



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Evaluación del efecto de la suplementación con
aceite de pescado en cápsulas sobre la
expresión del mRNA del gen NFkB en células
mononucleares de adultos aparentemente
sanos

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

P.L. Nutric. Adriana Angélica Ángeles Quezada
No. cuenta: 182954



Bajo la Dirección de:
Dra. María Elizabeth Tejero Barrera
Titular de Laboratorio de Nutrigenética y
Nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina
Genómica

Pachuca, Hgo., a noviembre de 2014

Con amor agradezco a mi familia, mis padres quienes con su esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional, hacen posible que pueda lograr la culminación de un importante ciclo en mi carrera profesional, mis hermanas Susana y Alejandra que me confortan con su cariño, ejemplo y motivación, mis abuelitas Ana María y Susana Elia por sus enseñanzas de vida, por tantos momentos de alegría, todos ustedes son inspiración para mí. Agradezco a David por su cariño, apoyo y motivación en todo momento

A la Dra. Liz Tejero le doy gracias por recibirme amablemente como alumna de tesis, fue una grata experiencia tanto profesional como personal trabajar bajo su dirección, y a su equipo del laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del INMEGEN, en especial a la Dra. Carolina Vargas Martínez, Brianda, Marisol, Sofía, Silvia y Elí por su valiosa colaboración en mi trabajo de tesis.

Para mis padres, Saúl y Angélica, esta tesis la dedico con cariño a ustedes, gracias por entregarme tanto de su persona, sepan que mis logros son también suyos

“No hay secretos para el éxito. Éste se alcanza preparándose, trabajando arduamente y aprendiendo del fracaso” Colin Powell

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Marco Teórico.....	7
1.1 Ácidos grasos poliinsaturados, estructura y composición.....	7
1.1.1.1 Ácidos grasos poliinsaturados omega 6.....	7
1.1.1.2 Ácidos grasos poliinsaturados omega 3.....	8
1.1.2 Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados.....	9
1.1.2.1 Elongación	9
1.1.2.2 Desaturación.....	9
1.1.2.3 Retroconversión en peroxisomas.....	13
1.1.3 Función de los ácidos grasos poliinsaturados.....	13
1.1.3.1 Función en la salud del consumo de ácidos grasos poliinsaturados Omega 3.....	13
1.1.4 Perspectivas del consumo actual de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3.....	14
1.2 Inflamación.....	14
1.2.1 Papel biológico de la inflamación en la enfermedad.....	15
1.2.2 Mecanismo antiinflamatorio de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3.....	15
1.2.3 Receptores proliferadores de peroxisomas.....	16
1.2.4 Factor nuclear kappa Beta.....	16
1.2.4.1 Factor nuclear kappa Beta y omega 3.....	17
1.3 Reacciones adversas y recomendaciones del consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega 3.....	19
1.4 Revisión de estudios de intervención con aceite de pescado con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y parámetros de inflamación.....	21
2. Problema de investigación.....	24
3. Justificación.....	25
4. Objetivos.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. Hipótesis.....	26

6. Metodología.....	27
6.1 Diseño del estudio.....	27
6.2 Descripción del procedimiento de suplementación.....	28
6.3 Análisis estadístico.....	31
6.4 Consideraciones éticas.....	32
7. Resultados	33
8. Discusión.....	36
9. Conclusión.....	41
10. Bibliografía.....	42
11. Anexos.....	49

Abreviaturas

Acetil-CoA Acetil coenzima A

AG Ácidos Grasos

AGPI Ácidos Grasos Poliinsaturados

AGS Ácidos Grasos Saturados

AP-1 Proteína activadora 1

ARA Ácido araquidónico, C20:4

ARN Ácido ribonucleico

ATP III Panel de tratamiento para adultos

COX-2 Inhibidores de la ciclooxigenasa 2

DHA Ácido docosahexanoico, C20:6

EPA Ácido eicosapentanoico, C20:5

FADSs Acil coA desaturasa

GPR120 G-receptor acoplado a proteína 120

hbA1c Hemoglobina glicada

HNF-4 α Factor nuclear hepático 4 α

ICAM-1 Molécula de adhesión intercelular

I κ B Factor nuclear de potenciador de gen de la cadena kappa en células B

IL-1 Interleucina 1

IL-12 Interleucina 12

IL-2 Interleucina 2

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

IMC Índice de masa corporal

IMC Índice de masa corporal

JNK1 Quinasa c-Jun N-terminal

LPS Lipopolisacáridos

n-3 Omega 3, C18:3

n-6 Omega 6, C18:2

NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF κ B Factor nuclear kappa Beta

NOS2 Sintasa de óxido nítrico 2

OMS Organización Mundial de la Salud

PCR Proteína C reactiva

PGE2 Prostaglandina E2

PGE2 Prostaglandinas

PMBC Células mononucleares de sangre periférica

PPARs Receptores activados por el proliferador de peroxisomas

R24h Cuestionario recordatorio de los alimentos consumidos durante 24 horas con el método automatizado de pasos múltiples

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RXR- α Receptores X retinoides

SCDs Esteroil coA desaturasa

sE-selectina Receptor de adhesión selectina-E

sICAM-1 Molécula soluble de adhesión intercelular

SNUT Sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de nutrimentos

SREBP-1c Factor de transcripción insulínico

sVCAM-1 Molécula soluble de adhesión celular vascular

TAB1 TGF- β -activa kinasa proteína de unión

TAK1 TGF- β -activa kinasa

TLR-4 Receptor de superficie-4

TNF Factor de necrosis tumoral

TNFR Receptor del factor de necrosis tumoral

TXA2 Tromboxano A2

VCAM-1 Molécula de adhesión vascular celular

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 y omega 6.....	8
Figura 2. Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 y omega 6 en humanos.....	10
Figura 3. Mecanismo de elongación de ácidos grasos poliinsaturados....	11
Figura 4. Desaturación de ácidos grasos poliinsaturados.....	12
Figura 5. Retro conversión del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6.....	12
Figura 6. Estructuras de NFkB.....	18
Figura 7. Mecanismo antiinflamatorio mediante la activación de GPR120 por ácidos grasos omega 3 en los macrófagos.....	19
Figura 8. Mecanismos antiinflamatorios de EPA y DHA.....	20
Figura 9. Inflamación, NFkB y aterosclerosis.....	21
Figura 10. Expresión basal y final del mRNA de NFkB.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de intervención con aceite de pescado con AGPI omega 3 y sus efectos sobre inflamación.....	23
Tabla 2. Composición corporal antes y después de la suplementación con aceite de pescado.....	33
Tabla 3. Parámetros bioquímicos antes y después de la suplementación con aceite de pescado.....	34
Tabla 4. Parámetros de inflamación antes y después de la suplementación con aceite de pescado.....	34

1. Resumen

Los datos existentes afirman que el consumo de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 tiene varios beneficios en la salud humana. Pocos estudios analizan la expresión de genes, consumo de AGPI omega 3, y su efecto antiinflamatorio. El factor de transcripción conocido como factor nuclear Kappa Beta, NFkB es de importancia porque interviene en diversas vías de señalización inflamatorias y control de citoquinas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con 2.7 g de aceite de pescado/día, durante 6 semanas sobre la expresión del mRNA de NFkB en células mononucleares en adultos aparentemente sanos. El estudio fue piloto, exploratorio, prospectivo, cuasi-experimental, longitudinal y analítico. Se incluyeron 20 hombres de entre 18 a 40 años, aparentemente sanos. Se realizaron mediciones de composición corporal, concentración de glucosa, lípidos en sangre, insulina, ingestión de energía estimada por encuestas dietéticas R24h y SNUT, expresión de mRNA del gen NFkB en células mononucleares, concentración de PCR, adiponectina, IL-6 en plasma. Se realizó un análisis descriptivo, para muestras pareadas. El proyecto fue aprobado por los comités de ética, investigación y bioseguridad del INMEGEN, la UNAM, y el WIRB, cada participante firmó consentimiento informado. La suplementación diaria con 2.7 g de aceite de pescado en cápsulas durante seis semanas, disminuyó significativamente la expresión del mRNA de NFkB ($p < 0.001$), así como el porcentaje de grasa ($p < 0.005$). PCR, IL-6, adiponectina, colesterol total, HDL, LDL, glucosa, insulina, hbA1c, IMC, y circunferencia de cintura no presentaron cambios significativos. La evidencia generada por este estudio sugiere que hay efectos a nivel de la expresión génica que se podrían asociar a la disminución de la inflamación.

Palabras clave: omega 3, NFkB, Inflamación

Abstract

In general, the existing data on the effects of the consumption of polyunsaturated fatty acids omega 3 suggest several benefits on human health, including reduction of inflammation. The transcription factor known as nuclear factor Kappa Beta, NFkB is crucial in the cascade of pro-inflammation in mononuclear cells. The knowledge of the regulation of the expression and activity of this molecule is of relevance because it plays an important role in various inflammatory signaling pathways and control cytokines. Few studies have analyzed the effect of AGPI intake on the expression of genes, and the anti-inflammatory effect. The results of some studies are contradictory, and it is necessary to seek further evidence of the role of these fatty acids in the regulation of inflammation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of supplementation with 2.7 g fish oil / day for 6 weeks on NFkB mRNA expression in mononuclear cells in apparently healthy male adults. The present is an exploratory pilot study. Design of the study is, prospective, quasi-experimental, longitudinal and analytical. A sample of 20 men aged 18 to 40 years, apparently healthy was included. Body composition, glucose, blood lipids, insulin, mRNA expression of NFkB gene, CRP, adiponectin, IL-6 measurements were performed. Descriptive analysis for paired samples. Approval by ethics committees, research and biosafety INMEGEN, UNAM, and WIRB, each participant signed informed consent. Daily supplementation with 2.7 g of fish oil capsules for six weeks significantly decreased mRNA expression of NFkB ($p < 0.001$) and fat percentage ($p < 0.005$). CRP, IL-6, adiponectin, total cholesterol, HDL, LDL, glucose, insulin, HbA1c, BMI, and waist circumference showed no significant change. Evidence generated by this study suggests that there are effects in terms of gene expression that can be associated with reduced inflammation.

Keywords: omega 3, NFkB, Inflammation

1. Marco Teórico

1.1. Ácidos grasos poliinsaturados, estructura y composición

Los ácidos grasos son un subtipo de lípidos, se componen de una cadena de hidrocarburos y un grupo carboxilo. Los ácidos grasos que tienen en su estructura dos o más dobles enlaces en la cadena de hidrocarburos se denominan poliinsaturados. En humanos y mamíferos, la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) presentes en la sangre y los tejidos contienen entre 18 y 22 carbonos con dos a seis dobles enlaces (Orr *et al.*, 2013). Los AGPI presentes en el cuerpo y los alimentos son principalmente de la serie omega 3 y omega 6 (**Figura 1**) (Orr *et al.*, 2013). El ácido α -linolénico (C:18) es la base de los ácidos grasos omega 3 del cual se derivan el ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) (Kalupahana *et al.*, 2011; Burillo *et al.*, 2012), el ácido linoleico y araquidónico son de omega 6, pueden ser biosintetizados en el organismo humano pero en cantidades mínimas, de ahí su importancia en la dieta (Coronado *et al.*, 2006).

1.1.1.1 AGPI omega 6

El ácido linoleico (C18:2) es el primer miembro del grupo de los omega 6, es principalmente sintetizado por plantas terrestres, razón por la cual se encuentra presente en cantidad abundante en el aceite de maíz, aceite de girasol y aceite de cártamo (Orr *et al.*, 2013). Debido a que existe mayor cantidad de omega 6 que omega 3 en los alimentos, el tipo omega 6 es el AGPI más abundante en la dieta (Orr *et al.*, 2013).

El ácido araquidónico (ARA) (C20:4), es el tipo más abundante de omega 6, es el principal sustrato para la síntesis de biomedadores de eicosanoides, así como prostaglandinas y leucotrienos, y es el mayor componente del glicerolfosfolípido inositol. La mayor parte del ARA presente en el cuerpo se sintetiza a partir del ácido linoleico (Orr *et al.*, 2013).

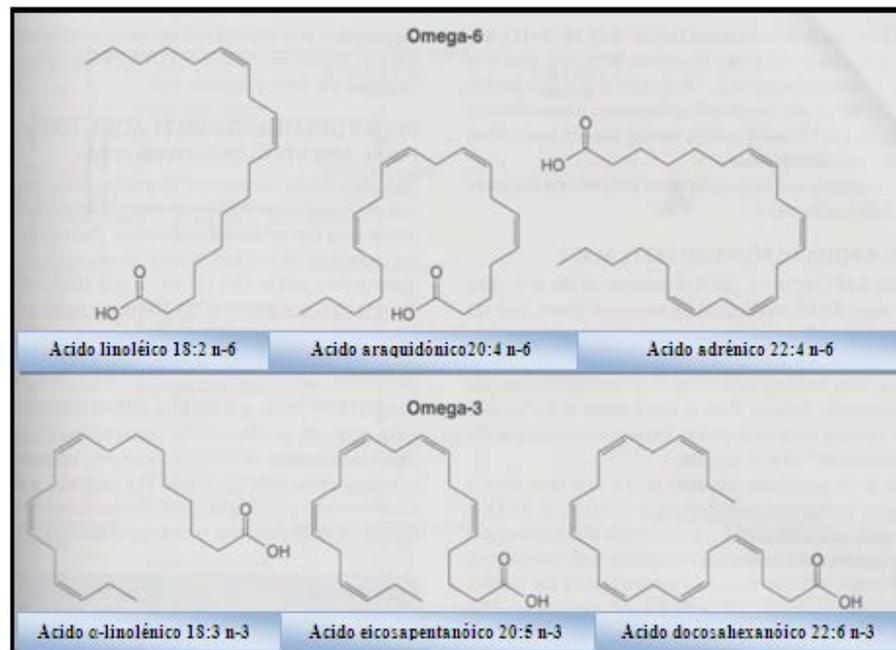


Figura 1. Representación esquemática de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 y omega 6

Estructura química de los AGPI omega 3 y omega 6 de fuentes vegetales y animales, los números hacen referencia a la localización que ocupa el primer doble enlace en estos ácidos grasos, contando a partir del carbono situado en el extremo metilo de la cadena (omega terminal o n) (Orr *et al.*, 2013).

