

UNIVERSIDAD DE CHILE  
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Doctor Fernando Mönckeberg Barros

“Efecto de la ingesta de harina de semilla de chia rica en fibra en la reversión de la  
esteatosis hepática y otras alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa en  
ratones”

Tesista: Camila Cisternas Cuevas

Director de Tesis: MSc. Ph.D Rodrigo Valenzuela

Co-Director de Tesis: Ph.D Loreto Muñoz

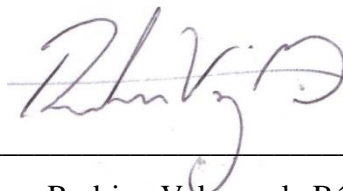
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
MENCIÓN NUTRICIÓN HUMANA.

Fuente de financiamiento FONDECYT n° 1201489

Abril de 2023  
Santiago – Chile

## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la estudiante Camila Paz Cisternas Cuevas ha sido revisado y aprobado por nosotros como Director y Co-director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora.



---

Profesor Rodrigo Valenzuela Báez



---

Profesora Loreto Muñoz

Santiago de Chile, 09 de Abril de 2023

## **1. Cuerpo preliminar**

### **ii. Comisión de tesis**

Juan Pablo Rodríguez, PhD, Profesor Titular y Director de Extensión y Comunicaciones, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Doctor Fernando Mönckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

Omar Porras, PhD, Profesor Asociado, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Doctor Fernando Mönckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

Pamela Rojas, MSc, Profesor Asociado, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

### **iii. Dedicatoria**

A mi esposo e hijo que son los regalos de mi vida, mi alegría constante y mi fuerza para lograr nuestras metas.

A mis padres y hermana, por creer en mi desde el comienzo y ayudarme a crecer como persona y profesional.

#### **iv. Agradecimientos**

Primeramente, quiero agradecer a Dios, sin Él nada sería posible.

Agradezco enormemente a ambos profesores, Rodrigo Valenzuela y Loreto Muñoz, por la orientación, toda la enseñanza recibida, la enorme amabilidad, disposición y motivación en este proceso.

Agradezco a cada persona que me ayudó en esta aventura llamada tesis, desde aprender nuevas técnicas hasta en el orden y limpieza de los utensilios.

Agradezco a los profesores de mi comisión y al profesor Fernando Pizarro, por la enorme disposición a aclarar dudas y los valiosos aportes para desarrollar un mejor trabajo.

Finalmente, agradezco a mi familia por su gran apoyo, amor y paciencia en todo este tiempo.

## v. Índice de contenidos

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>1. Cuerpo preliminar</b>	3
ii. Comisión de tesis	3
iii. Dedicatoria	4
iv. Agradecimientos	5
v. Índice de contenidos	6
vi. Índice de tablas	8
vii. Índice de figuras	9
viii. Anexos	10
ix. Lista de abreviaturas	11
<b>2. Resumen</b>	12
<b>3. Abstract</b>	13
<b>4. Marco teórico</b>	14
3.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico	14
3.2 Patogenia de la EHGNA	15
3.3 Alteraciones metabólicas en la EHGNA	15
3.4 Influencia de la dieta en la generación de EHGNA	16
3.5 Semilla de chia y composición química	17
3.6 Fibra y EHGNA	18
3.7 Formulación general del estudio.	19
<b>5. Hipótesis y objetivos</b>	20
4.1 Pregunta de investigación	20
4.2 Hipótesis	20
4.3 Objetivo general	20
4.4 Objetivos específicos	20
<b>6. Materiales y métodos</b>	22
5.1 Diseño de investigación	22
5.2 Definición de la muestra	22
5.3 Protocolo de intervención	22
5.4 Definición de variables	23

