



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación de la ingesta de proteína de amaranto
en pez cebra (*Danio rerio*) en modelos de
obesidad sana y no sana inducidos por dieta”**

Tesis que presenta

Selma Sofía Torres Valles

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Evaluación de la ingesta de proteína de amaranto en pez cebra (Danio rerio) en modelos de obesidad sana y no sana inducidos por dieta**” presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Selma Sofía Torres Valles** y aprobada el **28 de junio de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Luis Roberto Rodríguez Ortiz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio de León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

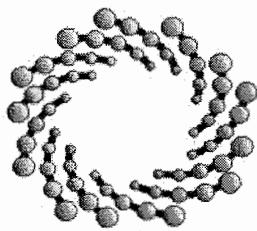
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 1007039 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 222 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2021, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez

Presidente

IPICYT

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Secretario

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Selma Sofía Torres Valles

sobre la Tesis intitulada:

*Evaluación de la ingesta de proteína de amaranto en pez cebra (*Danio rerio*) en modelos de obesidad sana y no sana inducidos por dieta*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

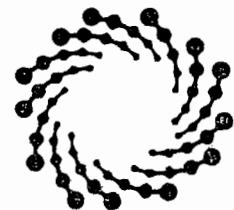
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:33 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2021.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por la oportunidad y apoyo para implementar un nuevo modelo de estudio en su grupo de investigación.

Al Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz y al laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del INB-UNAM por su asesoría y por proporcionar especímenes de nuestro modelo de estudio.

Al resto de mi comité tutorial por su asesoría y comentarios en este trabajo.

A la Dra. Araceli Patron Soberano por el apoyo en el trabajo de histología y microscopía.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Guillermo, Iván y Oscar por sus consejos y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A los técnicos, el M. C. Alberto Barrera y el Dr. Víctor Balderas, por su asesoría y amabilidad durante mi trabajo en el laboratorio.

Al coordinador de la DBM, el Dr. Sergio Casas, por hacer su mayor esfuerzo al atender nuestras solicitudes y mantener a flote el posgrado durante la pandemia.

A los profesores y el resto del personal del IPICYT por hacer posible que el posgrado mantuviera su excelente nivel educativo a pesar del aislamiento y el trabajo a distancia.

Al CONACYT e IPICYT por la beca y el espacio otorgado.

Especialmente a Teresa Paz por su cariño y apoyo incondicional,

y a mi madre por su amor, buenos deseos y soporte desde la distancia.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCION	1
1.1 La obesidad una problemática mundial	1
1.2 Alimentos nutraceuticos y amaranto	2
1.3 Modelos de estudio de obesidad	4
1.4 El pez cebra como modelo de estudio de obesidad	6
1.5 Efecto de compuestos nutraceuticos en el modelo del pez cebra	9
II. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos especificos	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Preparación de alimento	12
3.2 Animales y crianza	12
3.3 Experimento de alimentación	13
3.4 Registro del Índice de Masa Corporal e Índice Hepatosomático	14

3.5 Perfil de lípidos en sangre	15
3.6 Histología	15
3.6.1 Preparación, inclusión y seccionamiento de tejido	15
3.6.2 Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E)	16
3.6.2 Tinción con Rojo Oleoso (ORO)	17
3.7 Análisis estadísticos	17
IV. RESULTADOS	18
4.1 Crecimiento y registro de Índice de Masa Corporal	18
4.2 Índice hepatosomático y perfil de lípidos en sangre	21
4.3 Análisis histológico e histopatología del hígado	22
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	33
VII. PERSPECTIVAS	34
VIII. REFERENCIAS	35

Lista de Tablas

Tabla 1	Régimen experimental de alimentación	14
----------------	--------------------------------------	-----------

Lista de Figuras

Figura 1	Diseño experimental de crianza y administración de tratamientos en peces cebra.	13
Figura 2	Administración de proteína de amaranto en modelo de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana en pez cebra.	18
Figura 3	Evaluación del IMC en modelo de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana, tras la administración de proteína de amaranto.	20
Figura 4	Evaluación del índice hepatosomático en modelo de obesidad metabólicamente sano y metabólicamente no sano, tras la administración de proteína de amaranto.	21
Figura 5	Evaluación de colesterol y triglicéridos en plasma en modelo de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana, tras la administración de proteína de amaranto.	22
Figura 6	Evaluación histológica por tinción H&E en pez cebra completo.	23
Figura 7	Evaluación histológica por tinción H&E en zona visceral de pez cebra	24
Figura 8	Evaluación histológica por tinción H&E en hígado de pez cebra	26
Figura 9	Evaluación histológica por tinción ORO en modelo de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana, tras la administración de proteína de amaranto.	27

Resumen

Evaluación de la ingesta de proteína de amaranto en pez cebra (*Danio rerio*) en modelos de obesidad sana y no sana inducidos por dieta

La obesidad es una pandemia de relevancia mundial que conlleva riesgos de desarrollar diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, los procesos fisiológicos involucrados en la obesidad no se conocen en su totalidad por lo que se siguen realizando numerosos estudios. El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de la administración de proteína de amaranto en pez cebra, en modelos de obesidad metabólicamente sana (OS) y no sana (ONS) inducidos por dieta. Se formaron grupos de peces cebra en condiciones control, OS y ONS, así como con suplemento de amaranto. El grupo control (C) se alimentó con 5 mg cistos/pez; el grupo OS recibió una dieta de 60 mg cistos/pez y la dieta del grupo ONS consistió en 5 mg cistos/pez + 30 mg yema de huevo. La proteína de amaranto (A) fue administrada *ad libitum* en los grupos C+A, OS+A y ONS+A antes de dar la dieta correspondiente a su grupo. Durante las 8 semanas de tratamiento, diferentes parámetros fueron analizados, incluyendo el índice de masa corporal (IMC), lípidos en sangre, índice hepatosomático (IHS) e histopatología hepática y de grasa visceral. Los resultados demostraron la inducción de OS y ONS en peces cebra observada por el incremento del IMC y el IHS, así como la acumulación de tejido graso visceral y esteatosis hepática. La administración de proteína de amaranto inhibió el crecimiento en el grupo con dieta normal (C+A) y causó mayor crecimiento en los grupos con dieta hipercalórica (OS+A y ONS+A). Adicionalmente, disminuyó el desarrollo de esteatosis hepática tras la administración de amaranto. Estas evidencias demuestran la capacidad nutracéutica del amaranto y confirman que el cambio de dieta es otro factor importante en la mejora de la salud. Sin embargo, es necesario realizar estudios a nivel molecular para analizar los cambios ejercidos por el consumo de amaranto tales como el estado inflamatorio y hormonas relacionadas con obesidad.

Palabras clave: Amaranto, Nutracéutico, Obesidad sana, Obesidad no sana, Pez cebra.

Abstract

Evaluation of amaranth protein intake in zebrafish (*Danio rerio*) in diet-induced healthy and unhealthy obesity models

Obesity is a globally significant pandemic, which carries risks of developing diabetes mellitus and cardiovascular diseases. However, the physiological processes involved in obesity are not fully understood, which is why numerous studies continue to be carried out. In this sense, zebrafish has emerged as a model for obesity studies. On the other hand, there is evidence that amaranth protein consumption can regulate the inflammatory state in obese mice as well as the levels of obesogenic hormones. The objective of the present work was to analyze the effects of the administration of amaranth protein in zebrafish in diet-induced metabolically healthy obesity (MHO) and metabolic unhealthy obesity (MUO) models. Groups of zebrafish were formed under control (C), MHO and MUO conditions, as well as with amaranth (A) supplement. The C group was fed with 5 mg cysts/fish, the MHO group received a diet of 60 mg cyst/fish, and the diet of MUO group consisted of 5 mg cyst + 30mg egg yolk/fish. Amaranth protein was administered *ad libitum* in groups C+A, MHO+A, and MUO+A before giving the corresponding diet to their group. During the eight weeks of treatment, a variety of parameters were analyzed, including body mass index (BMI), blood lipids, hepatosomatic index (HSI), and liver and visceral histopathology. Present results demonstrated the induction of MHO and MUO in zebrafish observed by the increase of BMI, HSI, and the accumulation of visceral and liver fatty tissue. The administration of amaranth protein inhibited growth in the group with normal diet (C+A) and caused greater growth in the groups with hypercaloric diet (MHO+A and MUO+A). Additionally, the development of hepatosteatosis decreased after the administration of amaranth protein. This evidence demonstrates the nutraceutical capacity of amaranth and indicates that the change of diet is an important factor for health improvement. However, it is necessary to carry out studies at a molecular level to observe the changes exerted by amaranth consumption, such as the inflammation state and changes of obesogenic hormones.

Keywords: Amaranth, MHO, MUO, Nutraceutical, Obesity, Zebrafish.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La obesidad una problemática mundial

La obesidad es uno de los problemas actuales de Salud Pública más importantes, presentando una alta prevalencia en numerosos países alrededor del mundo. En las últimas décadas los casos se han triplicado, según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2020) más de 1900 millones de adultos presentan sobrepeso y más de 650 millones obesidad, representando el 39% y 13% de la población mundial respectivamente.

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial que implica factores ambientales y de comportamiento, así como factores genéticos y complejas interacciones entre ambos (OMS 2000). Se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo y en consecuencia un aumento desmedido de peso corporal (Dávila-Torres et al. 2015). Esta condición ocurre cuando en los individuos existe un desequilibrio entre las calorías ingeridas y el gasto energético del organismo (OMS 2006).

La obesidad tiene numerosas implicaciones, pues se le ha asociado con diversos trastornos que llevan al deterioro de la salud, resultando en el incremento del riesgo de padecer diabetes mellitus (Folsom et al. 1996), enfermedades cardiovasculares (Klein et al. 2004), hígado graso no alcohólico, enfermedades metabólicas, trastornos del aparato locomotor, complicaciones respiratorias y cáncer, entre otras enfermedades (Kopelman 2000). En la última década, se ha propuesto que, dependiendo de la distribución de grasa corporal y el fenotipo del tejido adiposo, las personas obesas podrían diferir en su susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la obesidad. Por ejemplo, la obesidad metabólicamente no sana (ONS), en comparación con el fenotipo de la obesidad metabólicamente sana (OS), presenta resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia, función hepática alterada y una distribución perjudicial del tejido adiposo con más grasa visceral, mayor tamaño de adipocitos y más procesos inflamatorios (Iacobini et al. 2018).

La OMS (1995, 2020) implementó el valor de Índice de Masa Corporal (IMC) para categorizar y evaluar el peso corporal. El IMC se calcula como el peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado ($\text{IMC} = \text{kg}/\text{m}^2$). Las cuatro categorías propuestas del IMC son: desnutrición ($<18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$), normopeso ($18.5\text{-}24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$), sobrepeso ($25\text{-}29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$) y obesidad ($\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$). A nivel global, el 39% de la población mundial padece de sobrepeso u obesidad, lo que ha repercutido directamente en el promedio del IMC mundial (OMS 2020). En las últimas décadas (1975-2016) se ha reportado un incremento del IMC en adultos. En mujeres el IMC promedio cambió de 22 a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ y en hombres de 21.7 a $24.5 \text{ kg}/\text{m}^2$ (Abarca-Gómez et al. 2017). Lo más preocupante es que el porcentaje de obesidad en niños y adolescentes de entre 5 y 19 años a nivel mundial ha incrementado del 4% en los años 70's al 18% en la actualidad (OMS 2020).

1.2 Alimentos nutraceuticos y amaranto

Existen varios tratamientos para contrarrestar la obesidad, que van desde la modificación del estilo de vida, control de la dieta, ejercicio, terapia farmacológica o psicológica y cirugía (Wadden y Bray 2018). Sin embargo, una de las alternativas para la pérdida y el mantenimiento de peso más económica, y menos invasiva y tóxica, es el cambio de dieta que incluya la suplementación de productos nutraceuticos naturales (Swinburn et al. 2004). El término “nutraceutico” se define como “un alimento que consumido en las cantidades requeridas de nutrientes propician una mejora del estado de salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad”.

Diversos estudios han demostrado el efecto nutraceutico de las plantas, esencialmente de granos, pues son una fuente importante de proteínas alimenticias. Estas proteínas no son solo una fuente de aminoácidos esenciales, sino también son precursores de péptidos biológicamente activos con diferentes funciones fisiológicas (Kostyra 1996). Uno de los beneficios en la salud de las proteínas presentes en semillas, es su mecanismo de acción contra la obesidad. Se ha demostrado que tienen la capacidad de mantener y regular el peso corporal gracias

a su efecto de saciedad, limitando la ingesta diaria de alimentos repercutiendo en la pérdida de peso (Lankisch et al. 1998; Duranti 2006).

El amaranto, *Amaranthus* spp., es denominado un pseudocereal debido a su crecimiento y producción de semillas como cereal; sin embargo, es una planta dicotiledónea. El amaranto se ha cultivado desde la existencia de las civilizaciones Mesoamericanas, y resurgió como alimento en los años 70's, pues la FAO y la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, propusieron que, debido a su alta calidad nutricional, el amaranto podría ser un grano con gran potencial para explotación comercial (FAO 1973; NAS 1984).