1.1.1.2 AGPI omega 3

Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 se encuentran presentes en grandes cantidades en la retina y en ciertas partes del cerebro, están presentes en las membranas celulares y están incorporados principalmente dentro de fosfolípidos, así como esfingolípidos (Arterburn *et al.*, 2006; Orr *et al.*, 2013). Los omega 3 son ácidos grasos poliinsaturados esenciales es decir, deben incorporarse al organismo a través de la dieta, ya que el organismo humano no es capaz de introducir dobles enlaces antes del noveno carbono de la cadena de ácido graso (Caballero *et al.*, 2006). Los grupos que componen al omega 3 se muestran en la **Figura 1**, el ácido α -linolénico es similar en su estructura al ácido linoleico, excepto por la presencia de un doble enlace adicional en el carbono 15 (Orr *et al.*, 2013). La vegetación que se desarrolla en aguas frías, produce grandes cantidades de ácido α -linolénico, dicha vegetación es el principal componente de la dieta de peces y otros animales marinos, por lo cual los miembros de la clase

de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 que tienen 5 o 6 dobles enlaces, se encuentran presentes en los peces y animales marinos (Orr *et al.*, 2013), existen otras fuentes de AGPI omega 3, plantas como soya, canola, además de hortalizas verdes como verdolagas, espinacas, nueces y productos industrializados adicionados (Coronado *et al.*, 2006)

1.1.2 Metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados

Para sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados derivados de omega 3 y omega 6 en el organismo humano, son necesarias tres reacciones las cuales son elongación de ácidos grasos, desaturación, y β -oxidación (**Figura 2**), éstas reacciones ocurren tanto en la síntesis de omega 3 como omega 6.

Todas las reacciones involucradas en el metabolismo, utilizan derivados de acetil CoA. Todo el proceso de metabolismo incluye tres reacciones de elongación, tres reacciones de desaturación y una reacción de retro conversión (Orr *et al.*, 2013).

1.1.2.1 Elongación

Los ácidos grasos son transformados en derivados de cadena larga a través de una elongación en el retículo endoplásmico de la célula **Figura 3**. Los ácidos grasos deben estar en forma activada como acilos de CoA, así pues, el malonil-coA es el agente de elongación. (Orr *et al.*, 2013).

1.1.2.2 Desaturación

La desaturación consiste en insertar dobles enlaces en los ácidos grasos, proceso que ocurre en el retículo endoplásmico. Existen dos clases de enzimas desaturasas en los mamíferos estearoil-coA desaturasa que actúa sobre AGS y la acil-coA desaturasa que actúa sobre AGPI. Varios genes pueden codificar a las enzimas FADs (del inglés, *fatty acid desaturases*) en términos del metabolismo de AGPI, las más estudiadas son FADS1 (Desaturasa 5) y FADS2 (Desaturasa 6).



Figura 2. Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 y omega 6 en humanos Para sintetizar AGPI omega 3 y omega 6 es necesario la intervención de algunos productos intermedios como alimentos de origen vegetal y animal (Orr *et al.*, 2013).

Ambas desaturasas pueden utilizar ácidos grasos omega 3 u omega 6 como sustratos, y ambas requieren O_2 , NADH, citocromo b5, y citocromo b5 reductasa (**Figura 4**) (Orr *et al.*, 2013).

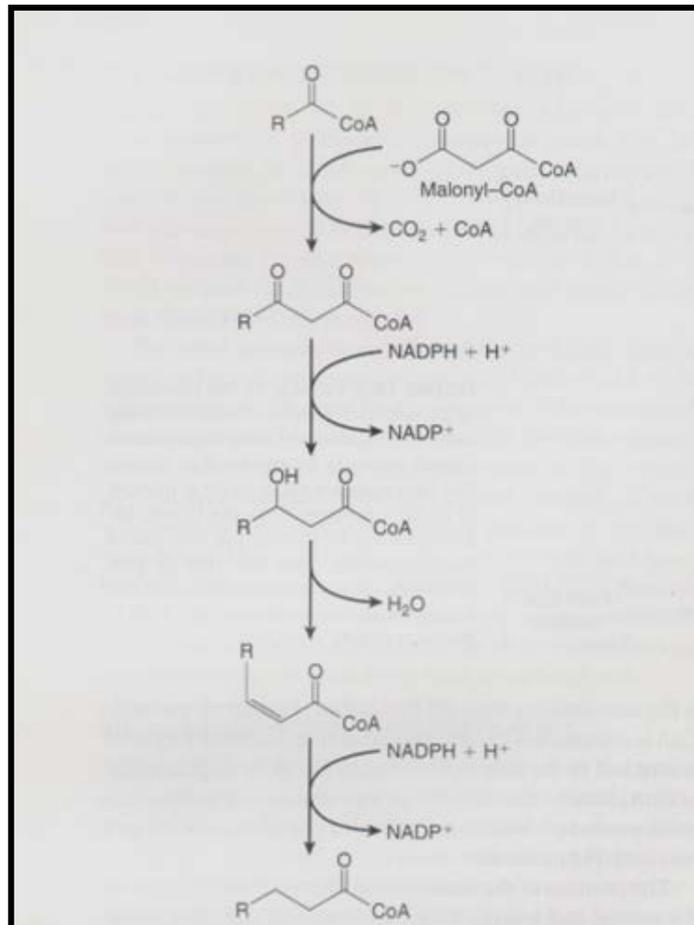


Figura 3. Mecanismo de elongación de ácidos grasos poliinsaturados

En la reacción de condensación, el grupo carboxilo libre de malonil-coA es liberado como CO_2 , y el fragmento restante de carbono-2 es ligado al grupo carbonilo mediante el desplazamiento de CoA. Finalmente, el grupo carbonilo, que es el carbono-3 en el producto elongado, es reducido en un proceso de tres pasos que utiliza moléculas de NADPH (Orr *et al.*, 2012).

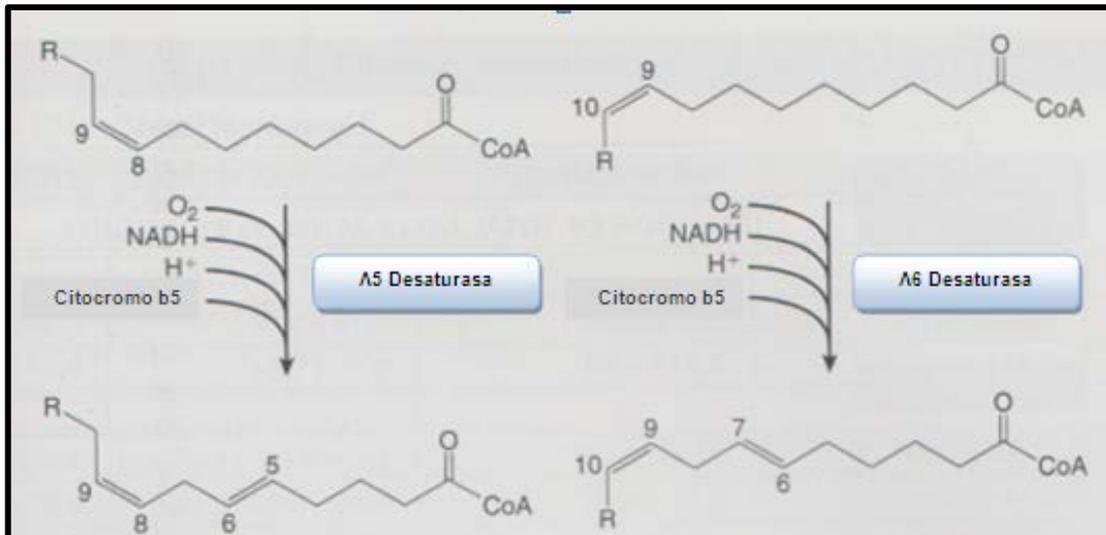


Figura 4. Desaturación de ácidos grasos poliinsaturados

Inserción de dobles enlaces en la cadena de AGPI omega 3 y omega 6 (Orr *et al.*, 2013).

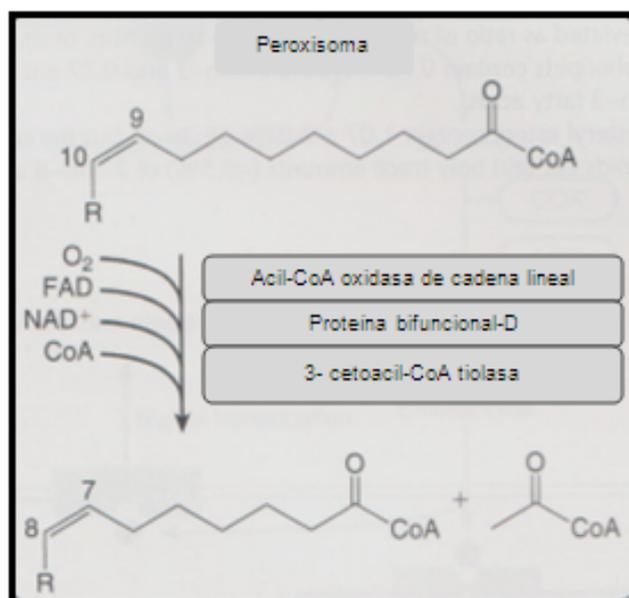


Figura 5. Retro conversión del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6

Acortamiento de las cadenas de ácidos grasos, las enzimas peroxisomales que catalizan ésta reacción de β -oxidación son acil-CoA oxidasa, D-proteína bifuncional, y 3-cetoacil-coA o proteína transportadora de esteroles (Orr *et al.*, 2013).

1.1.2.3 Retroconversión en peroxisomas

La oxidación peroxisomal de ácidos grasos consiste en la conversión del carbono-24 al carbono-22 mediante acil-coA, el sistema de β -oxidación acorta las cadenas largas de ácidos grasos. Dicho proceso requiere el transporte intermediado del carbono-24 del retículo endoplásmico al peroxisoma, después transporta de regreso los productos del carbono-22 al retículo endoplásmico donde es incorporado en los lípidos del tejido. La reacción de retro conversión requiere de O_2 , FAD, NADH, y CoA, así como la conversión de dos carbonos en forma de acil-CoA. (**Figura 5**) (Orr *et al.*, 2013).

Los procesos de elongación, desaturación y retroconversión juntos hacen posible que el cuerpo utilice omega 3 y omega 6 para producir los elementos necesarios de esta clase de AGPI (Orr *et al.*, 2013).

1.1.3 Función de los ácidos grasos poliinsaturados

En el ser humano, los AGPI omega 3 y omega 6 son importantes para mantener la estructura de las membranas celulares, facilitar la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K), regular el metabolismo del colesterol y producir eicosanoides, que regulan múltiples procesos biológicos (Arterburn *et al.*, 2006) (tono vascular y bronquial, motilidad gastrointestinal y uterina, protección gástrica, diuresis, coagulación sanguínea, temperatura corporal, procesos inflamatorios e inmunitarios) (Caballero *et al.*, 2006). Además de lo anterior, los omega 3 pueden influir en la regulación de la expresión de algunos genes como los activados por PPARs. Por lo tanto, la composición de ácidos grasos de membrana global puede tener un gran impacto en la célula y la función del órgano (Arterburn *et al.*, 2006).

1.1.3.1 Función en la salud del consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega 3

El incremento del consumo omega 3 puede disminuir el riesgo de padecer algunas enfermedades crónicas como artritis, diabetes, obesidad, inflamación, cáncer (Wall *et al.*, 2010) y enfermedades cardiovasculares ya que la ingesta de aceite de pescado reduce la ocurrencia de lesiones ateroscleróticas, disminuye

la frecuencia de paros cardíacos y reduce la mortalidad global en pacientes con riesgo de enfermedad cardiovascular, además de mejorar el perfil lipídico, los omega 3 ejercerían leves disminuciones en la presión arterial. La reducción de los triacilglicéridos, el aumento del colesterol HDL, la reducción de la inflamación vascular y la disminución de la agregación plaquetaria, favorecerían dicha disminución en la presión arterial, aunque los mecanismos específicos de este efecto aún no están descritos completamente así como mejorar la salud mental (Valenzuela *et al.*, 2011).

1.1.4 Perspectiva del consumo actual de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3

Las poblaciones actuales, respecto a las de hace unos 10,000 años, han incorporado mayor cantidad de calorías a la dieta y menos gasto de estas, más ácidos grasos trans, grasas saturadas y más ácidos grasos omega 6, frente a un menor consumo de ácidos grasos omega 3 y menos hidratos de carbono provenientes de fuentes como fibra, frutas y hortalizas (Coronado *et al.*, 2006). En México según la ENSANUT 2012 el consumo AGPI omega 3 apenas representó el 0.29% de la energía de la dieta en adultos de 19 a 59 años. En este panorama también la relación de ácidos grasos n-6:n-3 (2:1) ha perdido su equilibrio porque el consumo de omega 6 ha aumentado y no corresponde a la proporción que se recomienda desde el punto de vista nutricional (Coronado *et al.*, 2006). La importancia del consumo adecuado de los AGPI deriva de la variedad de procesos biológicos en los que participan, lo cual tiene consecuencias en la salud humana.

1.2 Inflamación

La inflamación es parte de la respuesta inmediata del cuerpo a la infección o lesión. Se caracteriza por enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. Esto ocurre como resultado de aumento del flujo sanguíneo, y permeabilidad a través de capilares sanguíneos, lo que permite a las grandes moléculas (por ejemplo, anticuerpos, citoquinas) dejar el torrente sanguíneo, cruzar la pared endotelial, y el aumento del movimiento de los leucocitos de la sangre al tejido circundante. La inflamación funciona como un inicio del proceso inmunológico para eliminar los

patógenos, toxinas así como reparación de tejidos (Calder, 2006). La inflamación aguda es mediada por los granulocitos, mientras que la inflamación crónica es mediada por las células mononucleares (Bäckdahl *et al.*, 2009).

1.2.1 Papel biológico de la inflamación en la enfermedad

La inflamación es parte de la respuesta normal del huésped a la infección y lesiones. Sin embargo, la inflamación excesiva o inapropiada contribuye a una amplia gama de enfermedades humanas agudas y crónicas y se caracteriza por la producción de citoquinas proinflamatorias, eicosanoides derivados del ARA (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), otros agentes inflamatorios (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno) y moléculas de adhesión (Raghu y Venkatesan, 2008).