5.5 Procedimientos y técnicas	24
5.6 Plan de análisis y técnicas estadísticas	28
<b>7. Resultados</b>	29
7.1 Composición proximal de harina de semilla de chia rica en fibra y harina de avena	29
7.2 Efecto de las intervenciones en características corporales e ingesta por grupo experimental	29
7.3 Efecto de las intervenciones en parámetros de esteatosis hepática	30
7.4 Efecto de las intervenciones sobre alteraciones en el perfil lipídico y parámetros metabólicos	33
7.5 Efecto de la ingesta de harina de semilla de chia en el estrés oxidativo e inflamación en ratones alimentados con HFD	34
7.6 Efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre el perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos	35
7.7 Efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta en heces	36
<b>8. Discusión</b>	37
<b>9. Conclusiones</b>	44
<b>10. Referencias</b>	45

**vi. Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b>	Grupos experimentales	23
<b>Tabla 2.</b>	Parámetros metabólicos por grupo experimental.	33



## vii. Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Histología hepática	31
<b>Figura 2.</b>	<b>A.</b> Score de esteatosis	32
	<b>B.</b> Grasa Hepática total (g/100g hígado)	32
	<b>C.</b> TAG hepáticos (mg/g de hígado)	32
	<b>D.</b> Colesterol hepático (mg/g de hígado)	32
<b>Figura 3.</b>	<b>A.</b> Aspartato aminotransferasa (GOT)	32
	<b>B.</b> Alanina aminotransferasa (GPT)	32
	<b>C.</b> Gamma-glutamil transferasa (GGT)	32
<b>Figura 4.</b>	<b>A.</b> Carbonilos proteicos	34
	<b>B.</b> TBARs	34
	<b>C.</b> F8-Isoprostanos.	34
<b>Figura 5.</b>	<b>A.</b> TNF-Alpha en plasma (pg/mL).	35
	<b>B.</b> IL-1beta en plasma (pg/mL)	35
	<b>C.</b> IL-6 en plasma (pg/mL)	35

## **viii. Anexos**

<b>Anexo 1.</b>	Protocolo de intervención	51
<b>Anexo 2.</b>	Información nutricional y composición de las dietas experimentales	52
<b>Anexo 3.</b>	Composición proximal de harina de chia rica en fibra y harina de avena	53
<b>Anexo 4.</b>	Perfil de ácidos grasos de harina de semilla de chia rica en fibra y harina de avena	54
<b>Anexo 5.</b>	Características generales de los animales	55
<b>Anexo 6.</b>	Característica corporales	56
<b>Anexo 7.</b>	Control de ingesta	57
<b>Anexo 8.</b>	Ingesta dietaria por grupo experimental	58
<b>Anexo 9.</b>	Perfil de ácidos grasos hepáticos por grupo experimental	59
<b>Anexo 10.</b>	Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal por grupo experimental	60
<b>Anexo 11.</b>	Perfil de ácidos grasos en eritrocitos por grupo experimental	61
<b>Anexo 12.</b>	Concentración de ácidos grasos de cadena corta	62

## **ix. Lista de abreviaturas**

<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AGPI</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>AGS</b>	Ácidos grasos saturados
<b>ALA</b>	Ácido alfa-linolénico
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>CD</b>	Dieta control
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EHGNA</b>	Enfermedad por hígado graso no alcohólico
<b>EMAG</b>	Ésteres metílicos de ácidos grasos
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
<b>GGT</b>	Gamma-glutamyl transferasa
<b>GOT</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>GPT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HAV</b>	Harina de avena
<b>HCH</b>	Harina de semilla de chia rica en fibra
<b>HFD</b>	Dieta alta en grasas
<b>HOMA-IR</b>	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1-beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>LA</b>	Ácido linoleico
<b>MAFLD</b>	Enfermedad del hígado graso asociada con la disfunción metabólica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de Salud
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>SPS</b>	South Pacific Seeds
<b>TAG</b>	Triglicéridos
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa

## 2. Resumen

**Introducción:** La enfermedad por hígado graso no alcohólico se caracteriza por ser la enfermedad hepática con mayor prevalencia a nivel mundial, en la cual existe un aumento de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis), progresando hasta llegar a cirrosis o hepatocarcinoma. Esta patología se asocia a diversas alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina, aumento de estrés oxidativo e inflamación. La fibra dietética, cumple un papel fundamental en la regulación de estos parámetros por lo que contribuye al control de la enfermedad. La chia (*Salvia hispanica L.*) es una semilla originaria de Latinoamérica que se caracteriza por presentar un elevado contenido fibra dietética, siendo predominantemente de tipo insoluble. **Objetivo:** Evaluar los efectos del consumo de harina de semilla de chia rica en fibra sobre el desarrollo de esteatosis hepática y otras alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa en ratones. **Métodos:** Ratones macho C57BL/6J fueron asignados aleatoriamente a grupos con dieta control (CD, 10% energía como grasa) o dieta alta en grasa (HFD, 60% energía como grasa) por 10 semanas. Posterior a ello, se suplementaron vía oral con harina de semilla de chia rica en fibra (HCH) o harina de avena (HAV), en presencia de HFD, por 4 semanas más. Se evaluaron parámetros de daño y esteatosis hepática, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, inflamación, perfil lipídico sérico y perfil hepático de ácidos grasos. **Resultados:** La alimentación con HFD indujo esteatosis hepática y alteraciones metabólicas. La ingesta de HCH protegió significativamente frente a la HFD a través de *i*) disminución de la esteatosis hepática; *ii*) disminución en los niveles de TG y colesterol hepáticos *iii*) normalización de niveles de TG plasmáticos similar a CD *iv*) disminución de carbonilos proteicos *v*) disminución de IL-6. **Conclusión:** La ingesta de HCH generó una protección moderada frente al daño ocasionado por HFD en ratones macho C57BL/6J, por lo cual podría ser considerada como un potencial terapéutico para el manejo de la esteatosis hepática en ratón.

### 3. Abstract

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease is characterized by being the most prevalent liver disease worldwide, in which there is an increase in triglycerides in hepatocytes (steatosis), progressing to cirrhosis or hepatocarcinoma. This pathology is associated with various metabolic alterations such as insulin resistance, increased oxidative stress and inflammation. Dietary fiber plays a fundamental role in the regulation of these parameters, contributing to the control of the disease. Chia (*Salvia hispanica L.*) is a seed native to Latin America that is characterized by its high content of dietary fiber, being predominantly of the insoluble type. **Objective:** Evaluate the effects of consuming high-fiber chia seed meal on the development of hepatic steatosis and other metabolic alterations induced by a high-fat diet in mice. **Methods:** Male C57BL/6J mice were randomly assigned to a control diet (CD, 10% energy as fat) or a high-fat diet (HFD, 60% energy as fat) for 10 weeks. Subsequently, they were orally supplemented with fiber-rich chia seed meal (HCH) or oatmeal (HAV), in presence of HFD, for 4 more weeks. Parameters of liver damage and steatosis, insulin resistance, oxidative stress, inflammation, serum lipid profile, and hepatic fatty acid profile were evaluated. **Results:** HFD feeding induced hepatic steatosis and metabolic alterations. HCH intake significantly protected against HFD through i) decreased hepatic steatosis; ii) decrease in hepatic TG and cholesterol levels iii) normalization of plasma TG levels like CD iv) decrease in protein carbonyls v) decrease in IL-6. **Conclusion:** HCH intake generated moderate protection against damage caused by HFD in male C57BL/6J mice, therefore it could be considered a potential therapeutic for the management of hepatic steatosis in mice.