El cultivo del amaranto puede aprovecharse de manera eficiente puesto que ofrece granos y hojas comestibles. Específicamente sus semillas poseen alto contenido de proteínas (13-18%), mayor que los cereales, con una excelente composición de aminoácidos esenciales, siendo particularmente rica en lisina, aminoácidos azufrados y otros aminoácidos esenciales según los requerimientos nutricionales en la dieta humana establecidos por la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO 1973; Bressani y García-Vela 1990; Valcárcel-Yamani y Caetano 2012).

El amaranto se considera un alimento nutraceutico, pues se ha evidenciado que en sus proteínas se encuentran péptidos encriptados con diferentes funciones biológicas entre las que destaca el efecto cáncer preventivo (Maldonado-Cervantes et al. 2010). Las proteínas de las semillas de amaranto son una fuente rica de péptidos antihipertensivos y antidiabéticos, los cuales funcionan inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), enzimas que tienen un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y la regulación de glucosa en sangre, respectivamente (Barba de la Rosa et al. 2010; Velarde-Salcedo et al. 2013). La administración intragástrica de hidrolizados de las fracciones albúminas y globulinas de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto, han sido efectivas en la disminución de la presión sanguínea de roedores hipertensos (Fritz et al. 2011). Adicionalmente, la adición de proteína de amaranto a la dieta hipercalórica de ratas Wistar mejoró la presión sanguínea y el perfil lipídico, disminuyendo el nivel de colesterol en plasma e hígado (Lado et al. 2015).

Por otro lado, la suplementación de la dieta con semillas de amaranto en ratas diabéticas Sprague-Dawley, disminuyó el nivel de glucosa en sangre e incrementó el nivel de insulina sérica, lo que se relaciona con un efecto antidiabético (Kim et al. 2006; Velarde-Salcedo et al., 2017).

Entre las capacidades nutraceuticas del amaranto, se destaca su efecto preventivo y tratamiento contra la obesidad, por lo cual múltiples ensayos *in vivo* en modelos animales de obesidad y en humanos se han empleado para evaluarlo (Czerwinski et al. 2004; Escobedo-Moratilla et al. 2017). Ensayos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado un efecto benéfico del consumo de proteína de amaranto en el microbioma intestinal de ratones obesos (C57BL/6) (Olguín-Calderón et al. 2019), así como la recuperación de la salud de ratones por el decremento en los niveles de triglicéridos y modulación hormonal (Lep y Res), y por los niveles de inflamación (Tnf- α) (Escobedo-Moratilla et al. 2017). Adicionalmente, se observó un efecto en pacientes diabéticos, registrando una reducción en el peso corporal e índice de masa corporal, así como decremento en marcadores relacionados con obesidad y riesgo cardiovascular (Gómez-Cardona et al. 2017). Dichos reportes sugieren que el consumo de amaranto es un alimento prometedor para el mejoramiento de la salud.

1.3 Modelos de estudio de obesidad

Existe una extensa variedad de reportes acerca de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la obesidad en humanos (Folsom et al. 1996; Caro et al. 1996; Turnbaugh et al. 2009). Sin embargo, los modelos animales también han permitido comprender los mecanismos involucrados en la obesidad y enfermedades relacionadas con este padecimiento (Withers et al. 1998; Mynatt y Stephens 2003; Liu et al. 2003; McQuade et al. 2004; Hibuse et al. 2005), pues son una herramienta adecuada para estudiar no solo los factores genéticos asociados, sino también la respuesta fisiológica de una dieta hipercalórica (Speakman et al. 2007; Olguín-Calderón et al. 2019).

Los modelos murinos se han empleado para identificar una diversidad de genes implicados en la enfermedad. Por ejemplo, los receptores de peroxisoma-

proliferador-activado (PPARs), factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares que cumplen distintos papeles entre los que destaca su papel en el metabolismo de lípidos. La activación de PPAR δ en tejido adiposo de ratones transgénicos (C57BL/6J), indujo la expresión de genes requeridos para la oxidación de ácidos grasos y el gasto energético, lo que resultó en el mejoramiento del perfil lipídico y reducción del tejido adiposo debido al consumo de ácidos grasos. Adicionalmente estos animales mostraron resistencia tanto a dietas altas en grasa, como a la predisposición genética de obesidad (Leprdb/db). De manera paralela, los ratones *knockout* PPAR δ con una dieta alta en grasa, fueron propensos a la obesidad (Wang et al. 2003). Por otro lado, la leptina, hormona de saciedad que tiene un papel en la homeostasis energética y cuya secreción se asocia a individuos obesos, fue sobre-expresada en hígado de ratones BDF transgénicos. Los ratones mostraron la desaparición del tejido adiposo e incremento del metabolismo de glucosa, acompañado de la activación de la señalización de insulina (Ogawa et al. 1999). Contrario a esto, ratones transgénicos carentes de receptores de leptina (LRb) presentaron hiperfagia, obesidad y diabetes (Bates et al. 2003).

Así como se han inducido modelos de obesidad en murinos por mutación génica, también se han desarrollado modelos roedores de obesidad inducida por dieta. La administración de una dieta de alto contenido graso en ratones C57BL/6J, resultó en el incremento del peso corporal y almacenamiento de grasa desde la primera semana hasta las 18 semanas de alimentación (Lin et al. 2000).

La mayoría de los estudios de caracterización funcional de genes relacionados a la obesidad, así como de la respuesta a dietas hipercalóricas, han sido desarrollados en modelos murinos. Sin embargo, el desarrollo de dichos experimentos es complejo, pues el fenotipo de obesidad puede diferir enormemente según la herencia genética, las funciones de los genes *knock-out* y los protocolos de dieta utilizados en dichos organismos (Mynatt y Stephens 2003; Liu et al. 2003; McQuade et al. 2004; Hibuse et al. 2005). Además, el trabajo de experimentación requiere de actividades relativamente complejas para su mantenimiento, sacrificio y obtención de muestras, incluyendo el requerimiento de infraestructura especializada

y un elevado costo. Es por tales motivos que se ha buscado complementar las deficiencias de los modelos roedores, desarrollando y evaluando novedosos modelos genéticos y de dieta. Lo que permitirá estudiar las enfermedades humanas de una manera más simple, efectiva y accesible.

1.4 El pez cebra como modelo de estudio de obesidad

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez tropical de agua dulce perteneciente al grupo de los teleósteos, el cual ha surgido como un modelo de investigación *in vivo* de diversas enfermedades humanas incluyendo la obesidad (Oka et al. 2010; Santoriello y Zon, 2012).

Como modelo experimental posee múltiples ventajas entre las que destacan su similitud anatómica, fisiológica y genética con el humano (Hill 2020). El pez cebra tiene órganos y tejidos comparables, entre los que se incluye al corazón, hígado, riñones, páncreas, timo y tejido hematopoyético (Menke et al. 2011). La secuenciación de su genoma ha demostrado que el 69% de los genes en pez cebra poseen al menos un gen ortólogo con el humano. Adicionalmente, el 81% de genes humanos relacionados a enfermedades presentan un ortólogo en pez cebra (Howe et al. 2013). El pez cebra posee facilidad de manipulación experimental, pues se puede trabajar con un número incrementado de réplicas biológicas debido a su tamaño pequeño, que a su vez reduce los costos de mantenimiento. Sin embargo, se requiere de condiciones adecuadas para su mantenimiento con luz y temperatura controlada, así como un sistema de tanques con condiciones óptimas de calidad de agua y alimentación.

Se ha demostrado que el modelo de pez cebra es útil en el estudio de procesos metabólicos involucrados en la obesidad (Schlegel y Stainier, 2006). La maquinaria encargada de la síntesis y transporte de lípidos está presente y activa en el pez cebra en forma similar a la de los humanos (Marza et al. 2005; Jones et al. 2008). En larvas de pez cebra se han detectado genes involucrados en la homeostasis energética y dianas terapéuticas potenciales para el tratamiento de la obesidad (Jones et al. 2008). También se han detectado en peces adultos los receptores PPARs (Ibabe et al. 2005). Estos receptores se encuentran involucrados

en el control de la homeostasis lipídica, la regulación del inicio de la adipogénesis y el desarrollo embrionario, especialmente del sistema nervioso central y la maduración de la epidermis (Braissant et al. 1998; Kersten et al. 2000).

Las señales neurales y endocrinas involucradas en la ingesta de alimento también están conservadas entre el pez cebra y el humano (Santoriello y Zon 2012). Los neuropéptidos y hormonas involucradas, tales como la proteína α -agouti (Song et al. 2003), leptina (Gorissen et al. 2009) y adiponectina (Nishio et al. 2008) tienen como función la estimulación y regulación del apetito, la termogénesis y el metabolismo de ácidos grasos. Por tal motivo, se han desarrollado modelos genéticos e inducidos por dieta en pez cebra para el estudio de la obesidad. Estos modelos incluyen líneas transgénicas que sobre-expresan genes obesogénicos o mutantes generadas por mutagénesis dirigida. Cabe mencionar que la manipulación genética de vías que controlan el peso corporal en sistemas mamíferos también causa obesidad en el pez cebra. Un modelo transgénico fue desarrollado por la sobre-expresión de AgRP, exhibiendo incremento del peso corporal, acumulación adiposo visceral y triglicéridos totales (Song y Cone 2007). Otro modelo se generó por la depleción de miR-27b presentando hiperlipidemia, esteatosis hepática e incremento del tejido adiposo (Hsu et al. 2017). Adicionalmente, se han identificado múltiples líneas mutantes que revelan genes y vías relacionados al metabolismo de lípidos y regulación del tejido adiposo (Hugo y Schlegel 2017; Peng et al. 2017). Dichos mutantes comparten el fenotipo, sin embargo, se deben a la disrupción de diversos procesos. Uno de ellos resultó de la mutación del gen *gfpt1*, ocasionando esteatosis hepática e incremento del tejido adiposo en cuerpo completo (Hugo y Schlegel 2017).

Los modelos de obesidad inducidos por dieta (OID) son limitados, su enfoque común se basa en la ingesta excesiva de grasas. Los peces cebra obesos se han obtenido por la sobrealimentación a partir de los 5 días post-fertilización. Para incrementar el tejido adiposo en larvas y juveniles se han administrado alimentos como crema y yema de huevo (Schlegel and Stainier 2006; Tingaud-Sequeira et al. 2011) y en peces adultos alimentos enriquecidos con aceites vegetales (Meguro et al. 2015; Vargas y Vázquez 2017).

Oka et al. (2010) desarrollaron un modelo OID en pez cebra que se obtuvo por la aplicación de una dieta de alto contenido calórico, pues se ha demostrado que este tipo de nutrientes poseen un bajo efecto de saciedad y su consumo excesivo se asocia con riesgo a padecer obesidad (González et al. 2000). La dieta consistió en nauplios de *Artemia salina* recién eclosionados, que se compone de 22% de grasa, 16% de carbohidratos y 44% de proteínas. Debido a que la energía requerida por el pez leopardo, una cepa variante del pez cebra, es menor a 30 calorías (Pannevis y Earle 1994), se determinó que la administración de 5 mg de artemia para un individuo sano era suficiente para aportar al menos 20 calorías bajo una tasa de consumo del 80%. Por lo tanto, un suministro mayor a la energía requerida por el pez tendría la capacidad de generar un estado de obesidad. Tras la alimentación con 60 mg de artemia por individuo con una tasa de consumo del 50% y aportando 150 calorías por periodo de alimentación, se obtuvo una línea de peces cebra OID. Tras la primera semana de dieta, se registró un incremento en el índice de masa corporal (g/cm^3) tanto en machos como en hembras adultos, manteniendo la tendencia hasta la octava semana.

Adicionalmente, el modelo reveló en ambos sexos un incremento en el contenido de triglicéridos en plasma y esteatosis hepática, que consiste en la acumulación simple de triglicéridos en hepatocitos, condición asociada a condiciones de sobrepeso y obesidad (García-Monzón et al. 2000; Dixon et al. 2001). En los ensayos de perfiles de expresión génica en tejido adiposo de este modelo, se registraron vías fisiopatológicas en común con modelos roedores OID y humanos en condiciones de obesidad (Surwit et al. 1995; González et al. 2000). Además, se observó una desregulación en la expresión de genes involucrados en el flujo de colesterol y en el metabolismo de ácidos grasos y triglicéridos (Oka et al. 2010).

Un modelo alternativo para el estudio de enfermedades metabólicas como la obesidad, diabetes y hepatoesteatosis es el pez cebra OID obtenido tras la alimentación con dieta normal con grasas (artemia; 50.6% proteínas, 25.7% carbohidratos, 14.2% lípidos) para la obtención de peces metabólicamente sanos (OS) y una dieta alta en grasas (yema de huevo en polvo; 33.0 proteínas, 1.2%

carbohidratos, 62.5% lípidos) para obtener el modelo metabólicamente no sano (ONS). Los peces se caracterizan por presentar un incremento del peso corporal y tejido adiposo, así como alteraciones metabólicas entre ellas hiperglicemia, acumulación ectópica de lípidos en hígado y un fenotipo de tejido adiposo metabólicamente no sano con hipertrofia de adipocitos, el cual se acompaña de cambios en la expresión de genes para el metabolismo de lípidos, inflamación y fibrosis (Landgraf et al. 2017).