1.2.2 Mecanismo antiinflamatorio de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3

Los AGPI omega 3 pueden disminuir la producción de eicosanoides inflamatorios, citoquinas, y especies reactivas de oxígeno, así como la expresión de moléculas de adhesión. Los omega 3 actúan tanto directamente (reemplazando el ARA como sustrato de eicosanoides e inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico) e indirectamente (alterando la expresión de genes inflamatorios). Por lo tanto, los AGPI omega 3 son agentes potencialmente antiinflamatorios (Raghu y Venkatesan, 2008).

Los efectos benéficos sobre la inflamación y enfermedades cardiovasculares de los AGPI de cadena larga omega 3, tal como el EPA y DHA, son generalmente aceptados. Estas funciones se asocian con sus efectos sobre las propiedades fisicoquímicas de la membrana, vías de señalización intracelular. (Gorjão *et al.*, 2009), además los AGPI pueden modular la función celular a través de cambios en la expresión de genes inflamatorios a través de sus efectos sobre factores de transcripción como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) y factor nuclear kappa Beta (NFκB), y (Wall *et al.*, 2010) los cuales serán definidos a continuación.

1.2.3 Receptores proliferadores de peroxisomas activados

La familia de factores de transcripción denominados como PPARs (α , β y γ ,) intervienen en diversas funciones, dependiendo del tipo de célula (Wall *et al.*, 2010) participan en la regulación que se expresa en los hepatocitos, cardiomiocitos y otros, los PPARs son requeridos para que los ácidos grasos expresen su función en los procesos genéticos participando en una extensa red de genes que regulan el metabolismo de lípidos, de la glucosa y en la diferenciación de los adipocitos (Coronado *et al.*, 2006), la PPAR α se asocia al metabolismo de los ácidos grasos del hígado, riñón, corazón, músculo esquelético y tejido adiposo marrón, PPAR γ se asocia más con tejido adiposo de otro tipo (Coronado *et al.*, 2006). Se conoce que la activación de estos receptores nucleares regula la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y la inflamación, respectivamente (Bouwens *et al.*, 2009), de hecho, los efectos antiinflamatorios de EPA y DHA podrían estar relacionados con su capacidad para actuar como ligandos de los receptores activados proliferadores de peroxisomas (PPARs), que regulan múltiples genes que participan en el metabolismo lipídico (Caballero *et al.*, 2006).

1.2.4 Factor Nuclear Kappa Beta

Factor nuclear kappa Beta (NF κ B) es un factor de transcripción que tiene un papel importante en diversas vías de señalización inflamatorias, controla la expresión de varias citoquinas (por ejemplo, Interleucina-1, Interleucina-2, Interleucina-6, Interleucina-12, factor de necrosis tumoral alfa), quimiocinas (por ejemplo, Interleucina-8, quimiotáctica de monocitos proteína-1), moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular, molécula de adhesión celular vascular, y E-selectina), induce enzimas efectoras por ejemplo, óxido nítrico sintasa inducible e inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Wall *et al.*, 2010). NF κ B regula la expresión de más de 400 genes involucrados en la respuesta inmune, inflamación, estrés metabólico, supervivencia celular y cáncer (Vanden *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, es responsable de diversos aspectos de la inflamación así como mediadores de la misma (Saswata *et al.*, 2011). El estímulo proinflamatorio y condiciones de estrés incluyendo citoquinas, agentes de

infección, desnutrición (estrés metabólico, estrés del retículo endoplásmico) o agentes de peligro (bacterias, virus, patógenos asociados a patrones moleculares, y radiación) (Saswata *et al.*, 2011) activan rápidamente a NFκB, por lo cual se induce la transcripción de varios genes, incluyendo citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, quimiocinas y proteínas protectoras. (Vanden *et al.*, 2006).

En los mamíferos, la forma activa de NFκB se presenta como un homo o heterodímero de los cinco miembros de la familia NFκB-Rel (p65/Rel A, c-Rel , Rel-B , p100/p52, p105/p5) (**Figura 6**) presente habitualmente de forma inactiva en el citoplasma (Baeuerle y Henkel., 1994). El principal y más clásico heterodímero de NFκB está compuesto por las subunidades p50 y p65 caracterizadas como potentes activadores de la expresión de varios genes proinflamatorios (Martínez-Micaelo *et al.*, 2012). Todas las proteínas de la familia presentan una zona característica por la que se unen a una secuencia consenso del ADN o sitio κB: GGGRNYYCC, en la que R es una purina, Y una pirimidina y N cualquier base. Los diferentes dímeros NFκB presentan afinidades diferentes a los sitios κB y también varían en su capacidad de activar la transcripción (Guijarro y Ejido, 2002). Por ejemplo, en los compuestos p50 y p52 tienen actividad fundamentalmente represora, mientras que p65 y c-Rel son potentes activadores de la transcripción (Guijarro y Ejido, 2002).

1.2.4.1 Factor Nuclear Kappa Beta y omega 3

La activación de TLR-4, *Toll-like receptor 4*, un receptor de superficie para lipopolisacáridos (LPS) por los AGS aumenta la expresión de un número de genes relacionados con proinflamación (Il-6, Il-8, etc.) por un mecanismo dependiente de NFκB (Suganami *et al.*, 2005), y la clave parece ser la respuesta-activación de NFκB (**Figura 7**), ya que la inhibición o activación de dicho gen puede ser inducida por ácidos grasos saturados o insaturados (Lee *et al.*, 2004), específicamente para omega 3 (**Figura 8**) (Teng *et al.*, 2014). La exposición transitoria a ciertos componentes dietarios puede inducir cambios epigenéticos de larga duración en la subunidad p65 de NFκB (Massaro *et al.*, 2008). En diversas

patologías se presenta dicho mecanismo de respuesta-activación para NFκB (Dessi *et al.*, 2013) (**Figura 8 y 9**).

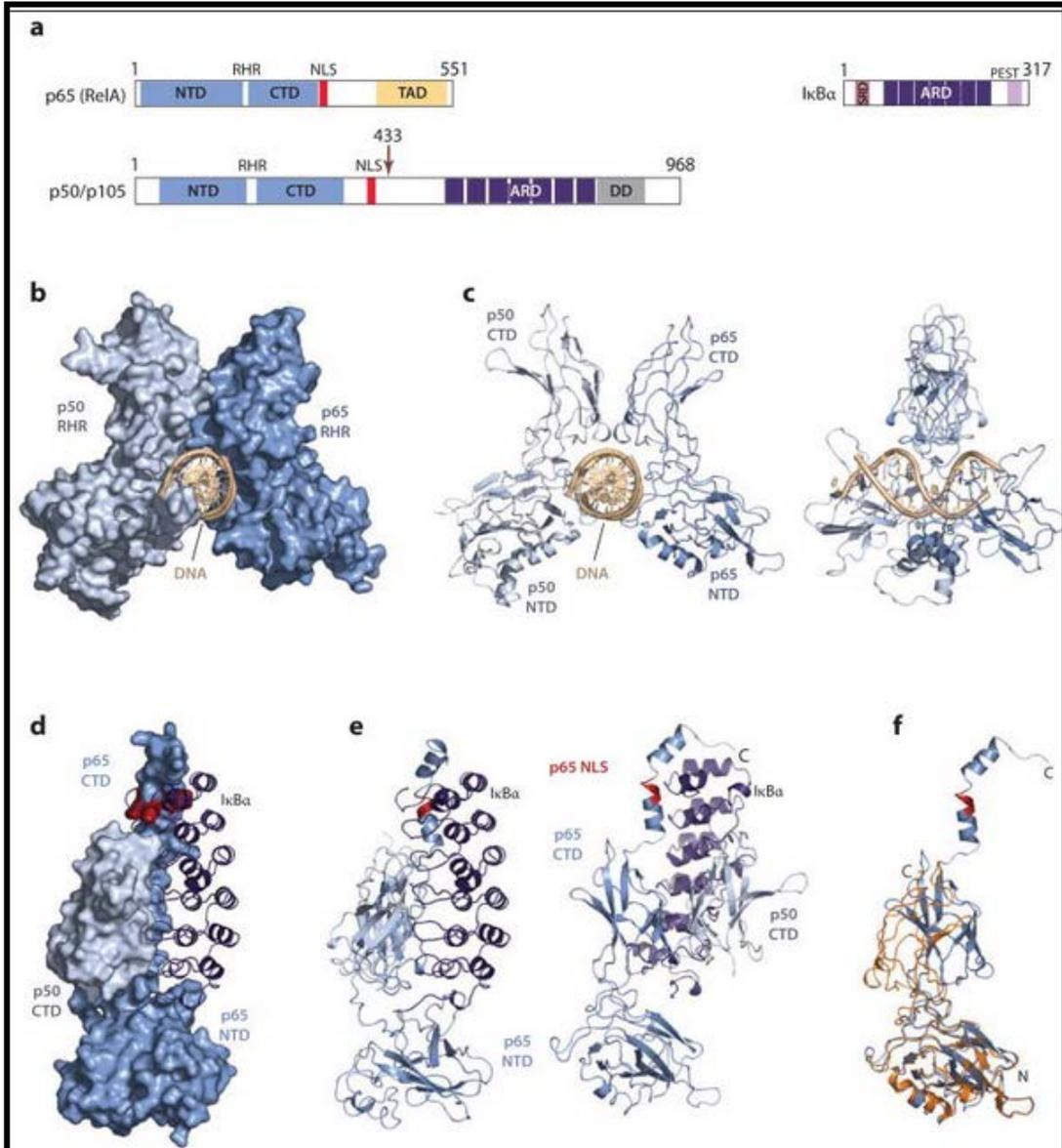


Figura 6. Estructuras de NFκB

(a) Entidades de dominio de los miembros representativos. (b) Modelo de compilación de la estructura cristalina de la heterocomplejo p50/p65 unido al ADN. (c) La misma estructura se muestra en los diagramas de la cinta en dos orientaciones. (d) Espacio de llenado de modelo de la estructura cristalina de heterocomplejo p50/p65 unido a IκBα p65 se muestra en rojo. (e) La misma estructura se muestra en los diagramas de la cinta en dos orientaciones. (f) Superposición de p65 en la forma unida-IκBα (azul) y la forma de ADN determinada (naranja) dominio C-terminal; IκB, inhibidor del factor nuclear kappa Beta; NLS, señales de localización nuclear; NTD, dominio N-terminal (Napetschnig y Wu, 2013).

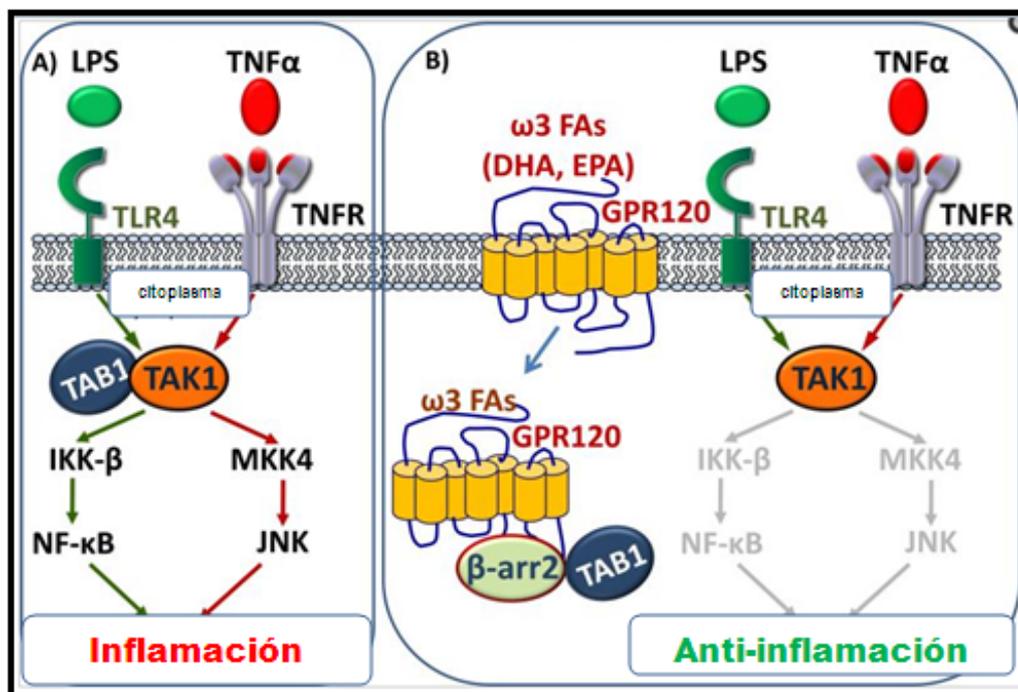


Figura 7. Mecanismo antiinflamatorio mediante la activación de GPR120 por ácidos grasos omega 3 en los macrófagos

a) Activado TLR4 y TNFR por LPS y TNF respectivamente, convergen en asociación citoplasmática de TAK1 con TAB1, mediando cascadas pro-inflamatorias mediante la activación de NFκB y JNK1. B) La activación de GPR120 por omega 3 internaliza GPR120 que se une a β-arrestina 2 y secuestra TAB1, provocando con ello inhibición de la inflamación (Saswata *et al.*, 2011)

1.3 Reacciones adversas y recomendaciones del consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega 3

Las reacciones adversas más frecuentes son las digestivas (dispepsia, náuseas, molestias abdominales, gastritis y diarrea). (Caballero *et al.*, 2006)

Existen diversas recomendaciones del consumo de ácidos grasos omega 3 sugeridas por varias organizaciones (Lichtenstein *et al.*, 2006), en 2003 la Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL) publicó sus recomendaciones para la ingesta de AGPI omega 3 en adultos sanos, se sugiere para la salud cardiovascular una ingesta mínima de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) combinada de 500 mg/día. En 2009, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA,

European Food Safety Authority) publicó sus recomendaciones relativas a los AGPI, una dosis de 2g/día de ácido graso omega-3 alfa-linolénico (ALA) y 250 mg/día de los ácidos grasos de cadena larga omega 3 eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). La American Heart Association recomienda a las personas sin enfermedad coronaria documentada que consuman diversos tipos de pescado (preferentemente grasos) al menos dos veces a la semana, además de consumir aceites y alimentos ricos en el ácido graso poliinsaturado omega-3 alfa-linolénico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un consumo de ácidos grasos omega-6 de 5-8% de la energía y un consumo de omega-3 de 1-2% de la energía.