## 4. Marco teórico

### 4.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA)

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por un aumento en los depósitos de grasa en los hepatocitos, excediendo el 5% del peso del hígado si el alcohol, drogas o un virus se excluyen como causa primaria (1). El diagnóstico de esta patología se realiza principalmente mediante técnicas de imagen radiológica, existiendo otros métodos indirectos para detectarla y encontrando en algunos individuos elevaciones leves en enzimas hepáticas como alanina aminotransferasa (ALT) o glutamato piruvato transaminasa (GPT) y aspartato aminotransferasa (AST) o transaminasa glutámica-oxaloacética (GOT) (2). La EHGNA es una patología compleja debido a los mecanismos involucrados en ésta, ya que, se origina por las interacciones entre la dieta, la genética y los estilos de vida, por lo que esta enfermedad se asocia a obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico (3,4,5). Existen diferentes etapas de esta enfermedad, comenzando con esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis hepática hasta llegar a hepatocarcinoma y trasplante de hígado (5). El principal factor de riesgo de esta enfermedad es la obesidad y especialmente la obesidad abdominal, donde podemos encontrar una asociación positiva entre el aumento de peso corporal y la presencia de esta enfermedad (5,6). La prevalencia de EHGNA en la población adulta a nivel mundial es del 20-30%, siendo en Norteamérica un 24%, Sudamérica 30%, Asia 27%, Medio Oriente 37%, Europa 23% y África 13% (3).

Desde el año 2020, el término EHGNA fue sustituido y modificado a “enfermedad del hígado graso asociada con la disfunción metabólica” (de sus siglas en inglés, MAFLD), debido al componente metabólico asociado a esta enfermedad y otorgándole criterios diagnósticos explícitos como presentar esteatosis hepática detectada por técnicas imagenológicas, marcadores bioquímicos o biopsia hepática; presentar un estado nutricional de sobrepeso u obesidad y/o tener diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y/o presentar al menos 2 anormalidades metabólicas (circunferencia de cintura, presión

arterial, triglicéridos plasmáticos o PCR elevados, HDL bajo, prediabetes o resistencia a la insulina) (7,8).

#### 4.2 Patogenia de la EHGNA

La patogenia de la EHGNA aún no es precisa debido a la complejidad de la enfermedad. La hipótesis de dos golpes, donde el primero impulsaría el desarrollo de esteatosis hepática mediante la acumulación de grasa en el hígado, mientras que el segundo golpe se desencadenaría por la inflamación y fibrosis producidas, ha sido reemplazada por la hipótesis de los impactos múltiples donde influyen factores genéticos, obesidad, los estilos de vida no saludables, diabetes, resistencia a la insulina y la microbiota intestinal (9,10).

En este contexto, el primer desencadenante de la EHGNA es la malnutrición por exceso, lo que conlleva a un aumento del tejido adiposo y la acumulación de grasa ectópica. Cuando esto ocurre, prosigue una infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, lo que estimula un estado proinflamatorio que promueve la resistencia a la insulina (RI). Al mismo tiempo, la RI producida genera una desregulación en la lipólisis, entregando de igual manera ácidos grasos al hígado y aumentando la lipogénesis de *ново*, llevando al límite la capacidad metabólica del hígado. Esta desregulación en el metabolismo lipídico produce estrés celular lo que contribuye a la fibrogénesis. En el último tiempo, se han desarrollado hipótesis que indican que la EHGNA sería una manifestación del síndrome metabólico, ya que su evento desencadenante en común es la RI (11). Un estudio de Zelber-Sagi y cols. donde se realizó un seguimiento prospectivo durante 7 años en 147 pacientes que no presentaban EHGNA, se encontró que el aumento de peso y la RI fueron predictores para la incidencia de EHGNA, logrando revertirse si existía una pérdida de peso (12).