1.5 Efecto de compuestos nutracéuticos en el modelo del pez cebra

Existe evidencia sobre el uso del modelo de pez cebra para evaluar el efecto de los nutracéuticos. Por ejemplo, la exposición a extracto de hojas de oliva (*Chimonanthus nitens*) en larvas de pez cebra mostró un efecto antiinflamatorio por la inhibición del reclutamiento de neutrófilos, además redujo la expresión de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-1 β (Sun et al. 2017). Por otro lado, la exposición a fucoxantina aislada de un alga parda (*Ishige okamurae*) indujo la protección contra estrés oxidativo inducido por exposición a glucosa, pues se redujo la generación de ROS, la peroxidación de lípidos y la apoptosis celular (Kang et al. 2014). Además, tras la exposición a resveratrol, una fitoalexina encontrada ampliamente en plantas, se indujo la metabolización de lípidos debido al consumo de reserva de lípidos encontrados en el saco vitelino de larvas (Pardal et al. 2014) y un efecto nefroprotector en embriones (Ding et al. 2015). Adicionalmente se ha evaluado en el pez cebra OID el efecto preventivo de compuestos naturales contra la obesidad. En dichos reportes se ha observado un decremento de los parámetros relacionados a la obesidad, pues tras la alimentación en pez cebra OID con un extracto de tomate Campari, se suprimió el incremento del peso corporal y disminuyeron los niveles de triglicéridos en plasma y la condición de esteatosis hepática (Tainaka et al. 2011). Registros similares se obtuvieron tras la alimentación con cáscara de Yuzu (*Citrus junos*) con contenido de aceites esenciales y pulpa de Yuzu (Hasumura et al. 2012). Tras la administración de extracto de hojas de té verde (*Camellia sinensis*) se registró una disminución en el volumen visceral, así como la

expresión incrementada de genes involucrados en el catabolismo de lípidos en hígado (Zang et al. 2014).

En la literatura existe un reporte en el cual se evaluó el efecto *in vivo* de la proteína de amaranto en larvas pez cebra bajo condiciones normales de alimentación. Tras la exposición temprana a la proteína hidrolizada de amaranto, demostraron su capacidad reductiva de especies reactivas del oxígeno, por la disminución de la peroxidación de lípidos (Vilcacundo et al. 2018). Sin embargo, dichos autores no evaluaron el efecto de la administración del amaranto en individuos de edad más avanzada o bajo condiciones de exposición crónica. Para corroborar el efecto nutracéutico del amaranto en el modelo, es necesaria una diversidad más amplia de estudios *in vivo*, por lo que dicho reporte carece de las evidencias suficientes. Esto abre las puertas para el desarrollo de estudios adicionales empleando el pez cebra, incluyendo modelos de obesidad para identificar la variedad de efectos nutracéuticos que se le ha atribuido a la dieta de amaranto, entre los que se encuentra la prevención y tratamiento de la obesidad.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar los efectos de la administración de una dieta a base de proteína de amaranto en modelo de obesidad metabólicamente sana y obesidad metabólicamente no sana inducido por dieta en pez cebra.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener modelos de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana en pez cebra mediante la administración de dietas hipercalóricas
- Analizar los cambios en el índice de masa corporal y el índice hepatosomático en los modelos de obesidad de pez cebra tras la suplementación con proteína de amaranto.
- Analizar el perfil de lípidos en sangre en los modelos de obesidad de pez cebra tras la suplementación con proteína de amaranto.
- Identificar el desarrollo de esteatosis hepática y acumulación de grasa visceral en modelo de obesidad de pez cebra tras la suplementación con proteína de amaranto.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de alimento

La proteína de amaranto liofilizada, previamente obtenida por nuestro grupo de trabajo, fue preparada como alimento para peces según el protocolo de Tainaka et al. (2011). El mismo volumen (peso) de agua y hojuelas comerciales (hojuelas básicas para peces tropicales, Lomas, USA) se añadieron a la proteína de amaranto y se mezclaron, resultando en una mezcla con 50% de proteína de amaranto. Después de eso, la mezcla se almacenó a -80 °C y se liofilizó (BK-Fd10p, Biobase, China). Después de la deshidratación, la mezcla se trituró y se tamizó para obtener gránulos de tamaño de entre 700 a 1000 μm . La mezcla se almacenó en ausencia de luz a 4 °C hasta su uso.

3.2 Animales y crianza

Todos los procedimientos involucrando el uso de pez cebra fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Neurobiología (INB, UNAM, Juriquilla), bajo el protocolo para el uso de animales No. 95A.

Las larvas de pez cebra (línea híbrida Tu/AB y Wik) de 35 días post-fertilización (n=84) fueron proporcionados por el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, INB-UNAM, Juriquilla. Las larvas se mantuvieron en peceras con agua a pH 7.5, conductividad entre 500-900 μS , a 28 °C y con un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Se empleó una dieta basada en nauplios de *Artemia salina* recién eclosionados (12 mg de cistos/pez/día) de cultivos que fueron preparados diariamente. Los cultivos de artemia se mantuvieron en recipientes cónicos de 1 L con 30 gramos de NaCl y 1 g de cistos de artemia, bajo condición de luz continua. Una vez pasadas 24 h, fueron filtrados y lavados para obtener el concentrado de alimentación. Las condiciones de crianza se mantuvieron bajo las mismas condiciones hasta los 3.5 meses post-fertilización (mpf).

3.3 Experimento de alimentación

El tratamiento sub-crónico de obesidad y suplementación con proteína de amaranto comenzó al inicio de la fase adulta de los peces (3.5 mpf). Para ello, los peces previamente mantenidos bajo crianza fueron redistribuidos aleatoriamente en 6 tanques (n=14, ± 2 peces/L) formando los grupos; control (C); control + amaranto (CA); obesidad sana (OS); obesidad sana + amaranto (OS+A); obesidad no sana (ONS); y obesidad no sana + amaranto (ONS+A). El diseño experimental se muestra en la Figura 1.

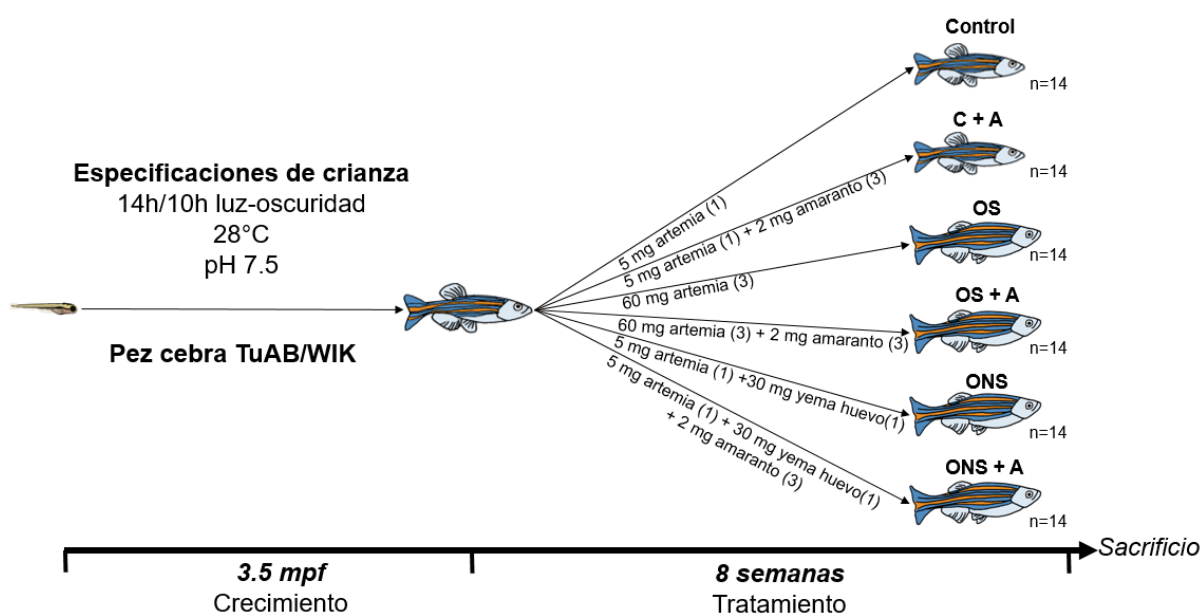


Figura 1. Diseño experimental de crianza y administración de tratamientos en peces cebras.

Los grupos se mantuvieron bajo las mismas condiciones durante 8 semanas (5.5 mpf) bajo un régimen de alimentación según se indica en la Tabla 1.

Tabla 1 Régimen experimental de alimentación.

Grupo	Dieta	Cantidad	Frecuencia
C	Nauplio de artemia ^a	5 mg cistos/pez	1 x día
C+A	Nauplio de artemia	5 mg cistos/pez	1 x día
	Proteína de amaranto	<i>Ad libitum</i> ^b	3 x día
OS	Nauplio de artemia	60 mg cistos/pez	3 x día
OS+A	Nauplio de artemia	60 mg cistos/pez	3 x día
	Proteína de amaranto	<i>Ad libitum</i> ^b	3 x día
ONS	Nauplio de artemia	5 mg cistos/pez	1 x día
	Alimento c/ yema de huevo	30 mg/pez	1 x día
ONS+A	Nauplio de artemia	5 mg cistos/pez	1 x día
	Alimento c/ yema de huevo	30 mg/pez	1 x día
	Proteína de amaranto	<i>Ad libitum</i> ^b	1 x día

^a Artemia *White Mountain* (Great Salt Lake, Utah, USA).

^b Administrada 20 min previos a nauplios de artemia y/o alimento con yema de huevo.

Los parámetros fisicoquímicos de agua, tales como nitritos, nitratos, amonio, pH y conductividad, fueron registrados semanalmente para mantener las condiciones ideales del medio. Al finalizar el tratamiento, los peces fueron sacrificados por medio de hipotermia (Matthews y Varga, 2012).

3.4 Registro del Índice de masa corporal (IMC) e Índice Hepatosomático (IHS)

Durante la aplicación del tratamiento (semanas 0, 2, 4, 6 y 8) los peces fueron anestesiados momentáneamente con eugenol de aceite de clavo (30ppm, Sigma-Aldrich) y se llevó un registro tanto de la longitud de los peces por medio de registro fotográfico, como del peso corporal individual (n=5-6). Estos datos fueron empleados para calcular el índice de masa corporal, como el peso en mg sobre longitud total al cuadrado (IMS= mg/cm²).

El hígado fue diseccionado de animales recién sacrificados y pesados individualmente. Estos datos fueron empleados para calcular el IHS, como el peso del hígado sobre el peso corporal por 100 (masa hígado/masa corporal) x 100).

3.5 Perfil de lípidos en sangre

La sangre de los peces recién sacrificados fue recolectada amputando la cola en el límite de la aleta anal y cada pez fue colocado en un tubo de microcentrífuga (1.5 ml) previamente perforado en la base. A su vez, el tubo con el pez orientado hacia arriba fue colocado sobre otro tubo para recolección y centrifugado a 100g por 5 min a 11 °C. Seguido de esto, se realizó otro corte por encima de la herida existente para remover el coágulo formado y se repitió la centrifugación. Finalmente, la sangre colectada en el tubo inferior fue centrifugada a 500g por 15 min a 4 °C con la finalidad de separar el suero. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

La determinación de colesterol y triglicéridos en suero se realizó en *pools* de todos los individuos de cada tratamiento (n=9), pues la cantidad recolectada de suero de cada individuo es limitada. Se utilizó el equipo portátil automatizado Accutrend Plus (Roche Diagnostics GMBH, Alemania), utilizando tiras *Accutrend Triglycerides/Cholesterol* según las indicaciones especificadas por el fabricante.

3.6 Histología

3.6.1 Preparación, inclusión y seccionamiento de tejido

Al finalizar el tratamiento, los peces recién sacrificados (n=5) fueron fijados en solución fijadora Dietrich (30% etanol 96°, 10% formalina, 2% ácido acético glacial, 58% H₂O; 15 ml para 1-2 peces en un vial pequeño), previamente se realizó una abertura a lo largo de la sección ventral y el corte de la cola a la altura del extremo de la aleta anal. Para asegurar la fijación uniforme y completa se colocaron en rotor durante 3 días consecutivos a temperatura ambiente.

Un día antes de procesar las muestras, los peces fueron transferidos a 5% de ácido tricloroacético (TCA) en solución Dietrich con agitación constante durante

toda la noche. El TCA tiene la capacidad de suavizar la piel, escamas y huesos, con la finalidad de realizar cortes histológicos fácilmente. El TCA de las muestras fue reemplazado con etanol 70% en agitación (10 min, 3 veces) y, por último, reemplazado con etanol 70% nuevo. Los peces fueron completamente bisecados a lo largo de la sección ventral con ayuda de una navaja nueva y colocados en casetes de inclusión. Las muestras fueron procesadas transfiriéndose a una serie de diluciones de etanol para su deshidratación; etanol 70% (30 min, 2 veces), etanol 80% (45 min), etanol 96% (45 min, 2 veces), etanol 100% (60 min, 2 veces), y xileno 100% (45 min, 2 veces) con la finalidad de infiltrar adecuadamente la parafina al tejido. Posteriormente fueron procesados en parafina (60 °C); solución xileno/parafina (90 min), parafina 1 (90 min), parafina 2 (45 min). Los peces fueron retirados de los casetes, colocados con la cara interior hacia la sección inferior de moldes histológicos, embebidos con parafina líquida (*Tissue-Tek Paraffin*, Sakura Finetek, USA) y colocados en una plancha de enfriamiento (-10 °C) hasta solidificar (MPS/P2, SLEE Medical, Alemania).