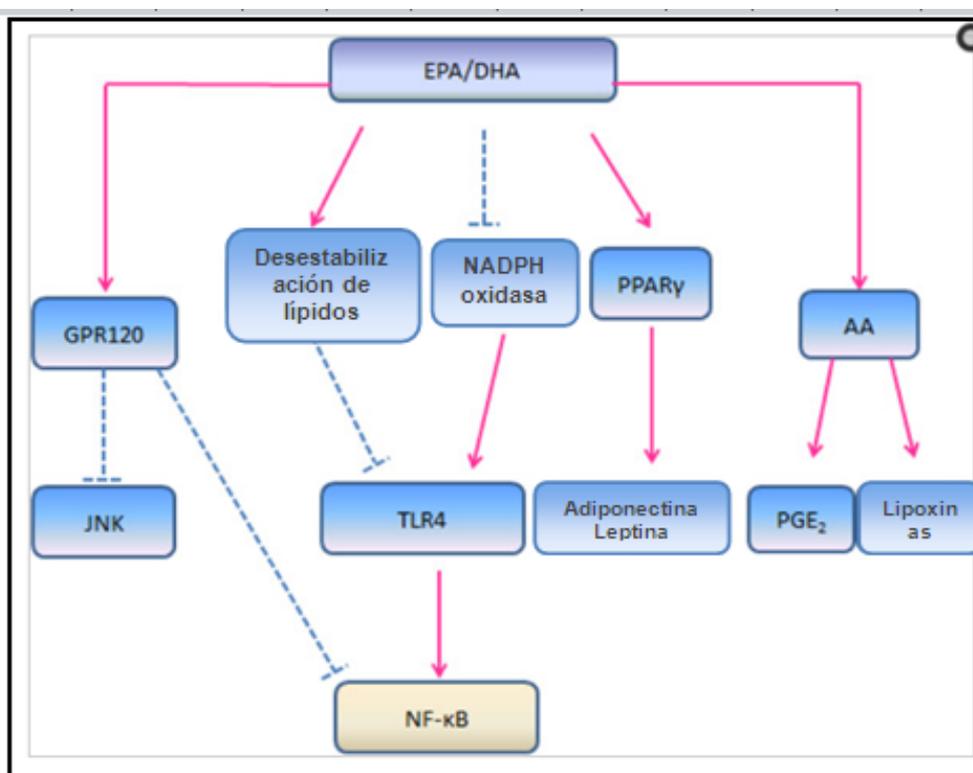


Figura 8. Mecanismos antiinflamatorios de EPA y DHA

EPA y DHA inhibe NFκB y JNK a través de la unión con GPR120. La incorporación de estos omega 3 interrumpe el desplazamiento de TLR-4 a lípidos, por lo que desactiva NFκB. Además, EPA y DHA interfieren con la vía de TLR-4 de señalización a través de la regulación a la baja de la producción de NADPH oxidasa, lo que resulta en la inhibición de la ruta de NFκB. Estos ácidos grasos también activan PPAR y, dan lugar a la regulación positiva de la adiponectina y la secreción de leptina. Además, la ingesta de EPA y DHA conduce al antagonismo de ácido araquidónico de omega 6. La línea punteada indica inhibición, la línea sólida denota activación. (Teng *et al.*, 2014)

En Norte América en general se ha acordado la recomendación del consumo de dos porciones de pescado con alto contenido de omega 3 por semana para obtener un aproximado de 500 mg de EPA y DHA al día (0.06 al 0.12% del total de la energía) (Hu *et al.*, 2008; Perusse-Lachance *et al.*, 2010). Actualmente no hay un consenso establecido acerca de la recomendación del consumo de omega 3.

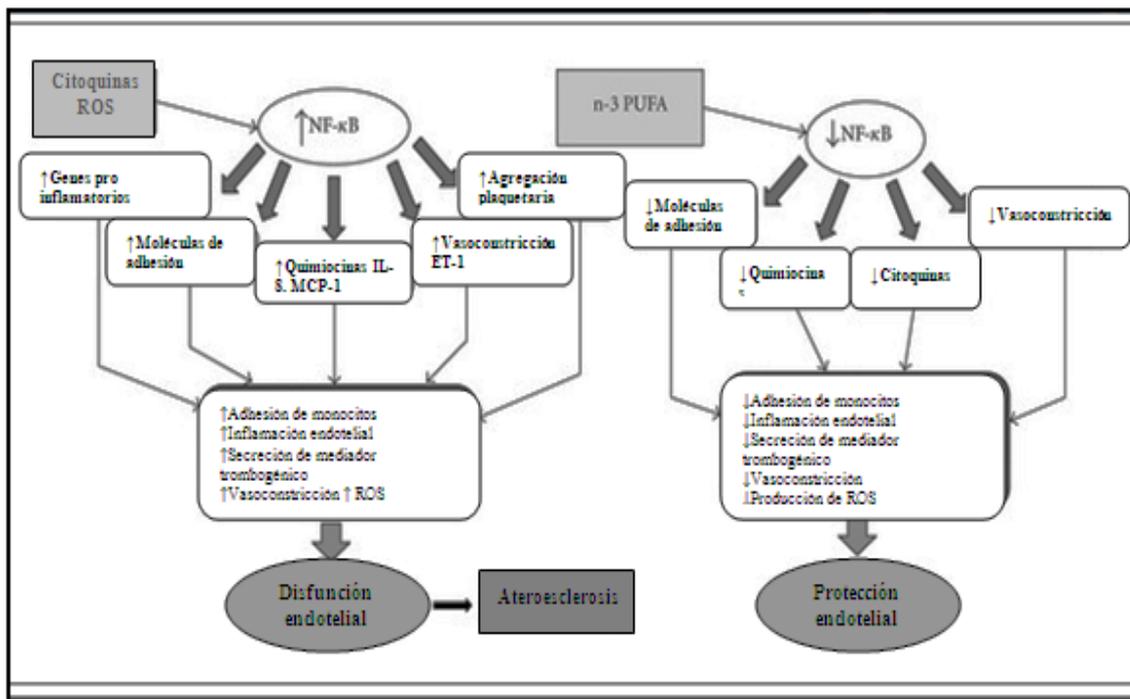


Figura 9. Inflamación, NFκB y aterosclerosis

Mecanismos por los cuales se produce una protección endotelial a través del consumo de omega 3 y la inhibición de NFκB (Dessi *et al.*, 2013).

1.4 Revisión de estudios de intervención con aceite de pescado con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y parámetros de inflamación

En la **Tabla 1** se presentan algunos de los estudios de suplementación con AGPI omega 3 en humanos. Un estudio de suplementación con ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA de 26 sujetos sanos mayores por 26 semanas altera los perfiles de expresión de genes en células mononucleares hacia una perspectiva de un perfil antiinflamatorio y antiaterogénico. El perfil antiinflamatorio de expresión de genes observado en dicho estudio es principalmente

caracterizado por una disminución en la expresión de genes inflamatorios, incluyendo NFκB y genes diana, citoquinas proinflamatorias así como genes involucrados en síntesis de eicosanoides (Bouwens *et al.*, 2009).

Los AGPI omega 3 también reducen la expresión de moléculas de adhesión: vascular (VCAM-1), intercelular (ICAM-1, selectina E), como se observó en una cohorte de 727 mujeres de 43-69 años del estudio Nurse's Healthy Study, la ingestión de AGPI omega 3 se asociaba con una reducción en las concentraciones circulantes de diversas moléculas de adhesión (ICAM-I, VCAM-I y E-selectina) (López-García *et al.*, 2004), reducen también la expresión de las interleucinas (IL-6, IL-8) en respuesta a diversos estímulos (IL-1, IL-4, TNF-α, LDL oxidadas o endotoxinas bacterianas, adhesión de los monocitos humanos a células endoteliales estimuladas por citosinas). El EPA también disminuye la expresión de IL-1b inducida por la COX-2 en las células endoteliales. Además, al reducir la producción de tromboxano A2 (TXA2) y prostaglandina E2 (PGE2), los AGPI omega 3 también disminuyen la producción de citoquinas pro inflamatorias (TNF-α, IL-1b) y la expresión de factores de crecimiento (derivado de las plaquetas, de unión a heparina, proteína quimiotáctica de monocitos, mieloperoxidasa, IL-10 y de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (NOS2), mientras que aumenta las concentraciones de peroxidasa en los monocitos (Caballero *et al.*, 2006).

Por otra parte, existen estudios que no han encontrado cambios significativos que conduzcan a un perfil antiinflamatorio de expresión de genes o marcadores de inflamación tal como en un estudio realizado en 24 personas sanas con IMC de 28 a 33 kg/m² donde se proporcionó una dieta con una cantidad de omega 3 equivalente a 125-250 mg/día de aceite de pescado, no encontró cambios en parámetros de expresión de genes y metabólicos en inflamación (PCR, IL-6, TNF, etc.) en tejido adiposo subcutáneo (Kratz *et al.*, 2013), en otro estudio de suplementación en personas de 35 a 60 años con un IMC de 18.5 a 29.9 kg/m² no hubo diferencias significativas en parámetros de inflamación como interleucina-6, receptor de adhesión selectina-E (sE-selectina), molécula soluble de adhesión intercelular (sICAM-1), molécula soluble de adhesión celular vascular (sVCAM-1) y proteína C reactiva (PCR) antes y después de la suplementación con 1.8 g/día

EPA y 0.3 g/día por 8 semanas sólo hubo diferencias significativas en las concentraciones de sICAM-1 **Tabla 1** (Yusof *et al.*, 2008).

Tabla 1. Estudios de intervención con aceite de pescado con AGPI omega 3 y sus efectos sobre inflamación

Referencia	Población	Intervención	Composición	Resultados
Zulyniak <i>et al.</i> 2013	Hombres adultos sanos 21-25 años n=10	3 meses de suplementación	EPA: 2 g/día DHA: 1 g/día	No se encontraron cambios en PCR
Kielcolt-Glaser <i>et al.</i> 2012	Adultos sanos jóvenes y mayores n=138	4 meses de intervención	1. 2.5 g/día AGPI omega 3 2. 1.25 g/día AGPI omega 3 3. Placebo capsulas	Disminuyen los niveles de IL-6 10% y 12% en las dosis baja y alta respectivamente
Nilsson <i>et al.</i> 2012	Adultos sanos 51-72 años n=40	5 semanas de intervención	3 g/día aceite de pescado con AGPI omega 3	No hay cambios en niveles de adiponectina
Bouwens <i>et al.</i> 2009	Adultos sanos > 65 años n=111	26 semanas de intervención Dosis alta (n=36), dosis baja(n=100), control(n=106)	Dosis alta: 1.8 g EPA/DHA día Dosis baja: 0.4 EPA/DHA día Control: aceite de girasol	La ingestión de EPA/DHA por 26 semanas puede cambiar la expresión de genes en un estado antiinflamatorio
Pot <i>et al.</i> 2009	Adultos sanos 50-70 años n=77	12 semanas de intervención	3.5 g/día de aceite de pescado con 1.5g/día de AGPI omega 3	No hubo cambios en IL-6
Yusof <i>et al.</i> 2008	Hombres adultos sanos 41-46 años n=21	8 semanas de intervención	EPA: 1.8 g/día DHA: 0.3 g/día	No hubo cambios en PCR e IL-6
Damsgaard <i>et al.</i> 2008	Adultos sanos n=64	8 semanas de intervención	5 mL/día de aceite de pescado con 3.1 g/día AGPI omega 3 Control: aceite de olivo	No se presentaron cambios en PCR, IL-6, adiponectina
Cazzola <i>et al.</i> 2007	Adultos sanos Jóvenes=93 Mayores= 62	12 semanas de intervención	1. Aceite de maíz 2. 1.35 g/día EPA 3. 2.7 g/día EPA 4. 4.05 g/día	Disminuye significativamente PCR, hay una tendencia de disminución para IL-6

2. Problema de investigación

En la actualidad existe un creciente interés por estudiar los efectos del consumo de ácidos grasos omega 3 en el desarrollo de enfermedades relacionadas con inflamación, y su potencial en la prevención de las mismas.

En general los datos existentes afirman que los ácidos grasos omega 3 tienen varios beneficios en la salud tales como asociarse a una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares, menor incidencia de cáncer de próstata, mejoramiento de la salud mental, disminución de ansiedad, disminución de la inflamación, entre otros, al revisar evidencia de la disminución de inflamación en personas sanas, hay resultados contradictorios del cambio de parámetros metabólicos relacionados con un efecto antiinflamatorio lo cual es debido a la amplia variación en el tipo de población, tiempo, fuente, dosis y tipo de suplementación, hasta nuestro conocimiento sólo un estudio se basa en la medición de la expresión de NFkB, molécula que interviene en diversas vías de señalización inflamatorias y control de citoquinas, en relación con la suplementación con omega 3, por lo anterior es necesario realizar mayor investigación, aportar más datos que puedan ser útiles para fortalecer o rechazar la evidencia hallada en otros estudios y obtener información acerca de los posibles mecanismos asociados a los beneficios que aporta la suplementación con aceite de pescado.

3. Justificación

Muchos son los estudios que se han realizado con suplementación de ácidos grasos poliinsaturados omega 3, sin embargo existe una gran variedad en el tipo de población, periodos de suplementación, etc. Los que están relacionados con la medición de parámetros de inflamación, se han realizado en una amplia variedad de células como tejido adiposo, macrófagos, células mononucleares entre otras, en la literatura revisada sólo un trabajo se enfoca en la medición de la expresión del gen NFkB en relación a la suplementación con omega 3, por lo cual se pretende medir la expresión de mRNA en NFkB en adultos jóvenes aparentemente sanos, antes y después de la suplementación con 2.7 g/día de aceite de pescado por seis semanas, y con ello analizar los cambios en las concentraciones de parámetros relacionados con la inflamación en adultos sanos para así tener mayor evidencia sobre los mecanismos por los cuales el consumo de aceite de pescado podría beneficiar la población aparentemente sana.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con 2.7 g/día de aceite de pescado en cápsulas, durante 6 semanas sobre la expresión del mRNA NFκB en células mononucleares en hombres adultos de 18 a 40 años aparentemente sanos para verificar variación en dicha expresión así como relación con factores de riesgo para enfermedades metabólicas.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Analizar la variación en la expresión del mRNA del gen NFκB en células mononucleares de hombres adultos de 18 a 40 años aparentemente sanos antes y después de la suplementación con 2.7 g/día/6 semanas de aceite de pescado en cápsulas.

4.2.2 Analizar la asociación entre la expresión de mRNA del gen NFκB y factores de riesgo para enfermedades metabólicas después de la suplementación con 2.7 g/día/6 semanas de aceite de pescado en cápsulas en células mononucleares de hombres adultos de 18 a 40 años aparentemente sanos.