#### 4.3 Alteraciones metabólicas en la EHGNA

La EHGNA se ha considerado una enfermedad multisistémica ya que también afecta a órganos extrahepáticos y a vías regulatorias (13). Ante el aumento de la ingesta de

calorías, fructosa, glucosa o ácidos grasos (triglicéridos), el intestino queda expuesto a triglicéridos, lipopolisacáridos y ácidos grasos libres de manera exacerbada, lo que puede causar un sobrecrecimiento bacteriano y acumulación de grasa en los hepatocitos. Esta acumulación se asocia a un aumento en la secreción de hepatoquinas y también a la inhibición de la señalización de insulina, generando resistencia a la insulina (14). Al respecto, la insulina controla la producción de glucosa hepática regulando la lipólisis en los adipocitos, lo que en consecuencia disminuye el flujo de ácidos grasos libres. Debido a esto, es que la RI hepática suprime la producción de glucosa, pero con conservación de lipogénesis y sin suprimir la lipólisis liberando ácidos grasos (15). El aumento de ácidos grasos libres puede causar lipotoxicidad, lo cual conduce a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Además, la excesiva presencia de ácidos grasos conlleva a una disfunción mitocondrial generando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (9).

#### 4.4 Influencia de la dieta en la generación de EHGNA

En los últimos años, el aumento en la ingesta energética debido al consumo de alimentos procesados con alto contenido de grasas, sal y azúcar ha afectado la salud de las personas a nivel mundial (16). La ingesta en grandes cantidades de ácidos grasos saturados (AGS) junto con hidratos de carbono simples logran un aumento en los depósitos de ácidos grasos y lipogénesis en el hígado en personas generalmente con obesidad ya que se caracterizan por tener una dieta con las características mencionadas (17). Los hidratos de carbono cumplen un papel fundamental en los pacientes con EHGNA, específicamente el jarabe de maíz alto en fructosa, almidón y glucosa, ya que se ha visto una estrecha relación entre acumulación de grasa hepática, gluconeogénesis, aumento de síntesis y disminución de oxidación de grasas (18). Además, se debe considerar que, en la dieta occidental, el consumo de pescados, semillas, frutas y verduras está por debajo de las recomendaciones, lo que indica un bajo consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y fibra, los cuales cumplen un papel importante en la acumulación de grasa hepática, fibrosis e inflamación, logrando una disminución en estos parámetros, además



de revertir la RI y disminuir los triglicéridos séricos (19). En ratones se ha visto que una dieta alta en grasas por 8 a 12 semanas logra inducir esteatosis y daño hepático (20).

#### 4.5 Semilla de chia y composición química

La *Salvia hispanica* L. conocida con el nombre de chia, es una semilla de la familia *Lamiaceae* que se origina en la zona sur de México y Guatemala, siendo utilizada en gran cantidad por los aztecas que habitaban la zona. Luego de la colonización española, el cultivo de esta semilla se domesticó, produciéndose a pequeña escala en ciudades de México, llegando a ser cultivada en varios países de Centroamérica como Ecuador y Guatemala (21). La versatilidad que posee esta semilla en la industria alimenticia ha logrado captar la atención de empresas y comerciantes ya que se puede consumir la semilla entera, extraer aceite u obtener harina, con los cuales se pueden realizar diversas preparaciones culinarias, obteniendo variadas texturas, sabores y aromas (22).

La composición química de la semilla de chia se caracteriza por presentar un elevado contenido de lípidos y fibra dietética, además de una baja humedad. Dentro de sus componentes destaca el gran aporte de ácidos grasos llegando al 30%, de los cuales principalmente son AGPI, donde un 60% corresponden a ácido alfa-linolénico (C18:3n-3, ALA), seguido por un 20% de ácido linoleico (C18:2n-6, LA). Con relación al contenido proteico, la semilla de chia aporta cerca de un 16-26% de proteínas que incluyen aminoácidos esenciales como arginina, leucina, fenilalanina, entre otros. Debido a la cantidad de proteínas encontradas en la chia, se puede obtener de ella aproximadamente 3,613 g de nitrógeno en 100 g (23). En cuanto a la fibra, esta corresponde a un 20-40%, encontrando celulosa, pectina, hemicelulosa, lignina, polisacáridos y oligosacáridos. La fracción de fibra se divide en fibra insoluble, la que corresponde a un 85-93%, mientras que el 7-15% restante es fibra soluble (24). Las vitaminas encontradas en la semilla corresponden principalmente a vitaminas del complejo B como tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico, mientras que los minerales que destacan son calcio, fósforo, magnesio, potasio, selenio, hierro, cobre y zinc. Otros elementos importantes son los compuestos antioxidantes como polifenoles, tocoferoles,

esteroles, isoflavonas y flavonoides como daidzina, genisteina, glicitina, quercetina y kaempferol (25).