Los bloques de parafina fueron seccionados (5 µm) con ayuda de micrótopo (CUT 6062, SLEE Medical, Alemania), obteniendo secciones anatómicamente comparables de la región visceral de los peces. Los cortes fueron transferidos a baño maría (32 °C), colocados en portaobjetos y transferidos a la incubadora para eliminar los residuos de parafina (3 h, 60 °C).

3.6.2 Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E)

Las muestras fueron desparafinadas con xileno al 100% (30 s, 2 veces) y rehidratadas en una serie de diluciones de etanol; etanol 100% (30 s, 2 veces), etanol 96% (30 s, 2 veces), etanol 80% (30 s), etanol 70% (30 s). Las muestras fueron teñidas en hematoxilina de Harris filtrado (5 min), desteñidas en alcohol ácido (0.1%) y sumergidas en agua amoniacal para virar el pH. Finalmente, fueron contrateñidas con eosina (2 min) y transferidas a la serie de dilución de etanol; etanol 70% (30 s), etanol 80% (30 s), etanol 95% (30 s, 2 veces), etanol 100% (30 s, 2 veces). Las muestras son colocadas en xileno para posteriormente montar en medio de montaje (Entellan, Merck). Se obtuvieron imágenes de las muestras teñidas con ayuda de microscopio óptico de luz (40X).

3.6.2 Tinción Rojo Oleoso O (ORO)

Hígados individuales previamente almacenados a -80°C , fueron embebidos en compuesto *Tissue-Tek* OCT (Sakura, Finetek, USA) e inmediatamente congelados (-20°C). Con ayuda de criotomo (MNT, SLEE Medical, Alemania), se obtuvieron microsecciones ($10\ \mu\text{m}$) de cada tratamiento. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente por 60 min y fijadas en formalina 10% (1X PBS) durante toda la noche (4°C). Al día siguiente fueron sumergidas en isopropanol 60%, teñidas con rojo oleoso O (21 mg ORO, 60 ml isopropanol, 45 ml H_2O milli-Q) y sumergidas rápidamente en isopropanol 60% (2 veces) para quitar el exceso de colorante. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y montadas con glicerol 40%, para ser visualizadas mediante microscopía. La tinción con ORO tiene la capacidad de teñir lípidos, por lo que cualquier señal observada en rojo indica la presencia de grasas en el tejido observado.

3.7 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados en Graph Pad Prism ver. 8 (GraphPad Software). Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar (EE), bajo un análisis de variancia de una vía (ANOVA) y basado en una prueba de comparación múltiple de Dunnett. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Crecimiento y registro del Índice de Masa Corporal

Se evaluó la inducción de obesidad sana (OS) y obesidad no sana (ONS) por medio de la dieta en pez cebrá mediante la sobrealimentación de adultos hembras y machos. Debido al efecto de percepción del apetito de alimentos ricos en grasa en comparación con alimentos ricos en proteínas fue posible inducir los modelos. Tras las 8 semanas, peces machos y hembras bajo tratamiento presentaron más crecimiento en comparación con los peces control (Figura 2). Adicionalmente, se observó una tendencia en hembras del grupo OS+A disminuir su tamaño en relación con el grupo OS y en el grupo ONS+A a incrementarlo en relación con el grupo ONS. Mientras que en machos del grupo ONS+A tienden a disminuir su tamaño en relación con el grupo ONS.

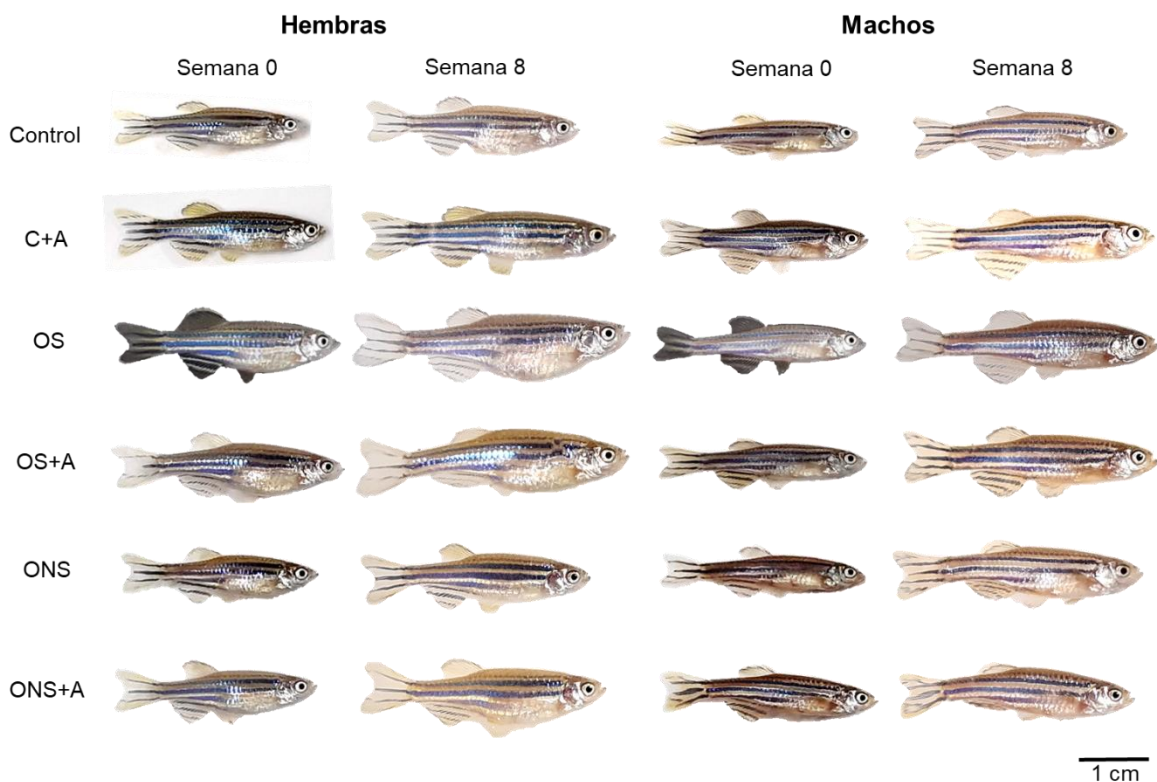


Figura 2. Crecimiento de peces cebrá hembras y machos desde las 0 hasta las 8 semanas de tratamiento. Imágenes de peces incluidos en cada uno de los grupos analizados.

Los resultados del IMC obtenidos por las mediciones de peso y longitud se muestran en la Figura 3. El IMC de los grupos C y C+A se mantuvo constante durante las 8 semanas de alimentación tanto en hembras como en machos. Sin embargo, las hembras asociadas a obesidad (Figura 3A), como lo esperado, el IMC incrementó significativamente ($p < 0.05$) desde las 4 hasta las 8 semanas, obteniendo el IMC más alto en los grupos ONS+A, OS y OS+A. Por otro lado, el IMC en machos asociados a obesidad (Figura 3B) también mostró un incremento significativo ($p < 0.01$) desde las 4 hasta las 8 semanas, llegando al mismo IMC en todos los grupos de obesidad con y sin amaranto (OS, OS+A, ONS y ONS+A).

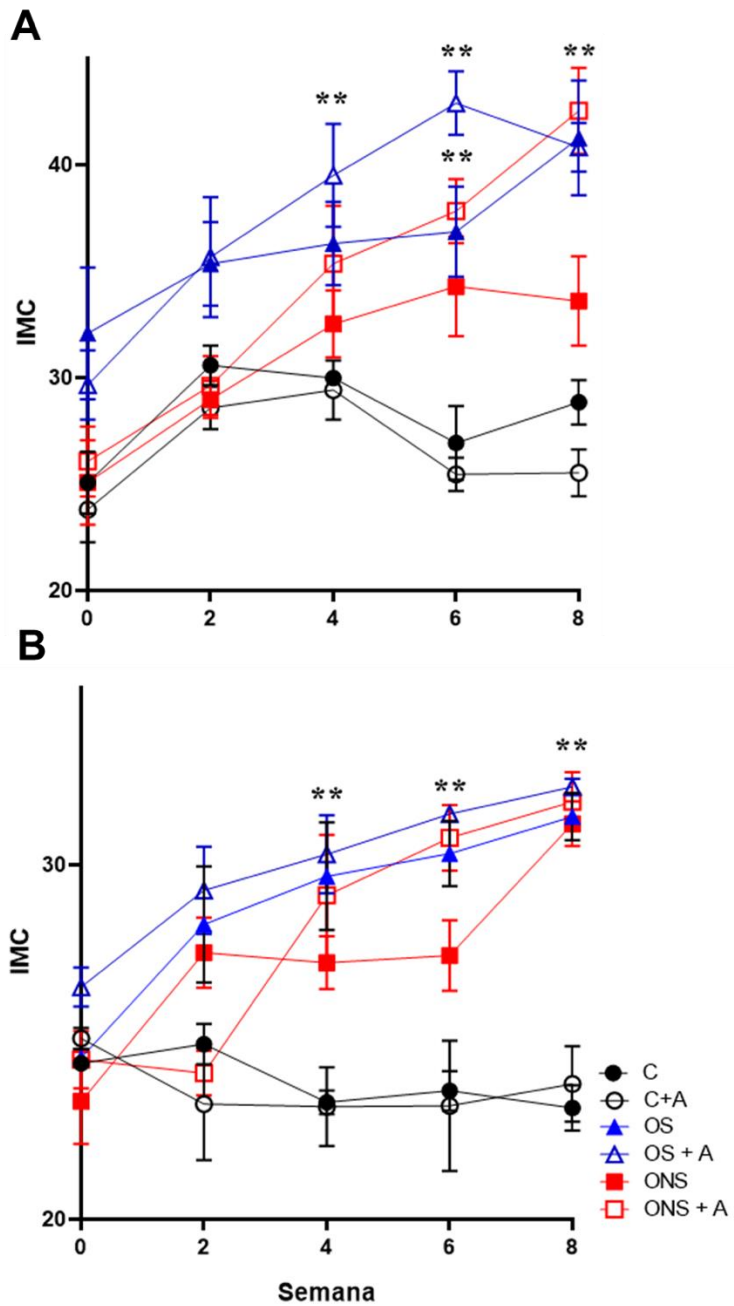


Figura 3. Evaluación del IMC en modelo de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana, tras la administración de proteína de amaranto. Cambios en el IMC (g/cm^2) en (A) hembras y (B) machos tras la inducción de obesidad y la administración de proteína de amaranto. Análisis estadístico ANOVA. Datos mostrados como el promedio \pm SEM ($n=5-6$ machos, $n=5-6$ hembras). ** $p < 0.01$.

4.2 Índice hepatosomático y perfil de lípidos en sangre

En la Figura 4, se presentan el IHS de hembras y machos tras las 8 semanas de administración de la dieta. En las hembras se observó una tendencia de incremento global en el IHS en los grupos asociados a OS y ONS, incluso tras la administración de amaranto. Sin embargo, solo el grupo OS evidenció un incremento significativo en el IHS en relación con el control ($p < 0.05$). Por otro lado, se observó una tendencia a disminución de este valor en el grupo de obesidad sana suplementada con proteína de amaranto (OS+A) en comparación al grupo OS. En los machos no se evidenció un incremento significativo en la relación del peso del hígado en comparación al grupo control. Sin embargo, interesantemente el grupo de ONS+A, mostró una tendencia a la disminución de este valor.

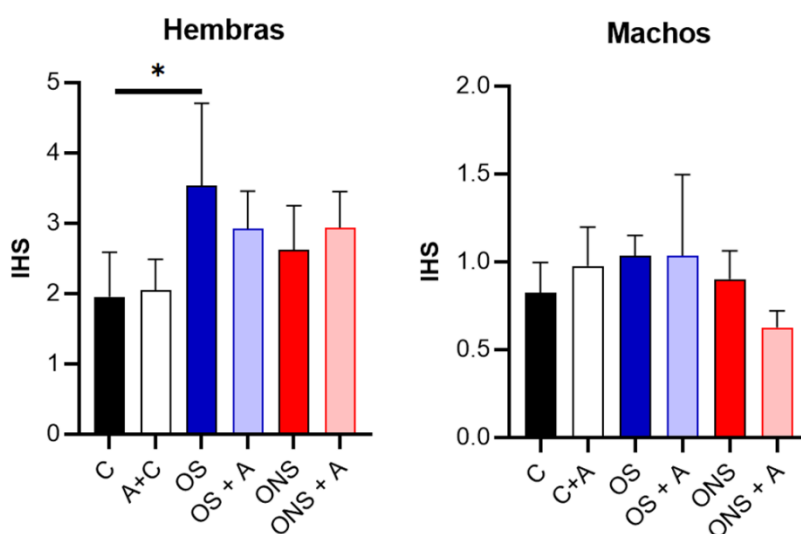


Figura 4. Evaluación del índice hepatosomático en modelo de obesidad metabólicamente sano y metabólicamente no sano, tras la administración de proteína de amaranto. Cambios en el IHS en hembras y machos tras la inducción de obesidad y la administración de proteína de amaranto. Análisis estadístico ANOVA. Datos mostrados como el promedio + SEM (machos n=3-4, hembras n=3-5). * $p < 0.05$.