5. Hipótesis

Los ácidos grasos omega 3 disminuyen la expresión de la molécula NFκB en células mononucleares en adultos sin enfermedad metabólica, por lo que el aumento de la disponibilidad de estos ácidos grasos mediante la suplementación diaria con 2.7 g de aceite de pescado en cápsulas durante seis semanas disminuye la expresión significativamente, y con ello parámetros de inflamación asociados, como la concentración de proteína C reactiva circulante, interleucina-6 y adiponectina.

6. Metodología

6.1 Diseño del estudio

Estudio piloto, exploratorio, prospectivo, cuasi-experimental, longitudinal, analítico.

Descripción de los sujetos, número y criterios de inclusión/exclusión

Se estimó el número de sujetos con el método de muestreo por conveniencia, de acuerdo a estudios previos que han tenido un número de entre 10 y 21 sujetos Zulyniak *et al.* (2013) y Yusof *et al.* (2008), teniendo así un número de 20 personas con los siguientes criterios de inclusión:

- Ser del sexo masculino
- Índice de masa corporal de 18.5 a 30 kg/m²
- No fumar más de 7 cigarros/semana
- No tomar más de 5 copas de bebidas alcohólicas/semana
- Sin diagnóstico médico de enfermedades crónicas
- No tomar medicamentos ni suplementos que puedan interferir con el estudio
- Realización de actividad física entre sedentaria y moderada

Diseño de variables

Variable independiente:

- Tratamiento consistente en 3 cápsulas con 2.7g (en total) de aceite de pescado, por día, por seis semanas.

Variable dependiente:

- Cambio en el nivel de expresión de mRNA del gen NFkB asociado al tratamiento.
- Cambio en la concentración de PCR en plasma asociado al tratamiento

Variables antecedente:

- IMC índice de masa corporal
- Edad
- Porcentaje de grasa corporal medido por impedancia bioeléctrica.
- Concentración de glucosa, lípidos en sangre e insulina.

6.2 Descripción del procedimiento de suplementación

El estudio consistió en una suplementación diaria vía oral durante seis semanas de 3 cápsulas del producto *Triple strength fish oil* de GNC *Preventive Nutrition*® (Ver **Anexo No. 1**), y se llevó a cabo en el consultorio de Nutrición y Metabolismo ubicado en la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se hizo una convocatoria por medio de carteles (Ver **Anexo No. 2**) colocados en diferentes puntos del sur de la Ciudad de México y al interior de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los sujetos fueron contactados vía correo electrónico, telefónica o presencial, se realizó el tamizaje para revisar si se cumplían los criterios de inclusión, y los sujetos que cumplieron con dichos requisitos fueron citados en tres ocasiones, al inicio del estudio (día 1), a la mitad (semana 3) y la última visita para concluir (semana 6).

En la primera visita se realizó:

- Lectura y firma del consentimiento informado

- Historia clínica: en la cual se incluyeron preguntas de estilo de vida, antecedentes personales y heredofamiliares patológicos, el sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de nutrimentos (SNUT) (Ver **Anexo No.3**), cuestionario recordatorio de los alimentos consumidos durante 24 horas con el método automatizado de pasos múltiples (Ver **Anexo No.4**)

- Mediciones antropométricas: todas las mediciones se realizaron de acuerdo a las técnicas de Lohman, la primera medida que se tomó fue la talla con un estadímetro de la marca comercial Seca®, se realizó de acuerdo a la técnica de Lohman en la cual, el sujeto debe estar descalzo y se coloca de pie con los talones unidos, las piernas rectas y los hombros relajados, los talones, cadera, escápulas y la parte trasera de la cabeza deben, en la medida de lo posible, estar pegadas a la superficie vertical en la que se sitúa el estadímetro, la cabeza deberá colocarse en el plano horizontal de Frankfort, el individuo debe inhalar

profundamente, contener el aire y mantener una postura erecta mientras la base móvil se lleva al punto máximo de la cabeza con la presión suficiente para comprimir el cabello. Además se tomó circunferencia de cintura en la que se localiza el nivel del punto más estrecho entre el último arco costal (costilla) y la cresta ilíaca, si la zona más estrecha no es aparente, entonces la lectura se realiza en el punto medio entre estas dos marcas, el evaluador se para en frente del sujeto para localizar correctamente la zona más estrecha o reducida, la medición se realiza al final de una respiración normal, con los brazos relajados a los costados del cuerpo. Se realizó la medición de la circunferencia abdominal a la altura de la cicatriz umbilical, el evaluador se coloca al costado derecho del sujeto, la medición se realiza al final de una respiración normal, con los brazos relajados a los costados del cuerpo.

-Determinación de la composición corporal: se realizó con el equipo InBody720®.

-Toma de muestra de sangre: se tomaron 25 mL. de sangre a los participantes de los cuales se realizó una alícuota de 3 a 5 mL. con el propósito de extraer suero por medio de la centrifugación a 3000 rpm/10 minutos, y enviarlo un laboratorio comercial y realizar la determinación de glucosa, perfil de lípidos, una alícuota de 1 mL para determinar hbA1c en un laboratorio comercial, otra alícuota de 4 mL. se envió al laboratorio de Unidad de Vinculación Científica Facultad de Medicina del Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN para posterior análisis de insulina, adiponectina, PCR, IL-6, por último una alícuota de 5 mL. sangre se utilizó para realizar la separación de plasma y células mononucleares con Ficoll® por gradiente de densidad y se congelaron a una temperatura de -80 °C para su posterior análisis en el laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN.

-Indicaciones para tomar el suplemento: se entregó al participante un frasco con 78 cápsulas suficientes para tres semanas, así como un diario en el cual cada participante registró el consumo diario del suplemento y efectos que llegaron a presentar.

En la segunda visita (semana 3) se realizaron los siguientes procedimientos:

-Recepción de diario y frasco proporcionado en la primera visita

-R24h

-Entrega de un nuevo frasco con 78 cápsulas y diario para las siguientes tres semanas.

En la tercera visita se realizaron los mismos procedimientos de la primera visita con excepción de la lectura y firma de consentimiento informado.

Una vez finalizado el reclutamiento de participantes, se realizó la extracción de ARN con Trizol®, estudios de expresión del gen NFkB, genes endógenos GAPDH, 18S y Beta actina, mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativo en el laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del INMEGEN. Así mismo se realizó el análisis de insulina, adiponectina, PCR, IL-6 mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA en el laboratorio de Vinculación Científica Facultad de Medicina-INMEGEN.

Extracción de células mononucleares

Inmediato a la toma de muestra de sangre, se procedió a separar las células mononucleares de acuerdo con el manual de protocolo de extracción con Ficoll®, se centrifugó la sangre total a 3500 rpm/15 minutos, después se separaron las células blancas y se agregó 250 µL. de HBSS (1X), las células se transfirieron a un tubo con 1mL. De Ficoll® y centrifugaron a 1800 rpm/40 minutos, se agregó 1mL. de HBSS(1X) a las células blancas, al final se lavó y centrifugó a 1700 rpm/10 minutos por triplicado.

Extracción de ARN

Se realizó después de descongelar las células mononucleares, de acuerdo al protocolo de extracción con Trizol®, solución mono fásica de fenol e isocianato de guanidina que actúa disolviendo los componentes celulares, manteniendo la integridad del ARN por medio de la separación de la muestra en dos fases,

acuosa y orgánica, el ARN permanece en la fase acuosa, las proteínas y DNA en la fase orgánica. Se agregó 1 mL. de Trizol® a las células mononucleares, se incubaron 5 minutos/15 a 30°C y posteriormente se agregaron 200 µL. de cloroformo, se centrifugó a 12000 gpm/15 minutos/4°C, después se extrajo la fase orgánica o transparente y se añadieron 500 µL. de alcohol isopropílico, se precipitó por 12 horas a -20°C, terminando dicho tiempo se centrifugó a 12000 gpm/10 minutos/4°C. Se lavó con etanol al 75%, 80% y 100% respectivamente y se centrifugó a 6000rpm/10 minutos/4°C por triplicado. Al finalizar se retiró y secó el exceso de alcohol. Se realizó la resuspensión en 50 µL. de agua libre de RNAsas. Se midió para determinar la absorbancia a 260 y 280 en el equipo Nanodrop™1000. La cuantificación de ARN se hizo con un espectrofotómetro de la marca NanoDrop®.

Análisis de expresión de genes

Se realizó a partir de una retrotranscripción con una concentración de 20ng/µL de RNA con de acuerdo al kit: Real-Time PCR system de Applied Biosystems® se agrega 4.5 µL. de Gene Expression Master Mix, 0.5 µL. de sonda, 0.5 µL. de cDNA, 4.5 µL. de agua libre de RNAsas por cada reacción. Toda reacción se realizó por duplicado. Las reacciones se analizaron por medio de la plataforma Viiia 7® como sistema de detección de fluorescencia mediante el método de cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). El control endógeno se determinó por medio del menor coeficiente de variación de los tres genes endógenos analizados, los cuales fueron de 3.19%, 4.22%, 10.66%, para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH, ARN ribosomal 18s 18S, y β -actina respectivamente, por lo cual se eligió a GAPDH.

6.3 Análisis estadístico

El análisis descriptivo consistió en estimar media, desviación típica, valores máximos y mínimos, se realizó la prueba de Kolgomorov-Smirnov en el paquete estadístico SPSS® para verificar la normalidad de las variables. La comparación de la expresión antes y después del tratamiento se realizó un análisis con la prueba T Student para muestras pareadas en el paquete estadístico SPSS®. Se

consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se realizó el cálculo de tamaño del efecto para la variable principal que fue la expresión de la molécula NFkB con la fórmula de Cohen. Adicionalmente con los datos que se obtuvieron del tamaño del efecto sobre la variable principal del estudio se calculó tamaño de muestra.

6.4 Consideraciones éticas

El presente estudio fue aprobado por los comités de ética, investigación y bioseguridad del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y el *Western Institutional Review Board* (WIRB). Así mismo cada participante firmó el correspondiente consentimiento informado (Ver **Anexo No. 5**) antes de participar en el estudio.

7. Resultados

De acuerdo a la evaluación antropométrica, bioquímica y clínica se reportan los siguientes resultados:

En la **Tabla 2**, se describen las principales características de composición corporal del grupo antes y después de la intervención. Se presentó una disminución significativa estadísticamente en el porcentaje de grasa, para el IMC no hubo cambio significativo, ni para la circunferencia de cintura.

Tabla 2. Composición corporal antes y después de la suplementación con aceite de pescado

Media y DE			
Parámetro	Basal	Final	P
IMC (kg/m ²)	24.58±2.42	24.41±2.40	NS
Circunferencia de cintura (cm)	85.66 ±6.33	85.52±6.54	NS
Grasa corporal (%)	22.53 ±4.13	21.14±4.44	0.004

Los parámetros de composición corporal fueron medidos dos ocasiones, basal en la semana 1 y final en la semana 6 después de la suplementación media±DE. Para determinar si la suplementación tuvo significancia fue utilizado el modelo estadístico T Student para muestras pareadas y una $p < 0.05$. NS=valor no significativo. n=20.

En la **Tabla 3**, se describen los parámetros bioquímicos antes y después del estudio. En la comparación de la toma de muestras basal y final no se observaron cambios significativos para glucosa, triacilglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y HDL, hbA1c e insulina ($p > 0.05$).

Tabla 3. Parámetros bioquímicos antes y después de la suplementación con aceite de pescado

Parámetro	Media y DE		
	Basal	Final	P
Glucosa (mg/dL)	86.79±6.21	86.92±6.91	NS
Triacilglicéridos (mg/dL)	95.86±47.51	104.28±89.95	NS
Colesterol total (mg/dL)	166.01±25.50	168.75±27.09	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	101.44±26.50	103.20±29.48	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	45.39±9.23	44.89±8.87	NS
HbA1c1 (%)	5.11±0.23	5.04±0.30	NS
Insulina (uIU/mL)	6.38±2.03	6.18±3.43	NS

Los parámetros bioquímicos fueron medidos dos ocasiones, basal en la semana 1 y final en la semana 6 después de la suplementación media±DE. Para determinar si la suplementación tuvo significancia fue utilizado el modelo estadístico T Student para muestras pareadas y una $p < 0.05$. NS= valor no significativo. n=20.

En la **Tabla 4** se describen los valores de parámetros indicadores de inflamación así como la expresión del mRNA de NFkB antes y después del programa de suplementación. No se presentaron cambios significativos en adiponectina, proteína C reactiva ni interleucina ($p > 0.05$), el mRNA de NFkB presentó una disminución de la expresión estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

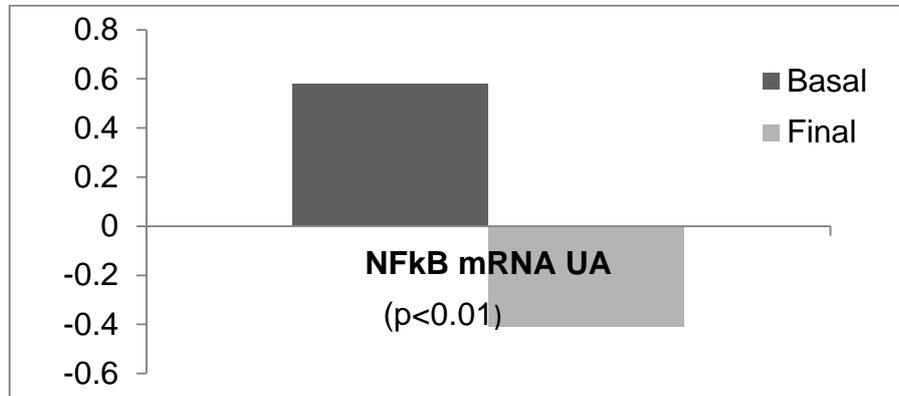
Tabla 4. Parámetros de inflamación antes y después de la suplementación con aceite de pescado

Parámetro	Media y DE		
	Basal	Final	P
Adiponectina (µg/mL)	2.42±1.04	2.84±1.50	0.155
Proteína C reactiva (µg/mL)	0.70±0.81	0.47±0.34	0.178
Interleucina 6 (µg/mL)	45.77±114.10	46.08±123.01	0.921
NFkB mRNA UA	0.58±0.34	-0.41±1.03	0.000

Los parámetros de inflamación fueron medidos dos ocasiones, basal en la semana 1 y final en la semana 6 después de la suplementación media±DE. Para determinar si la suplementación tuvo significancia fue utilizado el modelo estadístico T Student para muestras pareadas y una $p < 0.05$. n=20.

