From Fat - Red
1/2" Pellet - Catalog # 58125 (58Y3)
1/2" Pellet, Irradiated - Catalog # 58235 (58Y3)
Meal - Catalog # 1810730 (58Y3)
Meal, Irradiated - Catalog # 1810730 (58Y3)

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum. Plenty of fresh, clean water should be available at all times.

CAUTION:

Palatable - store properly upon receipt.
For laboratory animal use only, not for human consumption.

30250714

NUTRITIONAL PROFILE¹

Protein, %	23.7	Minerals	
Arginine, %	0.60	Calcium, %	0.78
Histidine, %	0.67	Phosphorus, %	0.56
Isoleucine, %	1.24	Phosphorus (available), %	0.56
Leucine, %	2.24	Potassium, %	0.77
Lysine, %	1.68	Magnesium, %	0.07
Methionine, %	0.67	Sodium, %	0.15
Cystine, %	0.48	Chloride, %	0.25
Phenylalanine, %	1.24	Fluorine, ppm	1.2
Tyrosine, %	1.31	Iron, ppm	84
Threonine, %	1.00	Zinc, ppm	48
Tryptophan, %	0.28	Manganese, ppm	78
Valine, %	1.47	Copper, ppm	7.8
Alanine, %	0.71	Cobalt, ppm	0.0
Aspartic Acid, %	1.68	Iodine, ppm	0.27
Glutamic Acid, %	5.28	Chromium (added), ppm	2.8
Glycine, %	0.50	Molybdenum, ppm	2.11
Proline, %	3.04	Selenium, ppm	0.28
Serine, %	1.43		
Taurine, %	0.00	Vitamins	
Fat, %	34.8	Vitamin A, IU/g	5.2
Cholesterol, ppm	301	Vitamin D-3 (added), IU/g	1.3
Linoleic Acid, %	4.70	Vitamin E, IU/g	87.2
Linolenic Acid, %	0.38	Vitamin K, ppm	0.65
Arachidonic Acid, %	0.08	Thiamin Hydrochloride, ppm	7.8
Omega-3 Fatty Acids, %	0.38	Riboflavin, ppm	8.7
Total Saturated Fatty Acids, %	13.88	Niacin, ppm	39
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	14.00	Pantothenic Acid, ppm	21
		Folic Acid, ppm	2.8
Fiber (max), %	6.5	Pyridoxine, ppm	7.5
		Biotin, ppm	0.3
Carbohydrates, %	25.8	Vitamin B-12, mcg/kg	1.8
		Choline Chloride, ppm	1,380
Energy (kcal/g)²	5.10	Ascorbic Acid, ppm	0.0
# kcal:	total	%	
Protein	0.824	18.1	
Fat (ether extract)	3.140	61.8	
Carbohydrates	1.035	20.3	

1. Formulation based on calculated values from the listed ingredient analyses information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analyses will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As Fed basis except where otherwise indicated.
2. Energy (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrates x 4, 9, 4 kcal/gm respectively.



TestDiet
www.testdiet.com