En la Figura 5, se muestran los niveles de colesterol total y triglicéridos en sangre de los grupos analizados. Se observó una tendencia en la disminución de colesterol en el grupo control que consumió proteína de amaranto y un aumento del nivel de colesterol en los grupos asociados a obesidad no sana, siendo más evidente

en el grupo ONS+A. Con relación a los triglicéridos, también se observó una tendencia en su disminución en el grupo C+A, por efecto del consumo de amaranto, así como una tendencia al aumento en los grupos asociados a obesidad, incluyendo aquellos grupos a los que se les suplemento con proteína de amaranto; OS, OS+A, ONS y ONS+A.

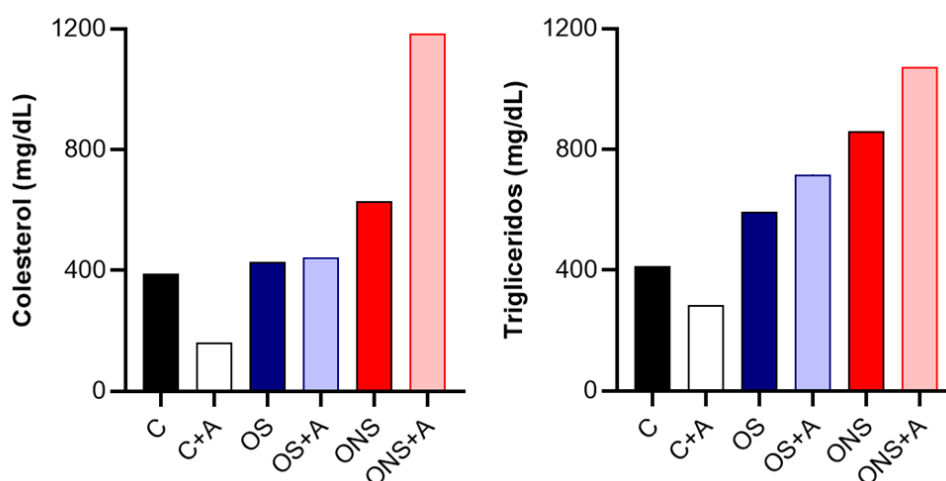


Figura 5. Evaluación de colesterol y triglicéridos en plasma en modelo de obesidad metabólicamente sana y metabólicamente no sana, tras la administración de proteína de amaranto. Cambios en los niveles de colesterol y triglicéridos tras la inducción de obesidad y la administración de proteína de amaranto (*pool* n = 9).

4.3 Análisis histológico e histopatología del hígado

El análisis histológico de secciones de peces completos reveló el incremento en el tamaño corporal de los peces asociados a obesidad (OS, OS+A, ONS y ONS+A; Figura 6C-F) en comparación a los peces control (C y C+A; Figura 6A y B), concordando con los datos obtenidos del IMC, donde los peces asociados a obesidad presentaron un incremento significativo del crecimiento en comparación a los controles. También es evidente un decremento del tamaño de las vísceras, específicamente de las gónadas (indicado por una flecha), en el individuo del grupo C+A, en relación con el grupo control (Figura 6A y B). Así como el incremento en el tamaño de las gónadas en el grupo OS+A, en relación con el resto de los grupos (Figura 6D).

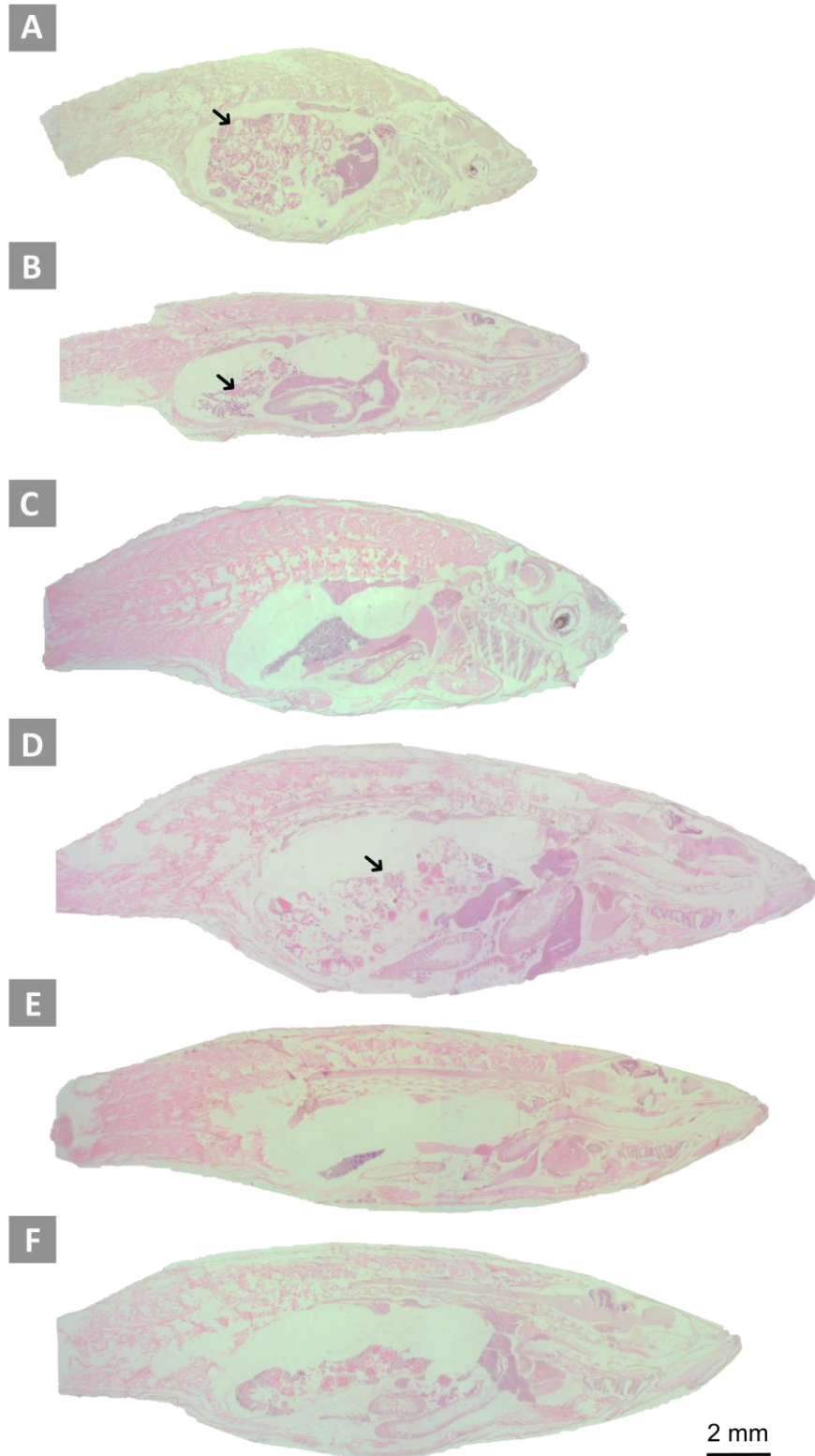


Figura 6. Evaluación histológica por tinción H&E en pez cebra completo. Tinción H&E en individuos completos de cada tratamiento. (A) Control; (B) Control + amaranto; (C) Obesidad metabólicamente sana; (D) Obesidad metabólicamente sana + amaranto; (E) Obesidad metabólicamente no sana; (F) Obesidad metabólicamente no sana + amaranto.

Por otro lado, la evaluación de la reserva adiposa indicó que los grupos asociados a obesidad (OS, OS+A, ONS y ONS+A; Figura 7C-F) exhibieron hiperplasia del tejido adiposo visceral, en comparación a los peces control (C y C+A; Figura 7A, 7B) donde no hubo presencia de tejido graso visceral.

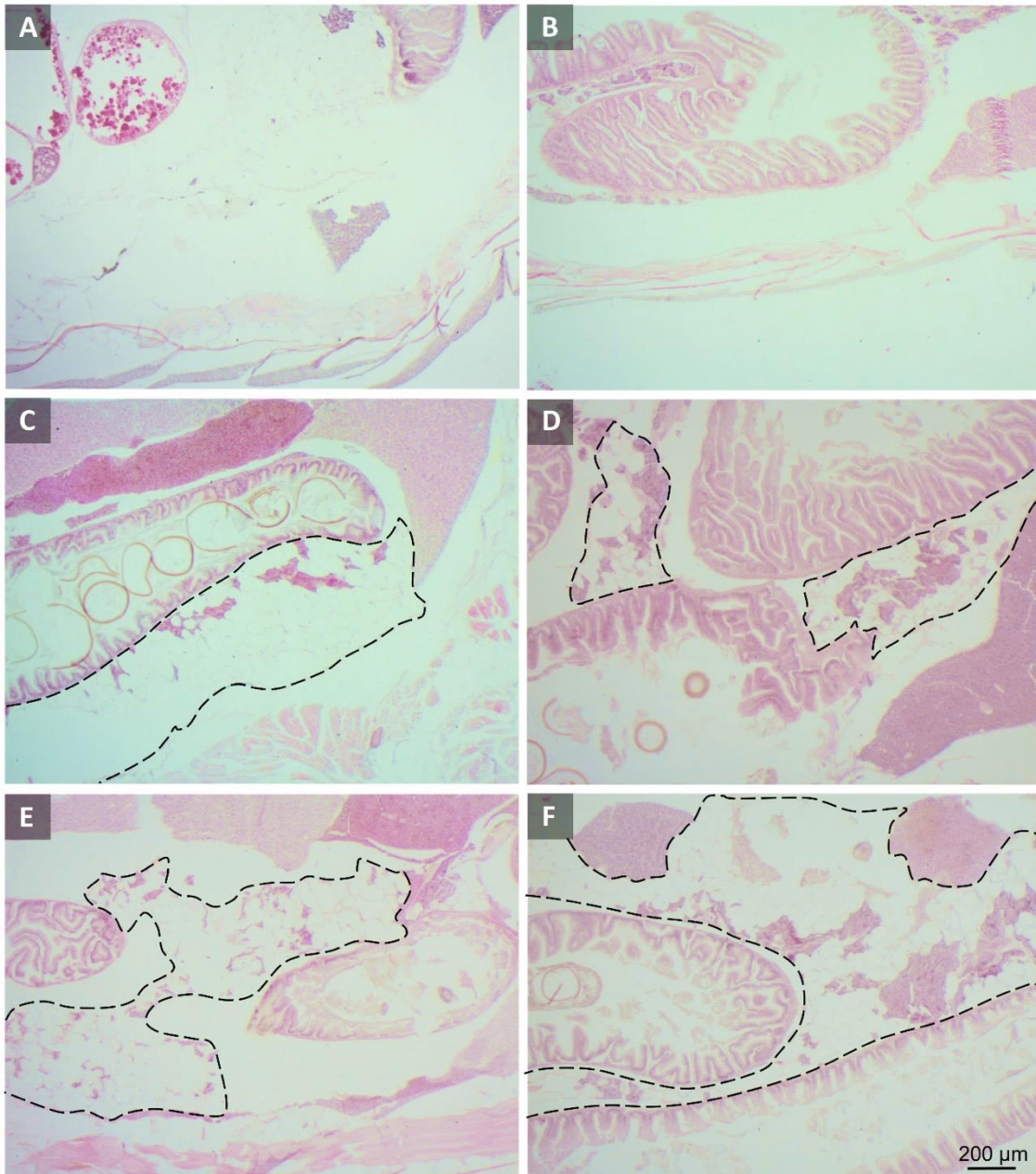


Figura 7. Evaluación histológica por tinción H&E en zona visceral de pez cebra. Zona visceral de los individuos de cada tratamiento (8X). (A) Control; (B) Control + amaranto; (C) Obesidad metabólicamente sana; (D) Obesidad metabólicamente sana + amaranto; (E) Obesidad metabólicamente no sana; (F) Obesidad metabólicamente no sana + amaranto. La línea punteada indica el borde del tejido adiposo visceral.

Adicionalmente, el análisis histopatológico del hígado reveló anomalías relacionadas a esteatosis, por la identificación de áreas vacuolares grandes consideradas como depósitos macro-vesiculares de grasas en el citoplasma. El tejido hepático de los grupos evaluados presentó distinta severidad de esteatosis, siendo un caso agravado en los grupos asociados a obesidad, OS, OS+A, ONS y ONS+A (Figura 8 C-F), y con menor severidad en el grupo control (Figura 8A). Sin embargo, el grupo C+A presenta una morfología hepática sin acumulación de grasas, identificado por la ausencia de vacuolas.

Para confirmar la severidad de esteatosis hepática, causada por la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas, se utilizó la tinción ORO en secciones de tejido hepático congelado. Los peces pertenecientes a los grupos C y C+A (Figura 9A y 9B) presentaron menor acumulación de lípidos en hígado en comparación a los grupos asociados a obesidad. Sin embargo, el grupo control al cual se le administró proteína de amaranto (C+A) presentó menor acumulación de grasas en hígado en comparación con el grupo control (C). Con relación a los grupos asociados a obesidad, se observó el desarrollo de esteatosis leve en los grupos OS y OS+A (Figura 9C y 9D), mientras que en los grupos ONS y ONS+A se observó el desarrollo de esteatosis severa en los grupos ONS y ONS+A (Figura 9E y 9F). Sin embargo, se observa un ligero efecto protector del desarrollo de hepatoesteatosis en los grupos asociados a obesidad a los cuales se les administró proteína de amaranto (OS+A y ONS+A) en relación a los grupos de obesidad (OS y ONS).