La **Figura 10** muestra el cambio de la expresión del mRNA de NFkB antes y después de la suplementación con aceite de pescado.

Figura 10. Expresión basal y final del mRNA de NFkB



8. Discusión

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de aceite de pescado sobre la expresión del mRNA de NFkB en células mononucleares en hombres adultos aparentemente sanos, con la hipótesis de que los ácidos grasos omega 3 disminuyen la expresión de la molécula NFkB en células mononucleares en adultos sin enfermedad metabólica, el aumento de la disponibilidad de estos ácidos grasos mediante la suplementación diaria con 2.7 g de aceite de pescado en cápsulas durante seis semanas, disminuye la expresión significativamente, y con ello parámetros de inflamación; para verificar lo anterior se realizaron mediciones en diferentes parámetros de inflamación, bioquímicos y de composición corporal.

Las características descriptivas al inicio del estudio fueron las siguientes: 50% de sujetos presentaron sobrepeso, de acuerdo a los valores de IMC establecidos por la OMS. El 30% tuvo una circunferencia de cintura por encima de los valores normales según la categorización de ATP III. El 100% de sujetos tuvo un valor normal para glucosa y hbA1c con respecto a lo recomendado por la *American Diabetes Association* (ADA). De acuerdo a la información del perfil de lípidos, se encontró que con respecto a triacilglicéridos el 10% de los sujetos obtuvieron valores superiores al parámetro normal, para el colesterol total el 15% se categorizó por encima de los criterios normales, el 45% de la población tuvo valores más altos de lo normal para el colesterol LDL, mientras que para el colesterol HDL el 40% tuvo niveles por debajo de lo recomendado de acuerdo al ATP III.

Con respecto al objetivo principal y la hipótesis, se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) en la expresión del mRNA de NFkB, lo cual concuerda con el único estudio que es similar en la medición de expresión de genes hasta lo que se ha descrito en la literatura, en el cual encontraron que la suplementación con EPA y DHA puede cambiar la expresión de genes incluido NFkB en un perfil anti inflamatorio (Bouwens *et al.*, 2009). Como se puede observar en la **Tabla 1** la

principal diferencia en el tipo de población con el presente estudio es la edad de los participantes, los sujetos del presente estudio son menores.

Las proteínas PCR ($p=0.178$) e IL-6 ($p=0.921$) no presentaron cambios significativos en el presente estudio, de igual forma tampoco se han encontrado cambios significativos en los estudios realizados por Yusof *et al.* (2008), Pot *et al.* (2009), y Zulyniak *et al.* (2013), que como se puede ver en la **Tabla 1** tienen una amplia variedad, en dosis de suplementación así como tiempo, por otra parte existen estudios que si reportaron cambios significativos, como lo descrito por Kielcolt-Glaser *et al.* (2012) y Cazzola *et al.* (2007), la n de los mencionados estudios es de 138 y 145 respectivamente, lo cual contrasta con los estudios que no han reportado cambios en PCR e IL-6 donde el estudio con mayor número de participantes es el realizado por Pot *et al.* (2009), con 77 participantes, parece ser que dicha característica es la principal diferencia entre el grupo de estudios que reportaron cambios y los que no reportaron cambios, independientemente de la variación en tiempo y dosis de suplementación. Por lo que probablemente sería necesario un número mayor de participantes para observar posibles cambios en PCR e IL6.

En lo que respecta a adiponectina, proteína producida por los adipocitos, la cual posee propiedades antiinflamatorias y de aumento a la sensibilidad a insulina, se ha visto en estudios prospectivos de cohorte que niveles circulantes elevados de adiponectina disminuyen el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria (Jason *et al.*, 2013), en el presente estudio no se observaron cambios significativos después de la intervención, tampoco encontraron cambios los estudios realizados por Nilsson *et al.*, (2012) y Damsgaard *et al.*, (2008) el primero realizó suplementación por 5 semanas con una dosis diaria de 3 g de aceite de pescado con omega 3 en 40 adultos sanos, el realizado por Damsgaard *et al.*, (2008) consistió en la suplementación por 8 semanas con 3.1 g/día de omega 3 en 64 sujetos. Otros estudios realizados en personas con datos de resistencia a la insulina, patologías coronarias, sugieren un aumento en los niveles de adiponectina posterior a suplementación con AGPI omega 3 (Mostowik *et al.*,

2013; Frankenberg *et al.*, 2014), en el presente estudio se realizó un análisis categorizando a los individuos con normopeso y sobrepeso sin embargo, no se presentaron diferencias en la respuesta a las diferentes variables bioquímicas y de expresión.

Derivado del objetivo principal en el presente estudio también se midieron otros parámetros como glucosa, insulina y hbA1c, no hubo cambios significativos para ninguno de los tres, lo cual es consistente con las intervenciones previas realizadas en adultos sanos donde tampoco se encontraron cambios las cuales se describen con detalle a continuación, la primera es en un estudio realizado por Bjorndal *et al.* (2007) en el cual se suplementó con 2.4 g de EPA y DHA por 14 días a 21 adultos jóvenes sanos y como resultado no se reportaron cambios en los niveles de insulina, otra es la intervención reportada por Raghu y Venkatesan (2008) en la que se realizó la suplementación con 1 g de aceite de pescado con 660 mg. de EPA/DHA por dos semanas en 20 hombres sanos no cambió los niveles de glucosa, en los trabajos realizados por Nilsson *et al.* (2012) y Damsgaard *et al.* (2008) no se encontraron cambios significativos para glucosa ni insulina, en lo reportado por Giacco *et al.* (2007) 3 meses con 3.6 g/día de omega 3 en 162 adultos no cambiaron los niveles de glucosa ni insulina, por último en la intervención reportada por Hlais, *et al.* (2013) al suplementar con aceite de pescado con dosis de 1, 2 y 4 gramos respectivamente a 112 sujetos por un periodo de 12 semanas no hay cambios significativos en glucosa, insulina y hbA1c. En intervenciones realizadas a personas con niveles normales de glucosa, insulina y hbA1c no se observan cambios significativos.

En el presente estudio no se observó una diferencia significativa en los niveles de triacilglicéridos ($p>0.05$), en contraste los estudios previos de suplementación con aceite de pescado con omega 3 si han reportado disminución en la concentración de triacilglicéridos específicamente los realizados por Nilsson *et al.* (2012), Zulyniak *et al.* (2013), Damsgaard *et al.* (2008) y Hlais, *et al.* (2013). Lo que es diferente en dichos estudios a comparación del presente es el tiempo de suplementación y las dosis.

Con respecto al colesterol en este estudio no se presentaron cambios significativos en colesterol total, LDL ni HDL, tampoco se han reportado cambios para colesterol total, HDL y LDL, en los trabajos de Damsgaard *et al.* (2008) y Hlais *et al.* (2013), el único estudio que presentó cambios en dichos parámetros fue el de Zulyniak *et al.* (2013) en el cual aumentó significativamente el colesterol HDL, sin embargo para LDL no se vieron cambios significativos. Los datos sugieren que sería necesario realizar más estudios para verificar el probable cambio en los niveles de colesterol.

En relación a parámetros de composición corporal, en el presente estudio no se encontraron cambios significativos en IMC, y circunferencia de cintura, pero si se observó un cambio significativo en el porcentaje de grasa ($p < 0.005$) que además fue el único parámetro que la mayoría de los sujetos (75%) presentaron niveles superiores de lo recomendado, en estudios previos realizados por Nilsson *et al.* (2012) y Zulyniak *et al.* (2013), tampoco se han visto cambios en peso e IMC. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada en el presente trabajo en personas sanas no hay estudios que midan circunferencia de cintura y porcentaje de grasa en relación a la suplementación con aceite de pescado, los estudios que han realizado mediciones en los mencionados parámetros han sido realizados en personas con síndrome metabólico o algunos de sus componentes de manera aislada y lo que se ha reportado es que existe una modesta pero significativa reducción de peso corporal, IMC, y porcentaje de grasa (Bender *et al.* 2014). Es necesario realizar más estudios para saber si el cambio en porcentaje de grasa tiene alguna relevancia clínica. Es de interés realizar investigaciones en población con características similares, ya que la mayor parte de estudios que miden composición corporal son en población con características de riesgo como resistencia a la insulina, o enfermedad coronaria.

En el presente estudio se realizó un cálculo del tamaño del efecto para la variable principal, expresión de la molécula NFkB, adicionalmente se calculó un número de muestra para la misma variable y el resultado son 8 sujetos, lo cual quiere decir que el presente estudio tiene suficiente poder estadístico para demostrar el

cambio en la expresión de la molécula NFkB sin embargo, no se observaron cambios en parámetros de inflamación, al ser hasta nuestro conocimiento el segundo estudio que mide la expresión de NFkB, sería necesaria mayor evidencia que refuerce dicho hallazgo, para determinar si estos cambios pueden tener una manifestación clínica de interés.

9. Conclusión

La suplementación diaria con 2.7 g de aceite de pescado en cápsulas durante seis semanas en adultos aparentemente sanos, disminuyó la expresión del mRNA de NFkB significativamente, los parámetros de inflamación como PCR, IL-6 y adiponectina, así como colesterol total, HDL y LDL no presentaron cambios significativos, en relación a otros estudios los resultados siguen siendo contradictorios. Las concentraciones de glucosa, insulina, hbA1c tampoco presentaron cambios, esto es consistente con estudios similares en personas sanas.

En lo que respecta a composición corporal se observó disminución significativa del porcentaje de grasa, es necesario realizar más estudios para saber si este cambio tiene alguna relevancia clínica, los demás parámetros, IMC, circunferencia de cintura no presentaron cambios.

La evidencia generada por este estudio sugiere que hay efectos a nivel de la expresión génica que se asocian a la disminución de la expresión del mRNA de NFkB, en estudios posteriores sería necesario determinar si estos cambios pueden tener una manifestación clínica de interés.

10. Bibliografía

- Arterburn L., Bailey E y Oken H. 2006. **Distribution, interconversion, and dose response of omega 3 fatty acids in humans.** *Am J Clin Nutr.* 83(suppl):1467S–76S.
- Bäckdahl L., Bushnell A., y Becka S. 2009. **Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation.** *Int J Bioch & Bio* 41: 176–184.
- Baeuerle P. A., Henkel T. 1994. **Function and activation of NFκB in immune system.** *Annu Rev Immunol.* 12:147-79.
- Bender N., Portmann M., Heg Z., Hofmann K., Zwahlen M. y Egger M. 2014. **Fish or n3-AGPI intake and body composition: a systematic review and meta-analysis.** *Obesity reviews.* 15: 657–665.
- Bjørndal B., Stran E., Gjerde J., Bohov P., Svardal A., Diehl B. W. K., Innis S. M., Berger A. y Berge R. K. 2014. **Phospholipids from herring roe improve plasma lipids and glucose tolerance in healthy, young adults.** *Lipids Health Dis.* 13:82.
- Bouwens, M., Van de Rest, O., Dellschaft, N., Grootte M., CPGM L., Geleijnse, J., Müller, M., y Afman, L. 2009. **Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells.** *Am J Clin Nutr* 90(2): 415-424.
- Brenna J. T., Sacks G. L. 2013. **Structure, Nomenclature, and Properties of Metabolism: Polyunsaturated Fatty Acids.** En: *Biochemical, Physiological and Molecular Aspects of Human Nutrition.* 3rd. Edition. (ed) M. H. Stipanuk y M. A. Caudill. Elsevier. USA. pp: 91, 416-21.

- Burillo, E., Mateo-Gallego, R., Cenarro, A., Fiddymment, S., Bea, MA., Jorge, I., Vázquez, J., y Civeira, F. 2012. **Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome.** *Lipids Health Dis.* 11: 116. DOI: 10.1186/1476-511X-11-116.
- Caballero R., Gómez R., Núñez L., Vaquero M., Tamargo J., y Delpón E. 2006. **Farmacología de ácidos grasos omega-3.** *Rev Esp Cardiol Supl.* 6:3D-19-D.
- Calder P. C. 2006. **Polyunsaturated fatty acids and inflammation.** *Prost L Fatty Acids.* 75: doi:10.1016/j.plefa.2006.05.012. 197–202.
- Cazzola R., Russo-Volpe S., Miles E. A., Rees D., Banerjee T., Roynette C. E., Wells S. J, Goua M., Wahle K. W., Cestaro B y Calder PC. 2007. **Age- and dose-dependent effects of an eicosapentaenoic acid-rich oil on cardiovascular risk factors in healthy male subjects.** *Atherosclerosis.* 193:159–167.
- Coronado H. M., Vega L. S., Gutiérrez T. R., García F. B y Díaz G. G. 2006. **Los ácidos grasos Omega-3 y Omega-6: Nutrición, bioquímica y salud.** *REB.* 25(3): 72-79.
- Cruz-Teno C., Pérez-Martínez P., Delgado-Lista J., Yubero-Serrano E. M., García-Ríos A., Marín C., Gómez P, Jiménez-Gómez Y., Camargo A., Rodríguez-Cantalejo F., Malago M. M., Pérez-Jiménez F., Roche M. H., y López-Miranda J. 2012. **Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study.** *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 854–865.
- Damsgaard C. T., Frøkiær H., Andersen A. D., y Lauritzen L. 2008. **Fish Oil in Combination with High or Low Intakes of Linoleic Acid Lowers Plasma Triacylglycerols but Does Not Affect Other Cardiovascular Risk Markers in Healthy Men.** *JN.* 3166:08. 1061-66.