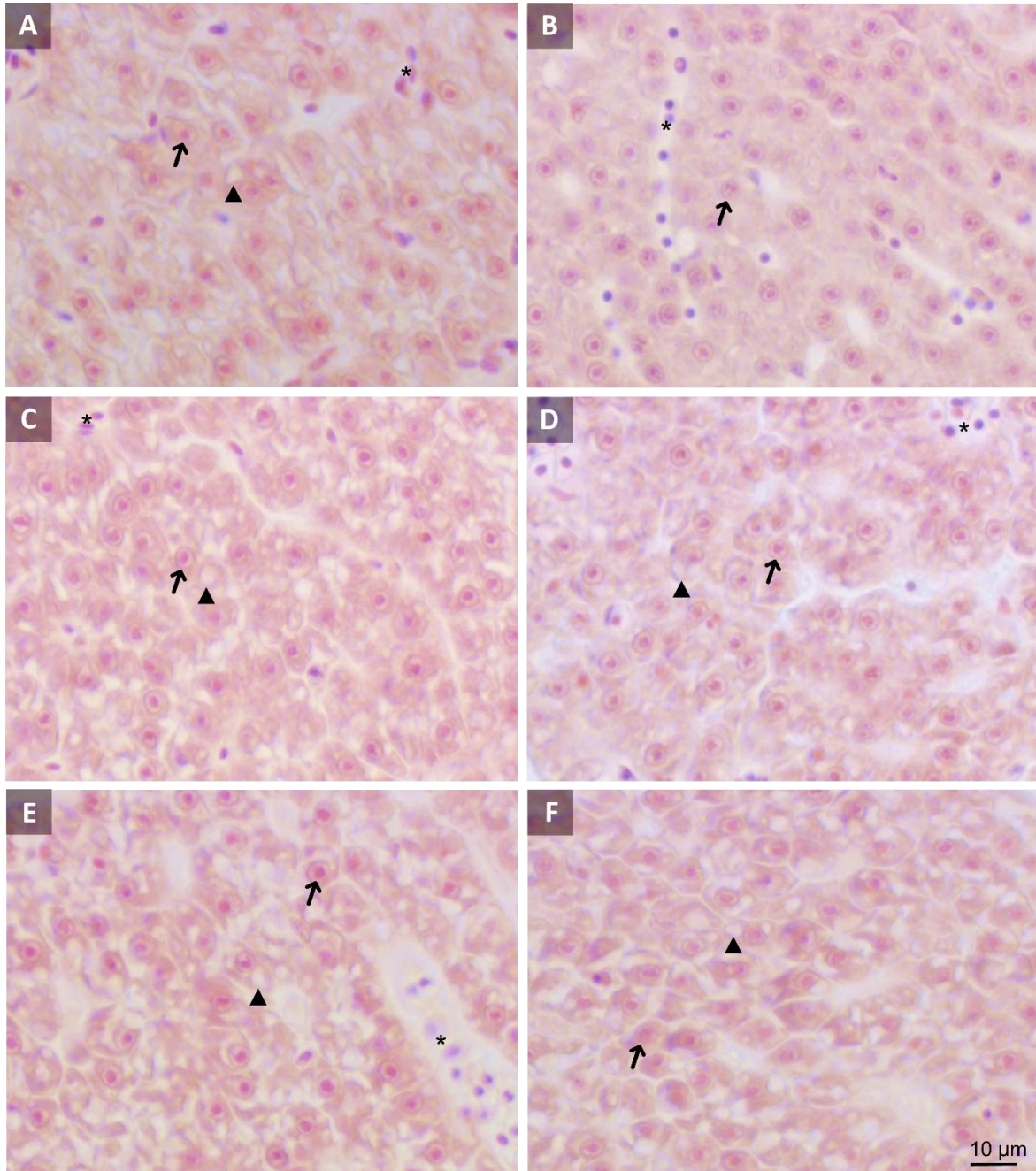


Figura 8. Evaluación histológica por tinción H&E en hígado de pez cebra. Tejido hepático (40X) de los individuos de cada tratamiento. (A) Control; (B) Control + amaranto; (C) Obesidad metabólicamente sana; (D) Obesidad metabólicamente sana + amaranto; (E) Obesidad metabólicamente no sana; (F) Obesidad metabólicamente no sana + amaranto. La flecha indica núcleo de hepatocito; la punta de flecha indica depósito lipídico en hepatocito; el asterisco indica glóbulos sanguíneos.

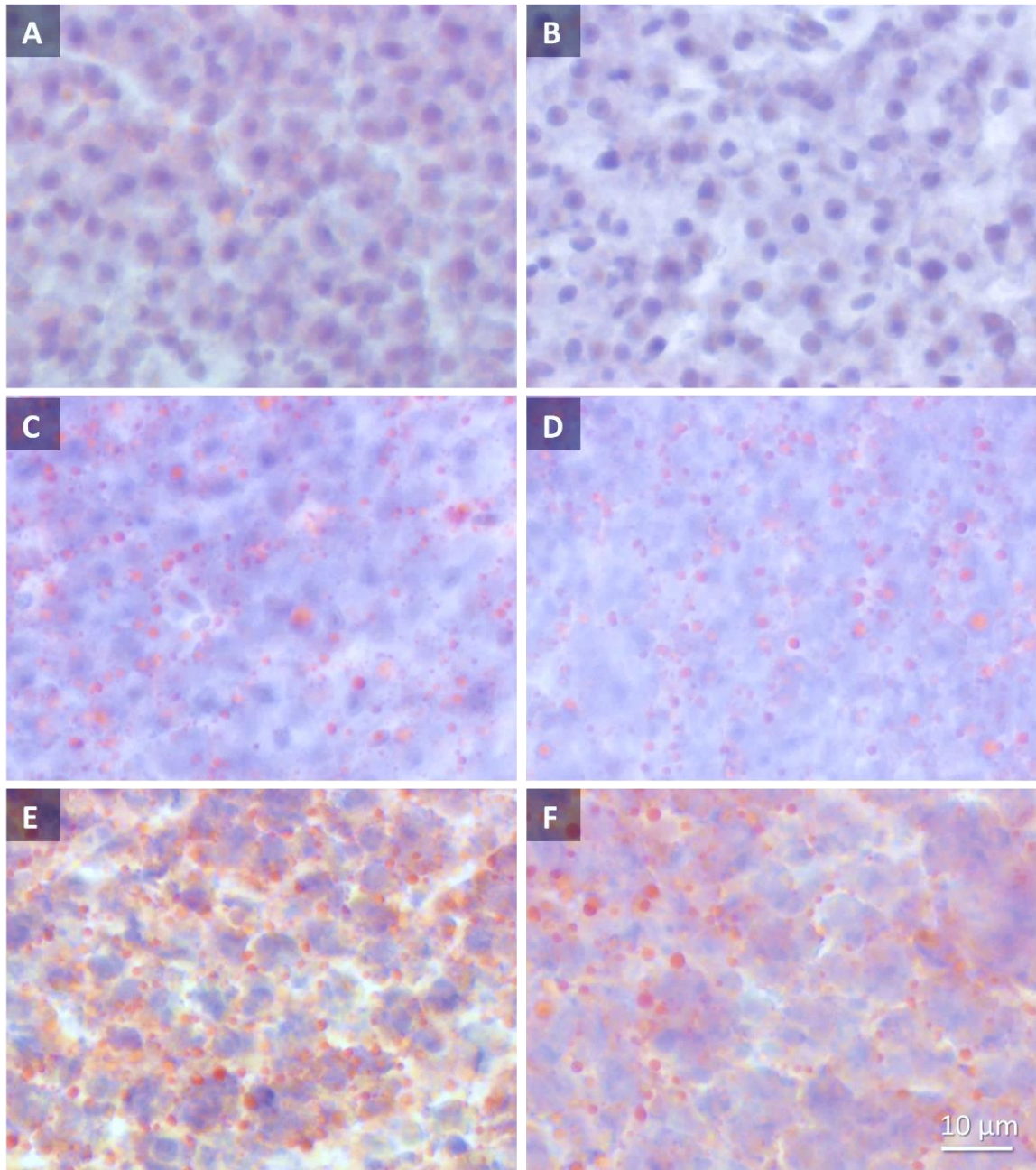


Figura 9. Evaluación histológica por tinción ORO en modelo de obesidad metabólicamente sano y metabólicamente no sano, tras la administración de proteína de amaranto. Cambios en del tejido hepático (40X) tras la inducción de obesidad y la administración de proteína de amaranto. (A) Control; (B) Control + Amaranto; (C) Obesidad sana; (D) Obesidad sana + amaranto; (E) Obesidad no sana; (F) Obesidad no sana + amaranto. La tinción roja indica acumulación de gotas lipídicas.

V. DISCUSION

En el presente estudio se indujeron dos modelos de obesidad en pez cebra, obesidad metabólicamente sana (OS) y metabólicamente no sana (ONS) mediante la administración subcrónica (8 semanas) de dietas hipercalóricas. Landgraf et al. (2017), reportaron el método de inducción de fenotipos de obesidad metabólicamente diferentes en pez cebra dependiendo de la calidad de la dieta, cuyos efectos contemplan el incremento del peso corporal, el desarrollo de esteatosis hepática, hipertrofia adipocitaria en el depósito visceral y diferencias en los niveles de transcritos asociados al metabolismo de lípidos y marcadores inflamatorios. Oka et al. (2010), indicaron que los bajos efectos de saciedad de las dietas con alto contenido graso son los causales de la alta ingesta en el modelo, lo que se asocia con el incremento en el riesgo de desarrollar obesidad. Debido a que el contenido graso de los nauplios de artemia (14.2%) es elevado en comparación a las hojuelas (5%), y que en la yema de huevo (62.5%) es aún más elevado que ambos, la inducción de obesidad es consistente en ambos modelos.

Nuestros resultados mostraron un incremento de IMC en los grupos asociados a obesidad sana y obesidad no sana. Estos datos son soportados por estudios previos, pues la inducción de obesidad se caracteriza por el incremento del IMC tanto en modelos roedores como en pez cebra (Mohammad et al. 2012; Oka et al. 2010). Por otro lado, el mayor incremento en el IMC se observó en los grupos de obesidad sana y obesidad sana + amaranto, en comparación a los peces de los grupos de obesidad no sana. Estos datos concuerdan con lo descrito por Landgraf et al. (2017), pues el IMC de los organismos pertenecientes a la dieta normal con grasa (OS) fueron considerablemente más altos en comparación con los peces de la dieta alta en grasas (ONS). Se ha determinado que el IMC no es un parámetro de medición para determinar la severidad de la obesidad, principalmente por su inutilidad para diferenciar los depósitos de grasa (Iacobini et al. 2018). Esto podría explicar que el incremento en el valor del IMC no está necesariamente correlacionado con el incremento de la severidad de la obesidad, es decir, que un IMC alto esté asociado a OS y que un valor muy alto lo esté a la ONS. Por tal motivo,

el IMC de los peces ONS no necesariamente deben presentar un IMC más alto que aquellos peces asociados con OS.

El IHS se vio afectado por un incremento significativo en el grupo de OS de manera sexo dependiente en hembras. Así como también la composición del contenido graso visceral en todos los grupos a los que se les indujo la obesidad. Estudios previos han reportado que las dietas ricas en grasas causan la deposición de lípidos tanto en el hígado como en el tejido adiposo y muscular (Nanton et al. 2002). Se ha identificado que el incremento del IHS podría resultar de la hiperplasia e hipertrofia del tejido hepático (Islam et al. 2020), lo que concuerda con la identificación de áreas vacuoladas en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 8), es decir, esteatosis en los grupos asociados a obesidad (OS y ONS). Además, se ha reportado la acumulación del tejido adiposo por el excedente de nutrientes, lo cual es característico de los humanos obesos y de modelos a los que se les indujo obesidad por medio de la dieta (Goodman 2014). En pez cebra, se ha identificado el incremento del IHS en individuos obesos tras la exposición al obesogénico, tributiltina (Lyssimachou et al. 2015). Estos conjuntos de evidencias soportan los resultados obtenidos del incremento de la relación del peso del hígado en nuestros grupos de estudio de obesidad.

En cuanto a los niveles detectados de colesterol y triglicéridos en sangre, se ha detectado una tendencia ascendente en los grupos asociados a obesidad. La obesidad metabólicamente no sana (ONS) se caracteriza por una dislipidemia evidente en humanos (Samocho-Bonet et al. 2013). En adición a ello, en modelos de obesidad inducidos por la dieta se conserva el mismo efecto, pues los niveles de colesterol y triglicéridos se elevan bajo esta condición (Marques et al. 2016; Landgraf et al. 2017). Particularmente, nuestros resultados no mostraron un incremento significativo de tales parámetros, pero se evidenció el incremento de triglicéridos tras la inducción de obesidad sana, un mayor incremento de colesterol y triglicéridos tras la inducción de obesidad no sana, y el incremento más alto en aquellos organismos obesos a los que se les administró proteína de amaranto.

Los peces con obesidad sana y no sana mostraron hiperplasia del tejido graso visceral, en mayor medida en los individuos asociados a obesidad no sana.

Se ha reportado que la inducción de obesidad en ratones por medio de una alimentación alta en grasa causa hipertrofia e hiperplasia del tejido graso epididimal y subcutáneo (Herberg et al. 1974). Así mismo, peces cebra como modelo genético de obesidad han evidenciado el desarrollo de hipertrofia adipocitaria (Song y Cone, 2007). Tales características proponen la alteración del tejido graso de manera similar a lo observado en nuestro estudio.

Los grupos asociados a obesidad mostraron esteatosis hepática consistente tras la administración de dietas con alto contenido graso, incluyendo OS y ONS. Las evidencias previas, muestran que los individuos con obesidad, incluyendo la obesidad metabólicamente no sana poseen un riesgo elevado de desarrollar esteatosis hepática (Huh et al. 2017). Sin embargo, los individuos OS presentaron menor acumulación de lípidos en hígado comparado con sujetos ONS (Iacobini et al. 2018). En modelos experimentales, se ha reportado la progresión de esteatosis macrovesicular en ratones bajo una dieta alta en grasa en comparación a ratones alimentados con una dieta baja en grasa (Li et al. 2018). Adicionalmente, se ha demostrado la inducción de un fenotipo similar a esteatosis humana en peces cebra tras la administración de una dieta alta en grasas, por la presencia excesiva de lípidos y expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos (Dai et al. 2015). Nuestros resultados indican mayor severidad de esteatosis en los grupos asociados a obesidad no sana, lo cual coincide con las evidencias mencionadas.

Al amaranto se le han atribuido una variedad de propiedades nutrimentales, entre las que destacan su rol antihipertensivo, antitumoral, antidiabético, antihiperlipidémico, entre otras (Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa, 2011). Sin embargo, el desarrollo de estas investigaciones ha sido principalmente en modelos *in vitro* o *in vivo* principalmente roedores (Barba de la Rosa et al. 2010; Escobedo-Moratilla et al. 2017), en cambio este tipo de investigaciones ha sido limitado o nulo en pez cebra. El pez cebra ha sido ampliamente utilizado para explorar el impacto de los compuestos bioactivos a través de la dieta, reportando un menor impacto de las dietas obesogénicas sobre síntomas asociados a desórdenes metabólicos como; dislipidemia, altos niveles de glucosa y esteatosis hepática, así como expresión de genes relacionadas con el metabolismo de lípidos (Williams y Watts,

2019). Sin embargo, en el presente estudio evidenciamos por primera vez los efectos nutraceuticos asociados a la administración de la proteína de amaranto en el modelo del pez cebra. El grupo control con ingesta de amaranto, disminuyó sus niveles de colesterol y triglicéridos y se contrarrestó cualquier indicio de esteatosis hepática. Sin embargo, en los grupos de obesidad, se observó mayor crecimiento y ligera inhibición del desarrollo de esteatosis hepática como efecto de la administración de amaranto, sugiriendo que en un organismo obeso el mecanismo de acción de la proteína es diferente.

Se propone que los resultados obtenidos podrían asociarse a la calidad nutritiva del amaranto en el modelo de pez cebra, pues existe evidencia de la influencia en el tamaño corporal y la composición de peces en crecimiento tras la administración de dietas ricas en proteínas, entre las que destaca la proteína aislada de soya. La dieta promueve la acumulación de grasa corporal e incremento del peso tanto en machos como en hembras (Smith et al. 2013). De hecho, Escobedo-Moratilla et al. (2017) demostraron la inhabilidad de la proteína de amaranto, pero no de la soya para prevenir el incremento de peso y acumulación de tejido adiposo bajo una dieta alta en grasa en roedores. También asociaron la dieta de amaranto con el mantenimiento de triglicéridos y colesterol bajo una dieta hipercalórica y la dieta de soya con el incremento en los niveles de triglicéridos y colesterol. A pesar de que el amaranto no mostró una baja en el peso de los ratones obesos, se identificó un incremento significativo de los niveles de expresión de genes asociados a obesidad en ratones obesos y una evidente disminución de expresión de estos tras la administración de la proteína de amaranto. Algunos de los genes incluyen leptina (*Lep*), resistina (*Res*), factor de necrosis tumoral-alfa (*Tnf- α*), proteína de unión a ácidos grasos 4 (*Fabp4*) y ácido graso sintasa (*Fasn*), cuya sobreexpresión se asocia al desarrollo de resistencia a insulina, inflamación crónica asociada a obesidad y diabetes, así como la solubilidad de ácidos grasos en citosol (Escobedo-Moratilla et al 2017). Este trabajo demostró por primera vez cambios en el nivel de expresión de genes en tejido adiposo debido al consumo de amaranto. Todas las evidencias sugieren que en nuestro estudio el efecto podría ser dependiente del modelo experimental y el modo de acción de los compuestos activos provenientes

del amaranto en pez cebra. Sin embargo, también demuestra que los efectos en pez cebra podrían evidenciarse más allá del fenotipo de obesidad, sobre algunos marcadores moleculares de la regulación de expresión de genes asociados a obesidad.

En general, los datos obtenidos indican que el diseño experimental utilizado fue apropiado para inducir ambos tipos de obesidad (OS y ONS) en el modelo, pues es consistente con el estado de obesidad de diversos modelos de estudio, incluyendo roedores e incluso humanos (Oka et al. 2010; Casper et al. 2008). Sin embargo, una batería de estudios moleculares podría complementar los datos previamente presentados y corroborar si la ingesta de proteína de amaranto tiene mayor efecto benéfico sobre la condición de obesidad en nuestro modelo de estudio.

VI. CONCLUSIONES

La alimentación con dietas hipercalórica en pez cebra induce fenotipos de obesidad metabólicamente diferentes.

La inducción de obesidad sana y no sana por medio de la dieta promueve el incremento del IMC y el IHS (en hembras), la acumulación de grasa visceral, el desarrollo de esteatosis hepática y tiende a incrementar los niveles de lípidos en sangre.

La administración de proteína de amaranto en peces cebra control, contrarresta el desarrollo de esteatosis hepática y tiende a disminuir los niveles de lípidos en sangre.

La administración de proteína de amaranto en peces cebra con obesidad provocó un mayor crecimiento y protección frente al desarrollo de esteatosis hepática, pero no tiene efecto sobre la reducción del IHS, grasa visceral o lípidos sanguíneos.

VII. PERSPECTIVAS

Analizar el perfil proteómico, empleando proteómica *shotgun* semicuantitativa, mediante la extracción de proteína total del hígado de peces cebra en los grupos analizados.

Identificar las proteínas diferencialmente acumuladas y su función por búsqueda en base de datos.

VIII.REFERENCIAS

- Abarca-Gómez, L., Abdeen, Z. A., Hamid, Z. A., Abu-Rmeileh, N. M., Acosta-Cazares, B., Acuin, C., ..., Agyemang, C. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, *390*(10113), 2627-42. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3.
- Barba de la Rosa, A. P., Barba Montoya, A., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledesma, B., León-Galván, M. F., De León-Rodríguez, A., González, C. (2010). Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide* *23*(2), 106–111. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.006.
- Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A., Wang, Y., Banks, A. S., Lavery, H. J., Haq, A. K., Maratos-Flier, E., Neel, B. G., Schwartz, M. W., Myers Jr, M. G. (2003). *Nature* *421*(6925): 856-9. DOI: 10.1038/nature01388.
- Braissant, O., Wahli, W. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α , - β , and - γ during rat embryonic development. *Endocrinology* *139*, 2748–2754.
- Bressani, R., García-Vela, L.A. (1990). Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *J Agr Food Chem* *38*, 1205-1209. DOI: 10.1021/jf00095a010.
- Casper, R. C., Sullivan, E. L. y Tecott, L. (2008). Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology* *199*(3), 313-329. DOI: 10.1007/s00213-008-1102-2.
- Caro, J. F., Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H., ... Considine, R. V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *The Lancet* *348*(9021), 159–161. DOI:10.1016/s0140-6736(96)03173-x.
- Czerwiński, J., Bartnikowska, E., Leontowicz, H., Lange, E., Leontowicz, M., Katrich, E., ... Gorinstein, S. (2004). Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *J Nutr Biochem* *15*(10), 622–629. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2004.06.002.
- Dai, W., Wang, K., Zheng, X., Chen, X., Zhang, W. y Zhang, Y. (2015). High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. *Nutr Metab* *12*, 42. DOI: 10.1186/s12986-015-0036-z
- Dávila-Torres, J., Gonzales-Izquierdo, J., Barrera-Cruz, A. (2015). Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* *53*(2), 240-9.
- Ding, Y.J., Sun, C.Y., Wen, C.C., Chen, Y.H. (2015). Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish. *Toxins* *7*(1), 97–109. DOI: 10.3390/toxins7010097
- Dixon, J. B., Bhathal, P. S., O'Brien, P. E. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholicSteatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* *121*(1), 91–100. DOI: 10.1053/gast.2001.25540.

- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77, 67–82. DOI: 10.1016/j.fitote.2005.11.008.
- Escobedo-Moratilla, A., Velarde-Salcedo, A. J., Magaña-Hernández, C. V., Barrera-Pacheco, A., Espitia-Rangel, E., Herrera-Estrella, A., Barba de la Rosa, A. P. (2017). Amaranth protein improves lipid profile and insulin resistance in a diet-induced obese mice model. *J Food Nutr Res* 5(12), 914-924. DOI: 10.12691/jfnr-5-12-6.
- FAO (1973) Energy and protein requirements. Nutrition Meeting Report Series 52. Food and Agriculture Organization, Rome. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41042>.
- Folsom, A. R., Jacobs, D. R., Wagenknecht, L. E., Winkhart, S. P., Yunis, C., Hilner, J.E., Savage, P. J., Smith, D. E., Flack, J. M. (1996) Increase in fasting insulin and glucose over seven years with increasing weight and inactivity of young adults. The CARDIA Study. Coronary artery risk development in young adults. *Am J Epidemiol* 144,235–246. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a008918.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Food Chem* 126(3), 878–884. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.065.
- García-Monzón, C., Martín-Pérez, E., Lo Lacono, O.L., Fernández-Bermejo, M., Majano, P. L., Apolinario, A., Larrañaga, E., Moreno-Otero, R. (2000). Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 33:716-724. DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80301-3.
- Goodman, Z. The impact of obesity on liver histology. *Clin Liver Dis.* 18(1), 33-40. DOI: 10.1016/j.cld.2013.09.010.
- Gómez-Cardona, E.E., Hernández-Domínguez, E.E., Huerta-Ocampo, J.Á., Jiménez-Islas, H., Díaz-Gois, A., Velarde-Salcedo, J., Barrera-Pacheco, A, Goñi-Ochoa, A., Barba de la Rosa, A.P. (2017). Effect of amaranth consumption on diabetes-related biomarkers in patients with diabetes. *Diabetes Obes Metab Disord* 3, 5–10.
- González, C. A., Pera, G., Quirós, J. R., Lasheras, C., Tormo, M. J., Rodriguez, N., Navarro, C., Martinez, C., Dorronsoro, M., Chirlaque, M. D., Beguiristain, J. M., Barricarte, A., Amiano, P., Agudo, A. (2000). Types of fat intake and body mass index in a Mediterranean country. *Public Health Nutr.* 3(3), 329-336. DOI:10.1017/s1368980000000379.
- Gorissen, M., Bernier, N. J., Nabuurs, S. B., Flik, G., Huising, M. O. (2009). Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *J Endocrinol* 201(3), 329-339. DOI: 10.1677/JOE-09-0034.
- Hasumura, T., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Nishimura, Y., Meguro, S., Takema, Y., Tanaka, T. (2012). Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. *Nutr Metab* 9, 73. DOI:10.1186/1743-7075-9-73.
- Herberg, L., Döppen, W., Major, E. y Gries, F.A. (1974). Dietary-induced hypertrophic-hyperplastic obesity in mice. *J Lipid Res* 15(6), 580-5. PMID: 4430881.