- Dessì M., Noce A., Bertucci P., Manca di Villahermosa S., Zenobi R., Castagnola V., Addessi E., Di Daniele N. 2013. **Atherosclerosis, Dyslipidemia, and Inflammation: The Significant Role of Polyunsaturated Fatty Acids.** *Inflamm.* 12:191823.
- Giacco R., Cuomo V., Vessby B., Uusitupa M., Hermansen K., Meyer B.J., Riccardi G. y Rivellese A. A. 2007. **Fish oil, insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in healthy people: Is there any effect of fish oil supplementation in relation to the type of background diet and habitual dietary intake of omega 6 and omega 3 fatty acids?** *Nut Met Card Dis.* 17, 572e580.
- Gorjão R., Azevedo-Martins A., Hosana Gomes H., Abdulkader F., Arcisio-Miranda M., Procopio J., y Curi R. 2009. **Comparative effects of DHA and EPA on cell function.** *Pharm & Ther.* 122: 56–64.
- Guijarro C., y Egidoa J. 2002. **Atherosclerosis e inflamación: papel central del factor de transcripción NF-κB.** *Clin Invest Arterioscl.* 14(2):77-84.
- Hlais S., El-Bistami D., El Rahi B., Mattar M. A. y Obeid O. A. 2013. **Combined Fish Oil and High Oleic Sunflower Oil Supplements Neutralize their Individual Effects on the Lipid Profile of Healthy Men.** *Lipids.* 48:853–861.
- Hu J., La Vecchia C., DesMeules M., Negri E., Mery I. 2008. **Meat and fish consumption and cancer in Canada.** *Nutr Cancer.* 60: 313-324.
- Jason H. Y. W., Leah E. C., y Dariush M. 2013. **Effect of Fish Oil on Circulating Adiponectin: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.** *J Clin Metab.* 98(6):2451-2459.

- Johanna Napetschnig , Hao Wu . 2013. **Molecular Basis of NF-κB Signaling.** *Annu Rev Biophys.* 42: 443–468.
- Kalupahana, NS., Claycombe, KJ., y Moustaid-Moussa, N. 2011. **(omega 3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights.** *AdvNutr.* 2: 304–316. DOI: 10.3945/an.111.000505.
- Kiecolt-Glaser K. J., Belury A. M., Andridge R., Malarkey B. W., Seuk H. B., y Glaser R. 2012. **Omega-3 supplementation lowers inflammation in healthy middle-aged and older adults: A randomized controlled trial.** *Brain Immunity* 26: 988–995.
- Kratz M., Kuzma J. N., Hagman D. K., Yserloo B., Matthys C. C., Callahan H. S., y Weigle D. S. 2013. **n3 AGPIs Do Not Affect Adipose Tissue Inflammation in Overweight to Moderately Obese Men and Women.** *J Nutrition Immunology.* doi:10.3945/jn.113.174383.
- Lichtenstein A. H., Appel L. J., Brands M., Carnethon M., Daniel S., Franch H. A., Franklin B., Kris-Etherton P., Harris W. S., Howard B., Karanja N., Lefevre M., Rudel L., Sacks F., Van Horn L., Wiston M., Wylie-Rosett J. 2006. **Summary of American heart association diet and lifestyle recommendation revision 2006.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 2186-2191.
- Lohman T. G., Roche A. F., Martorell R. 1988. **Anthropometric standardization reference manual.** Champaign. IL: Human Kinetics.
- López-García E., Schulze MB., Manson JE., Meigs JB., Albert CM., y Rifai. 2004. **Consumption of (omega 3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women.** *J Nutr.* 134:1806-11.

- Martínez-Micaelo N., González A. N., Terra X., Richart C., Ardevol A., Pinent M., y Blay M. 2012. **Omega-3 docosahexaenoic acid and procyanidins inhibit cyclo-oxygenase activity and attenuate NF- κ B activation through a p105/p50 regulatory mechanism in macrophage inflammation.** *Biochem. J.* 441: 653–663.
- Massaro M., Scoditti E., Annunziata C. A., Rosa M. M., y De Caterina R. 2008. **Omega-3 Fatty Acids, Inflammation and Angiogenesis: Nutrigenomic Effects as an Explanation for Anti-Atherogenic and Anti-Inflammatory Effects of Fish and Fish Oils.** *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 1:4.
- Mostowik M., Gajos G., [Zalewski J.](#), [Nessler J.](#), [Undas A.](#) 2013. **Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery disease.** *Cardiovasc Drugs Ther.* 27(4):289-95. doi: 10.1007/s10557-013-6457-x.
- Nilsson A., Radeborg K., Salo I. y Björck J. 2012. **Effects of supplementation with omega 3 polyunsaturated fatty acids on cognitive performance and cardiometabolic risk markers in healthy 51 to 72 years old subjects: a randomized controlled cross-over study.** *JN.* 11:99.
- Perusse-Lachance E., Tremblay A., Drapeau V. 2010. **Lifestyle factors and other health measures in Canadian university community.** *Appl Physio Metab.* 35: 498-506.
- Pot G. K., Brouwer I. A., Enneman A., Rijkers G. T., Kampman E., Geelen A. 2009. **No effect of fish oil supplementation on serum inflammatory markers and their interrelationships: a randomized controlled trial in healthy, middle-aged individuals.** *Eur J Clin Nutr.* 63:1353–1359.

- Raghu B., y Venkatesan P. 2008. **Effect of omega 3 fatty acid supplementation on blood glucose, lipid profile and cytokines in humans: a pilot study.** *In J of Clin Biochemistry.* 23:1.85-88.
- Rangel-Huerta O. D., Aguilera C. M., Mesa M.D., y Gil A. 2012. **Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: a systematic review of randomised clinical trials.** *Brit J of Nutrition* 107: S159–S170.
- Robinson L. E., Mazurak V.C. 2013. **OMEGA 3 Polyunsaturated Fatty Acids: Relationship to Inflammation in Healthy Adults and Adults Exhibiting Features of Metabolic Syndrome.** *Lipids.* 48:319–332.
- Saswata T., Jerrold M., y Osborn O. 2011. **Targeting GPR120 and other fatty acid sensing GPCRs.** *Trends Pharmacol Sci* 32(9): 543–550.
- Saswata T., Olefsky M. J., y Osborn O. 2011. **Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases.** *Trends in Pharmacol Sci.* (32) 9: 543-550.
- Sijben J. W. C., Calder P. C. 2007. **Differential immunomodulation with long-chain omega 3 AGPI in health and chronic disease.** *Proceedings Nut Society.* 66:237–259.
- Teng K.T., Chang C.Y., Chang L.F., Nesaretnam K. 2014. **Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence.** *Nutr J.* 13:12. doi: 10.1186/1475-2891-13-12.
- **Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP).** Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute National Institutes of Health NIH Publication No. 02-5215. 2002.

- Tsitouras P. D., Gucciardo F., Salbe A.D., Heward C., Harman S.M. 2008. **High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL-6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults.** *Horm Metab Res.* 40:199–205.
- Vanden B.W., Matladi N.M., Hoya-Arias R., Dijsselbloem N., Gerlo S., y Haegeman G. 2006. **Keeping up NF-kB appearances: Epigenetic control of immunity or inflammation-triggered epigenetics.** *Biochem pharmacol.* 72: 1114 – 1131.
- Von Frankenberg A. D., Silva F. M., de Almeida J. C., Piccoli V., do Nascimento F. V., Sost M. M., Leitão C. B., Remonti L. L., Umpierre D., Reis A. F., Canani L. H., de Azevedo M. J., Gerchman F. 2014. **Effect of dietary lipids on circulating adiponectin: a systematic review with meta-analysis of randomised controlled trials.** *Br J Nutr.* 2014 Sep 5:1-16.
- Wall R., Ross P., Fitzgerald G., Y Stanton C. 2010. **Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids.** *Nutrition Reviews.* 68(5):280–289.
- Yusof H. M., Miles E. A., y Calder P. 2008. **Influence of very long-chain omega 3 fatty acids on plasma markers of inflammation in middle-aged men.** *P Leuk Essential Fatty Acids.* 78: 219–228.
- Zulyniak M. A., Perreault M., Gerling C., Spriet L. L., y Mutch D. M. 2013. **Fish oil supplementation alters circulating eicosanoid concentrations in young healthy men.** *Met clinical and experimental.* 62. 1107-1113.

11. Anexos

1. TRIPLE STRENGTH FISH OIL GNC Preventive Nutrition®

Etiqueta del producto con el cual se suplementará a los sujetos del estudio.

Triple Strength Fish Oil 120 Caps

ETIQUETA DE PRODUCTO

Fórmula elaborada con Aceite de Pescado, el cual contiene Acidos Grasos Omega 3. (EPA y DHA) Contiene Vitamina E.

Consumir 1 cápsula al día, con los alimentos.

Tamaño de la porción: 1 Cápsula.
Porciones por envase: 120

Cantidades por porción

Contenido energético	57 kJ (13,5 kcal)
Grasas (lípidos)	1,5 g
Carbohidratos (hidratos de carbono)	0 g
Proteína	0 g
Sodio	0 g
Aceite de pescado	900 mg
aporta:	
EPA Ácido eicosapentaenoico (Omega-3)	647 mg
DHA Ácido docosahexaenoico (Omega-3)	253 mg
Vitamina E	2 mg



2. PÓSTER

Publicidad que se empleará para fines de promoción del estudio.

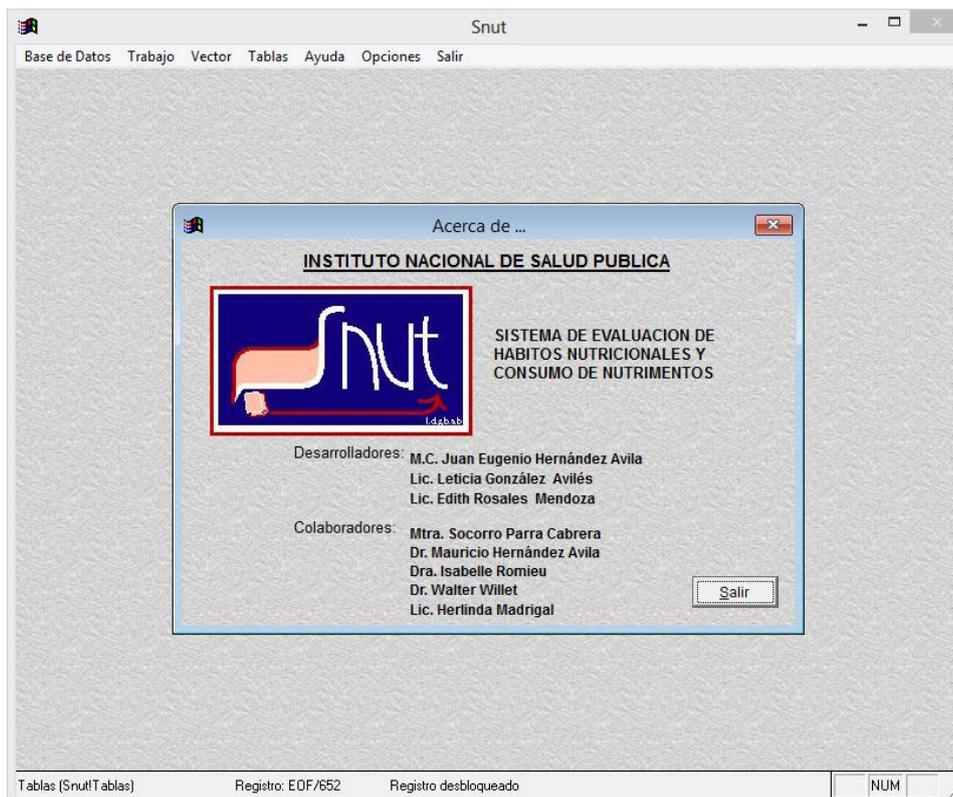
SE INVITA A ADULTOS MEXICANOS
entre 18 y 40 años a
participar en el estudio
sobre
**“EL EFECTO DE LOS
ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3 EN LA SALUD”**
el cual se llevará a cabo en
el consultorio de Nutrición
y Metabolismo ubicado en
el 3^{er} piso de la Torre de
Investigación.

¡PARTICIPA!
y obtén sin
costo tu
diagnóstico
nutricional y un
programa para
controlar tu
peso.

INFORMES:
Tel.: 56232254
Email:
labnutricionymetabolismo@gmail.com

3. SISTEMA DE EVALUACIÓN DE HÁBITOS NUTRICIONALES Y CONSUMO DE NUTRIMENTOS (SNUT)

El cuestionario empleado para la estimación de la ingesta diaria contiene 122 preguntas, los alimentos están agrupados en: lácteos, frutas, vegetales, carnes, carnes procesadas, pescados, refrescos, dulces, cereales y panes. Cada alimento tiene una porción predeterminada y 10 opciones de frecuencia de consumo, que van desde “Nunca” hasta “Seis veces al día”. El cálculo del consumo de nutrientes específicos se estimará con el programa de cómputo SNUT desarrollado por el INSP.



4. CUESTIONARIO RECORDATORIO DE LOS ALIMENTOS CONSUMIDOS DURANTE 24 HORAS CON EL MÉTODO AUTOMATIZADO DE PASOS MÚLTIPLES

El método automatizado de pasos múltiples (MAPM) es un método computarizado para recoger sistemáticamente los cuestionarios recordatorios de los alimentos ingeridos en 24 horas mediante entrevista por teléfono o en persona. El personal de terreno sigue cinco pasos basados en investigaciones para mejorar un recuerdo completo y exacto de los alimentos ingeridos y reducir la carga para los entrevistados (véase más abajo). Hay más información acerca de este método en el sitio web del Departamento de Agricultura y Ganadería de los Estados Unidos: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=7710>

Paso 1	Lista rápida: todo que comió o bebió ayer
Paso 2	Alimentos olvidados: lista de alimentos que se olvidan a menudo, como café, té, bebidas gaseosas, leche, jugo, agua
Paso 3	Hora y situación: desayuno, almuerzo, cena, merienda
Paso 4	Detalles: Tipos, por ejemplo, pan (blanco, integral, de centeno, etc.). Cantidades como número, tamaño de una unidad (usar imágenes y maquetas)
Paso 5	Investigación final: Cualquier otra cosa, incluso en cantidades pequeñas, por ejemplo en reuniones, mientras compra, mientras cocina, etc.

5. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ID del proyecto de investigación: 11.16.NRC (DUND-100551)

Patrocinador Nestec Ltd
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey
Suiza

Núm. del participante _____

Nombre _____ del _____ participante:

Por favor lea todo el documento antes de decidir si acepta participar en el estudio. Usted es libre de elegir si quiere participar o no en el estudio. En caso de que decida no participar en el estudio, no habrá sanciones ni pérdidas de beneficios. Tómese el tiempo necesario para leer este documento y consulte con sus amigos o familiares sobre el proyecto.

Este documento tiene el objetivo de explicar la manera en la que usted puede participar en el protocolo de estudio.

1. TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

"Efecto del consumo de suplementos de aceite de pescado en parámetros metabólicos"

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO PRINCIPAL DEL ESTUDIO

El aceite de pescado tiene un contenido muy alto de ácidos grasos omega 3 que tienen efectos benéficos para la salud. Se ha observado que, en algunas personas, el consumo de ácidos omega 3 mejora los parámetros de lípidos en sangre, disminuye algunas formas de inflamación y mejora la función de la insulina. Sin embargo, esos efectos varían según la persona. En este proyecto, nos interesa estudiar a personas saludables de entre 18 y 40 años, que no sean mujeres embarazadas o lactantes ni personas que consuman

Edición revisada_20 de Septiembre de 2013 Pág. 1 de 13 Iniciales del participante _____



medicamentos o vitaminas, al menos por un mes antes de comenzar el estudio. El propósito del estudio es saber si el consumo de un suplemento de aceite de pescado durante 6 semanas afecta la manifestación de un gene en células sanguíneas o afecta la cantidad de lípidos sanguíneos u otros factores importantes para la salud. Las células sanguíneas serán utilizados para obtener el material genético ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Ambos se utilizarán para estudiar la activación de algunos genes. Luego de llevar a cabo esas valoraciones, el ADN se conservará en el biobanco del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), y podrá utilizarse en estudios para investigar otras variantes genéticas que resulten del consumo de aceite de pescado. No se utilizará su nombre en ninguna de las pruebas genómicas; en su muestra de sangre no se incluirá información personal: sólo tendrá un código con un número de serie para evitar la posibilidad de ser reconocido. Una vez iniciado el estudio, ya no es posible devolver las muestras. El número de serie que identifica las muestras sólo estará disponible para los investigadores principales del estudio, quienes están obligados por ley a mantener la confidencialidad de su identidad. Los números de serie estarán protegidos bajo medidas estrictas de seguridad en una oficina cerrada de la Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en el INMEGEN. Sólo los investigadores principales del estudio tienen permiso para ingresar a esa oficina. Toda la información que se obtenga en el estudio se guardará bajo las mismas medidas de seguridad y confidencialidad. Los investigadores principales serán los únicos que tendrán acceso a información donde conste su nombre. Si decide participar en este estudio, se le extraerá sangre, en ayunas, antes de consumir el suplemento comercial "Fish oil triple strength" (aceite de pescado de triple potencia) y también luego de haberlo consumido durante 6 semanas. En cada consulta, usted recibirá una cantidad suficiente de suplementos para cubrir un periodo de 3 semanas.

No tendrá que pagar ninguna prueba que se realice ni tampoco recibirá dinero por su participación en este estudio. En su lugar, recibirá un análisis sanguíneo, un plan alimenticio (al término del estudio), y una evaluación de su composición corporal. Usted podrá solicitar consultas de seguimiento de su estado nutricional hasta seis meses

Edición revisada_20 de Septiembre de 2013 Pág. 2 de 13 Iniciales del participante _____



después de terminada su participación, sin costo para usted. El suplemento de aceite de pescado será gratis. En la segunda consulta, una nutrióloga le entregará y le explicará los resultados de sus evaluaciones. Cuando finalice la semana 6, se completen las consultas y se cumpla el protocolo del estudio, recibirá como agradecimiento la asesoría nutricional mencionada antes.

3. PROTOCOLO Y PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Lea detenidamente todos los siguientes puntos en los que se explica el protocolo y los procedimientos del estudio.

3.1 El estudio consistirá en tres consultas en un periodo de 6 semanas. La primera consulta durará aproximadamente una hora. En esa consulta, un médico le extraerá una muestra de sangre (25 ml de sangre). Para realizar la extracción, usted deberá estar en ayunas. El médico utilizará materiales nuevos y desechables, se medirá su presión arterial, se le pedirá información sobre sus antecedentes médicos, se le harán preguntas para evaluar sus hábitos alimentarios y de actividad física (el coordinador del estudio completará formularios, como el cuestionario sobre actividad física, el de frecuencia de consumo de alimentos y el que indica la alimentación en las últimas 24 horas), y se realizará una evaluación de su composición corporal para esto, le pedirán que use bata desechable para tomar sus medidas corporales. Se analizará su composición corporal con el equipo inBody, se medirá su estatura con un estadímetro, su peso con una báscula, y se registrará la circunferencia de su cintura.

3.2 . Además, recibirá una cantidad suficiente de suplementos para las siguientes tres semanas. La segunda consulta será de, aproximadamente, treinta minutos. En esa consulta, se le informará sobre sus resultados de composición corporal y análisis sanguíneo, recibirá la cantidad de suplementos necesarios para cubrir el tratamiento de 3 semanas y deberá completar cuestionarios sobre su actividad física y la alimentación de las últimas 24 horas. En la última consulta, se le extraerá una muestra de sangre y se realizará una segunda evaluación de su composición corporal y presión



arterial. En esa visita, deberá volver a completar varios cuestionarios (sobre la actividad física y sobre la alimentación durante las últimas 24 horas). Todas las consultas tendrán lugar en la Clínica de Nutrición del Laboratorio de Nutrición y Metabolismo de la Facultad de Medicina de la UNAM.

- 3.3 En la segunda y tercera consultas en la clínica, usted deberá entregar el frasco de suplementos que recibió en la consulta anterior. Ese frasco debe estar vacío o contener las píldoras que no consumió.
- 3.4 En la primera y tercera consultas en la clínica, le pedirán que use bata desechable para tomar sus medidas corporales. Se analizará su composición corporal con el equipo inBody, que se basa en la impedancia bioeléctrica, se medirá su estatura con un estadímetro (dispositivo graduado que se monta en la pared), su peso con una báscula, y se registrará la circunferencia de su cintura. La medición de composición corporal (masa grasa y masa muscular) por medio de impedancia bioeléctrica es un método seguro y poco invasivo. El cuerpo está compuesto de diversos tejidos (masa grasa, masa muscular, hueso, etc.) que conducen la corriente eléctrica de forma diferente. Al hacer pasar una pequeña corriente eléctrica por el cuerpo de manera insensible, se puede medir la resistencia eléctrica de estos tejidos y se puede calcular el porcentaje que representan del peso total de una persona.
- 3.5 En la primera y tercera consultas, un médico le extraerá una muestra de sangre (25 ml de sangre). Para realizar la extracción, usted deberá estar en ayunas. El médico utilizará materiales nuevos y desechables. En caso de sentir molestias, informe de inmediato a los investigadores del estudio. En ambas visitas, también se medirá su presión arterial.
- 3.6 En la primera visita, deberá completar, por única vez, un cuestionario sobre sus antecedentes médicos y hábitos alimentarios (frecuencia de consumo de alimentos).
- 3.7 En la segunda consulta, recibirá los resultados de los análisis y mediciones antropométricas.
- 3.8 El protocolo del estudio consistirá en dosis seguras de aceite de pescado suplementario como un producto comercial de la mejor calidad. La dosis no produce daños



en voluntarios sanos, pero es posible que el tiempo de sangrado aumente. Por lo tanto, se debe excluir del estudio a los voluntarios con problemas de coagulación. El investigador será quien entregue las dosis, y usted tomará sólo una dosis diaria del suplemento de aceite de pescado durante 6 semanas. No cambiará su dieta ni ningún otro hábito durante todo el estudio.

- 3.9 Cuando finalice la semana 6, se completen todas las consultas y se cumpla el protocolo del estudio, recibirá de forma gratuita asesoría nutricional por hasta 6 meses.
- 3.10 La muestra de sangre se utilizará para extraer el ARN y estudiar la manifestación de un gen, y para extraer el ADN e identificar las variantes genéticas relacionadas con el desarrollo de enfermedades crónicas.
- 3.11 Toda su información personal es estrictamente confidencial; nadie podrá tener acceso a ella, con excepción de los investigadores directamente involucrados en el estudio. La información se utilizará sólo para los fines de la investigación.

4. POSIBLES RIESGOS ASOCIADOS

- Malestar o hematomas en el lugar del brazo donde se insertó la aguja para extraer sangre.
- Aumento discreto del tiempo de sangrado.

5. BENEFICIOS

- Análisis de sangre gratuitos con resultados de lípidos y glucosa.
- Evaluación gratuita de la composición corporal por impedancia bioeléctrica con el equipo InBody.
- Asesoramiento nutricional gratuito durante seis meses, luego de concluir el estudio.

6. ¿QUÉ SUCEDE SI SE CONOCE NUEVA INFORMACIÓN? ¿SE COMPARTIRÁN LOS RESULTADOS?



Durante el estudio, es posible que se conozca nueva información que afecte el tema bajo estudio. En caso de que eso suceda, le avisaremos y le preguntaremos si desea continuar el estudio. Nos reservamos el derecho de retirarlo del estudio si se considera que eso es lo mejor para usted. Si su participación finaliza en forma anticipada, tal vez, se le pida regresar para concluir las pruebas del estudio y para proteger su seguridad.

Si se detiene el estudio por algún motivo, le avisaremos y se tomarán las medidas necesarias para que la asesoría nutricional gratuita propuesta como agradecimiento a su participación en el estudio, se lleve a cabo.

Usted podrá abandonar el estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones ni incurrir en responsabilidad alguna.

7. CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida en este estudio será tratada de manera estrictamente confidencial. No se dará información personal que lo identifique a ninguna persona que no esté directamente involucrada en el estudio.

Las muestras de sangre obtenidas en el estudio se utilizarán para analizar el ADN y ARN, para identificar los metabolitos en el plasma y, tal vez, para realizar otros estudios similares. Sin embargo, la historia clínica y la información obtenida durante el estudio serán revisadas por representantes autorizados de Nestlé. Solo se entregarán a Nestlé el número de participante que usted tiene asignado y sus iniciales. Es posible que los archivos y la información sean inspeccionados por la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM y otras autoridades regulatorias. Por lo tanto, usted nos autoriza a divulgar su historia clínica ante Nestlé, sus empleados o agentes, las autoridades sanitarias nacionales y extranjeras, y la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las historias clínicas serán utilizadas por ellos sólo en el ejercicio de sus obligaciones relacionadas con este estudio clínico.

Cualquier información acerca de los resultados de sus pruebas o su estado de salud que resulte de su participación en este estudio será estrictamente confidencial. **Recibirá una notificación sobre cualquier hallazgo importante para su salud o para su participación continua**

Edición revisada_20 de Septiembre de 2013 Pág. 6 de 13 Iniciales del participante _____



en este estudio, pero esa información no será divulgada a terceros, además de los que ya se mencionaron, sin su permiso escrito. La única excepción a esta regla serán los casos de enfermedades contagiosas en las que es obligatoria la notificación a la Secretaría de Salud. En ese caso, le informaremos que debemos divulgar la información ante el órgano estatal autorizado.

8. CONTACTO

Si desea obtener cualquier información sobre sus derechos como participante de la investigación o si desea presentar quejas sobre este estudio, comuníquese con el Dr. Jaime Mas Oliva, presidente de la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, al 56232402. El Comité fue creado para ayudar a proteger los derechos de quienes participan en proyectos de investigación.

Para obtener información sobre la investigación, comuníquese con el Dr. Felipe Vadillo Ortega, investigador principal de este estudio, al 53501900 ext. 1177 del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

9. RESTRICCIONES

El estudio se ha estructurado de acuerdo con la Declaración de Helsinki (última actualización: octubre de 2008 www.conamed.gob.mx/prof_salud/pdf/helsinki.pdf), que trata sobre las recomendaciones para orientar a los médicos que realizan investigaciones biomédicas en seres humanos según el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/index-t1.htm). Puede obtener una copia si desea revisarlo.

Éste es un estudio experimental sobre nutrición, no una investigación médica. Por lo tanto, no será registrado en una base de datos nacional. Nestlé contrató un seguro con la aseguradora Zurich Insurance Company que cubre cualquier daño que puedan sufrir los participantes de este estudio. En el caso de que se enferme como resultado directo de la participación en este estudio, consiga atención médica de inmediato y notifique al Investigador del estudio. Usted o su compañía de seguros serán responsables de cubrir los gastos iniciales para recibir la atención médica necesaria. Nestec, S.A. ha proporcionado el seguro a este

Edición revisada_20 de Septiembre de 2013 Pág. 7 de 13 Iniciales del participante _____



estudio y proporcionará el reembolso de la asistencia médica a su abastecedor de seguros, institución o médico tratante directamente. No habrá pagos de compensación como pago de salarios o días laborales perdidos.



Documento de consentimiento

Título del estudio: "Efecto del consumo de suplementos de aceite de pescado en parámetros metabólicos"
Número del estudio: 11.16.NRC (DUND-100551)
Nombre del investigador: Dr. Felipe Vadillo Ortega
Institución: Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina de la UNAM en el INMEGEN, México DF.

Participante del estudio

Apellido: _____ Nombre: _____

Fecha de nacimiento: _____

Dirección: _____

Confirmando que (seleccione lo que corresponda):

- He leído el consentimiento informado del estudio.
- He recibido explicación sobre la naturaleza, los propósitos, la duración, los efectos y los riesgos relacionados con el estudio. Sé lo que debo hacer durante el proceso del estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias a todas mis preguntas sobre el estudio.
- Acepto formar parte de este estudio, cooperaré plenamente con la investigadora y me comunicaré con ella, en caso necesario.
- Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria y que puedo negarme a participar. También entiendo que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, si lo deseo, sin sufrir consecuencias.
- Asimismo, entiendo que recibiré notificación, lo antes posible, si surge información especial que pudiera cambiar mi decisión de participar en el estudio.

Edición revisada_20 de Septiembre de 2013 Pág. 9 de 13 Iniciales del participante _____



- Acepto que los resultados que surjan del estudio sean divulgados sin mencionar mi nombre y dirección y que mi información personal siempre sea confidencial.
- Acepto que el material genético (ADN) que se obtendrá de la muestra de mi sangre pueda almacenarse y utilizarse en estudio futuros similares.
- Entiendo que la aseguradora Zurich Medical Insurance sólo cubre los daños a la salud que pudieran resultar de mi participación en esta investigación.
- Acepto que los investigadores principales de este estudio conserven mi información personal de contacto y me inviten a participar en proyectos de investigación futuros.



Firma del testigo 2
y hora

Fecha

Firma del investigador:

A mi juicio, el participante proporciona voluntaria y conscientemente su consentimiento informado y posee la capacidad legal de hacerlo para participar en este estudio de investigación.

Nombre del investigador

Firma del investigador
y hora

Fecha

Edición revisada_20 de Septiembre de 2013 Pág. 12 de 13 Iniciales del participante _____