- Hibuse, T., Maeda, N., Funahashi, T., Yamamoto, K., Nagasawa, A., Mizunoya, W., Kishida, K., Inoue, K., Kuriyama, H., Najamura, T., Fushiki, T., Kihara, S., Shimomura, I. (2005) Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10993-10998. DOI: 10.1073/pnas.0503291102.
- Hill, M.A. (2020, October 10) Embryology Zebrafish Development. Recuperado de https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Zebrafish_Development
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Matthews, L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446), 498–503. DOI:10.1038/nature12111.
- Hsu, C. C., Lai, C. Y., Lin, C. Y., Yeh, K. Y., Her, G. M. (2017). MicroRNA-27b depletion enhances endotrophic and intravascular Lipid accumulation and induces adipocyte hyperplasia in zebrafish. *Int J Mol Sci* 19: E93. DOI: 10.3390/ijms19010093.
- Huerta-Ocampo, J. A., Barba de la Rosa, A. P. (2011). Amaranth: A pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Cur Nutr Food Sci* 7, 1-9. DOI: 10.2174/157340111794941076
- Hugo, S. E., Schlegel, A. (2017). A genetic screen for zebrafish mutants with hepatic steatosis identifies a locus required for larval growth. *J Anat* 230, 407–413. DOI: 10.1111/joa.12570
- Huh, J., Kim, K., Kim, S., Han, S., Han, K., Cha, B., Chung, C. y Lee, B. (2017). Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. *Metab* 66, 23–31. DOI: 10.1016/j.metabol.2016.10.003
- Iacobini, C., Pugliese, G., Blasetti, C., Federici, M. y Menini, S. (2018). Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metab* 92, 51-60. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.009
- Ibabe, A., Bilbao, E., Cajaraville, M. P. (2005). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) depending on gender and developmental stage. *Histochem Cell Biol* 123, 75–87. DOI: 10.1007/s00418-004-0737-2.
- Islam, M., Kunzmann, A., Bogner, M., Meyer, A., Thiele, R. y Slater, M. (2020). Metabolic and molecular stress responses of European seabass, *Dicentrarchus labrax* at low and high temperature extremes. *Ecol Indic* 112, 106118. DOI: 10.1016/j.ecolind.2020.106118.
- Jones, K. S., Alimov, A. P., Rilo, H. L., Jandacek, R. J., Woollett, L.A., Penberthy, W. T. (2008) A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutr Metab* 5, 23. DOI: 10.1186/1743-7075-5-23.
- Kang, M.C., Lee, S.-H., Lee, W.-W., Kang, N., Kim, E.-A., Kim, S. Y., ... Jeon, Y.J. (2014). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Ishige okamurae* against high-glucose induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells and zebrafish model. *J Funct Foods* 11, 304–312. DOI: 10.1016/j.jff.2014.09.007

- Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405:421–424. DOI: 10.1038/35013000.
- Kim, H. K., Kim, M. J., Cho, H. Y., Kim, E.-K., Shin, D. H. (2006). Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 24(3), 195–199. DOI: 10.1002/cbf.1210
- Klein, S., Burke, L. E., Bray, G. A., Blair, S., Allison, D. B., Pi-Sunyer, X., Hong, Y., Eckel, R. H. (2004) Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American heart association council on nutrition, physical activity, and metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation* 110, 2952–2967. DOI: 10.1161/01.CIR.0000145546.97738.1E.
- Kopelman, P. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404(6778), 635-43. DOI: 10.1038/35007508.
- Kostyra, H. (1996) Food proteins—evolution and nutritional aspects. En: Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. COST98 vol 1 pp 86.
- Lado, M.B., Burini, J., Rinaldi, G. et al (2015). Effects of the dietary addition of amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) protein isolate on antioxidant status, lipid profiles and blood pressure of rats. *Plant Foods Hum Nutr* 70, 371–379. DOI:10.1007/s11130-015-0516-3.
- Landgraf, K., Schuster, S., Meusel, A., Garten, A., Riemer, T., Schleinitz, D., Kiess, W. y Koner, A. (2017). Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. *BMC Physiol* 17(1), 4. DOI: 10.1186/s12899-017-0031-x.
- Lankisch, M., Layer, P., Rizza, R. A., Di Magno, E. P. (1998). Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas* 17, 176-181. DOI: 10.1097/00006676-199808000-00011.
- Li, X., Wang, Z., Klaunig, J. (2018). Modulation of xenobiotic nuclear receptors in high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicol* 410, 199-213. DOI: 10.1016/j.tox.2018.08.007
- Lin, S., Thomas, T. C., Huang, X. F. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes* 24, 639-646. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801209.
- Liu, Y. Y., Schultz, J. J., Brent, GA. (2003). A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J Biol Chem*. 278, 38913-38920. DOI: 10.1074/jbc.M306120200.
- Liu, Y., Han, SL., Luo, Y. et al. (2020) Impaired peroxisomal fat oxidation induces hepatic lipid accumulation and oxidative damage in Nile tilapia. *Fish Physiol Biochem* 46, 1229–1242. DOI: 10.1007/s10695-020-00785-w
- Lyssimachou, A., Santos, J., Andre, A., Soares, J., Lima, D., Guimaraes, L., Almeida, M., Teiceira, C., Castro, F. y Santos, M. The Mammalian “Obesogen” Tributyltin Targets Hepatic Triglyceride Accumulation and the Transcriptional Regulation of Lipid Metabolism in the Liver and Brain of Zebrafish. *PLOS ONE*, 10(12), e0143911. DOI: 10.1371/journal.pone.0143911

- Maldonado-Cervantes, E., Jeong, H.J., León-Galván, F., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., González de Mejía, E., De Lumen, B.O., Barba de La Rosa, A.P. (2010). Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 3,11635–42. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.014.
- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A y Calhau, C. (2016). High-fat diet-induced obesity rat model: a comparison between Wistar and Sprague–Dawley Rat. *Adipocyte* 5(1):11-21. DOI: 10.1080/21623945.2015.1061723
- Marza, E., Barthe, C., André, M., Villeneuve, L., Hérou, C., Babin, P. J. (2005). Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Dev Dyn* 232(2), 506-18. DOI: 10.1002/dvdy.20251.
- Matthews, M. y Varga, Z. M. (2012). Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR* 53(2), 192-204. DOI: 10.1093/ilar.53.2.192.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., Woutersen, R. A. (2011). Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicol Pathol* 39(5), 759–775. DOI: 10.1177/0192623311409597.
- McQuade, J. A., Benoit, S. C., Xu, M., Woods, S. C., Seeley, R. J. (2004). High-fat diet induced adiposity in mice with targeted disruption of the dopamine-3 receptor gene. *Behav Brain Res* 151, 313-319. DOI: 10.1016/j.bbr.2003.09.034.
- Meguro, S., Hasumura, T., Hase, T. (2015). Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. *PLoS ONE* 10, e0120142. DOI: 10.1371/journal.pone.0120142.
- Mohammad R., N., Samira, R., Zahra, V. J. y Hassan, A. (2012). Effects of high-fat diet on the numerical density and number of neuronal cells and the volume of the mouse hypothalamus: a stereological study. *Anat Cell Biol* 45(3), 178–184. DOI:10.5115/acb.2012.45.3.178
- Mynatt, R. L., Stephens, J.M. (2003). Regulation of PPARgamma and obesity by agouti/melanocortin signaling in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci* 994, 141-146. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03173.x.
- Nanton, D., Lall, S. y McNiven, M. (2002). Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquac Res* 32(s1), 225-234. DOI: 10.1046/j.1355-557x.2001.00019.x
- National Academy of Science (1984) Amaranth: Modern Prospects for an Ancient Crop, National Academy Press, Washington, D.C., 1.
- Nishio, S., Gibert, Y., Bernard, L., Brunet, F., Triqueneaux, G., Laudet, V. (2008). Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation. *Dev Dyn* 237(6), 1682-1690. DOI: 10.1002/dvdy.21559.
- Ogawa, Y., Masuzaki, H., Hosoda, K., Aizawa-Abe, M., Suga, J., Suda, M., Ebihara, K., Iwai, H., Marsuoka, N., Satoh, N., Odaka, H., Kasuga, H., Fujisawa, Y., Inoue, G., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Nakao, K. (1999). Increased Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity in Transgenic Skinny Mice Overexpressing Leptin. *Diabetes* 48 (9), 1822-9. DOI: 10.2337/diabetes.48.9.1822

- Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., Kuroyagani, J., Nishimura, N., Tanaka, T. (2010). Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol* 10, 21. DOI: 10.1186/1472-6793-10-21.
- Olguín-Calderón, D., González-Escobar, J. L., Ríos-Villa, R., Dibildox-Alvarado, E., De León-Rodríguez, A., Barba de la Rosa, A. P. (2019). Modulation of caecal microbiome in obese mice associated with administration of amaranth or soybean protein isolates. *J Food Nutr Sci* 69(1), 35-44. DOI: 10.31883/pjfn-2019-0002.
- Organización Mundial de la Salud (1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Ginebra.
- Organización Mundial de la Salud (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO, Serie de informes técnicos. 894.
- Organización Mundial de la Salud (2006). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva no. 311
- Organización Mundial de la Salud (2020). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Pardal, D., Caro, M., Tueros, I., Barranco, A., Navarro, V. (2014). Resveratrol and Piceid Metabolites and Their Fat-Reduction Effects in Zebrafish Larvae. *Zebrafish* 11(1), 32–40. DOI:10.1089/zeb.2013.0893
- Pannevis, M. C., Earle, K. E. (1994). Maintenance energy requirement of five popular species of ornamental fish. *J Nutr* 124(12), 2616S-2618S. DOI: 10.1093/jn/124.suppl_12.2616S.
- Peng, X., Shang, G., Wang, W., Chen, X., Lou, Q., Zhai, G., et al. (2017). Fatty acid oxidation in zebrafish adipose tissue is promoted by 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$. *Cell Rep* 19, 1444–1455. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.066.
- Santoriello, C. y Zon, L. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 122(7), 2337-43. DOI: 10.1172/JCI60434.
- Samocha-Bonet, D., Dixit, V., Kahn, C., Leibel, R., Lin, X., Nieuwdorp, M., Pietiläinen, K., Rabasa-Lhoret, R., Roden, M., Scherer, P. E., Klein, S. y Ravussin, E. (2014). Metabolically healthy and unhealthy obese - the 2013 Stock Conference report. *Obes Rev*, 15(9), 697–708. DOI:10.1111/obr.12199
- Schlegel, A., Stainier, D. Y. (2006). Microsomal triglyceride transfer protein is required for yolk lipid utilization and absorption of dietary lipids in zebrafish larvae. *Biochemistry* 45, 15179–15187. DOI: 10.1021/bi0619268
- Smith, D., Barry, R., Powell, M., Nagy, T., D’Abramo, L. R. y Watts, S. A. (2013). Dietary protein source influence on body size and composition in growing zebrafish. *Zebrafish* 10(3), 439-446). DOI: 10.1089/zeb.2012.0864
- Song, Y., Cone, R. D. (2007). Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J* 21, 2042–2049. DOI: 10.1096/fj.06-7503com.
- Song, Y., Gollig, G., Thacker, T. L., Cone, R. D. (2003). Agouti-related protein (AGRP) is conserved and regulated by metabolic state in the zebrafish, *Danio rerio*. *Endocrine* 22(3), 257-265. DOI: 10.1385/ENDO:22:3:257.

- Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., Krol, E. (2007). Animal models of obesity. *Obes Rev* 8(Suppl 1): 55-61. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2007.00319.x.
- Sun, Q., Zhu, J., Cao, F., Chen, F. (2017). Anti-inflammatory properties of extracts from *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf. *PLOS ONE* 12(7), e0181094. DOI: 10.1371/journal.pone.0181094
- Surwit, R. S., Feinglos, M. N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A. E., Opara, E. C., Kuhn, C. M., Rebuffe-Scrive, M. (1995) Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44, 645–651. DOI: 10.1016/0026-0495(95)90123-x.
- Swinburn, B., Caterson, J., Seidell, W. y James, P. (2004). Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr* 7(1A), 123-46. DOI: 10.1079/phn2003585.
- Tainaka, T., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Zang, L., Oka, T., Nishimura, Y., Nishimura, N., Tanaka, T. (2011). Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutr Metab* 8, 88. DOI:10.1186/1743-7075-8-88.
- Tingaud-Sequeira, A., Ouadah, N., Babin, P. J. (2011). Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *J Lipid Res* 52, 1765–1772. DOI: 10.1194/jlr.D017012.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., Gordon, J. I. (2009). The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med* 1(6), 6ra14–6ra14. DOI:10.1126/scitranslmed.3000322.
- Valcárcel-Yamani B., Caetano da Silva Lannes, S. (2012) Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods. *Food and Public Health* 2, 265-275.
- Vargas, R., Vásquez, I. C. (2017). Effects of overfeeding and high-fat diet on cardiosomatic parameters and cardiac structures in young and adult zebrafish. *Fish. Physiol. Biochem* 43, 1761–1773. DOI: 10.1007/s10695-017-0407-7.
- Velarde-Salcedo, A. J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G. M., Díaz-Gois, A., González de Mejía, E., Barba de la Rosa, A. P. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem* 136(2), 758–764. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.08.
- Velarde-Salcedo, A. J., Regalado-Rentería, E., Velarde-Salcedo, R., Juárez-Flores, B. I., Barrera-Pacheco, A., González de Mejía, E., Barba de la Rosa, A. P. (2017). Consumption of amaranth induces the accumulation of the antioxidant protein paraoxonase/arylesterase 1 and modulates dipeptidyl peptidase IV activity in plasma of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 10(5-6), 181-193. DOI: 10.1159/000486482.
- Vilcacundo, R., Barrio, D. A., Piñuel, L., Boeri, P., Tombari, A., Pinto, A., Welbaum, J., Hernandez-Ledesma, B., Carrillo, W. (2018). Inhibition of lipid peroxidation of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) hydrolyzed protein using zebrafish larvae and embryos. *Plants* 7(3), 69. DOI: 10.3390/plants7030069.

- Wadden, T. A., Bray, G. A. (2018). An Overview of the Treatment of Obesity in Adults, In Handbook of Obesity Treatment. Segunda ed., pp 283 - 308. The Guilford press: New York.
- Wang, Y., Lee, C., Tjep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., Evans, R. M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113(2), 159-170. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00269-1.
- Williams, M. B. y Watts, S. A. (2019). Current basis and future directions of zebrafish nutrigenomics. *Genes Nutr* 14, 34. DOI: 10.1186/s12263-019-0658-2
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S., White, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900–904. doi: 10.1038/36116.
- Zang, L., Shimada, Y., Kawajiri, J., Tanaka, T., Nishimura, N. (2014). Effects of Yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. *J Funct Foods* 10, 499–510. DOI: 10.1016/j.jff.2014.08.002.