#### 4.6 Fibra dietética y EHGNA

El consumo por bajo las recomendaciones de fibra dietética (OMS, EFSA y FDA  $\geq 25$ g por día) en pacientes con EHGNA puede resultar en una disminución de los microorganismos encontrados en la microbiota del huésped, además de aumentar la permeabilidad de lipopolisacáridos, ocasionando inflamación, resistencia a la insulina y aumento del estrés oxidativo conllevando a una progresión de la enfermedad (26,27). Un metaanálisis realizado por Chen y cols. (2018), sugiere que el aumento en la ingesta de fibra dietética total está inversamente asociada al riesgo de síndrome metabólico, acumulación de lípidos hepáticos y resistencia a la insulina, además de lograr una disminución de la grasa corporal, presión arterial, triglicéridos séricos y colesterol LDL (28). Otro estudio de Krawczyk y cols. (2018) que evalúa el efecto de la ingesta de fibra dietética en la permeabilidad intestinal en personas con EHGNA, logra dilucidar que una ingesta adecuada de fibra dietética soluble como insoluble ayuda a mantener la estructura y función de la barrera intestinal, logrando influir de manera positiva en los parámetros asociados a EHGNA (29). Además, según Schweinlin y cols. (2018), donde evaluaron dos intervenciones dietéticas para el tratamiento de la EHGNA, se demostró que la intervención con fibra de avena fue más efectiva en la reducción del contenido de lípidos intrahepáticos (30). En este contexto, la fibra proveniente de la semilla de chia podría tener un impacto aún mayor que la fibra proveniente de otras fuentes debido al contenido de ambos tipos de fibra, soluble e insoluble, ayudando en la disminución de la permeabilidad intestinal asociada al aumento de ácidos grasos libres y mejorando la resistencia a la insulina, logrando un tratamiento eficaz para la EHGNA.

#### 4.7 Formulación general del estudio

La EHGNA es una patología de gran complejidad debido a los mecanismos y alteraciones metabólicas que a ella subyacen, aumentando su prevalencia a nivel mundial. Se conoce su estrecha relación con el síndrome metabólico, estableciendo sus causas en torno al excesivo consumo de grasas saturadas y carbohidratos refinados, y a la baja ingesta de AGPI y fibra dietética. Teniendo en consideración lo antes mencionado, es que se hace imperioso el tratamiento y prevención de la enfermedad. En este contexto, se ha demostrado que la fibra dietética tiene un impacto positivo en el control y prevención de alteraciones metabólicas, teniendo una relación en el tratamiento de la EHGNA, por lo cual el descubrimiento de nuevas fuentes de fibra dietética como la encontrada en la chia podría presentarse como una alternativa terapéutica. Por lo tanto, en base a la evidencia científica presentada, en este estudio se pretenden evaluar los efectos del consumo de harina de semilla de chia rica en fibra sobre el desarrollo de esteatosis hepática y otras alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa en ratones.

## 5. Hipótesis y objetivos

### 5.1 Pregunta de investigación

¿El consumo de harina de semilla de chia, rica en fibra, lograría revertir o atenuar el desarrollo de esteatosis hepática y alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa en ratones?

### 5.2 Hipótesis

La ingesta de harina de semilla de chia revierte el desarrollo de esteatosis hepática y otras alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa (HFD) en ratones.

### 5.3 Objetivo general

Evaluar los efectos del consumo de harina de semilla de chia sobre el desarrollo de esteatosis hepática y otras alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa en ratones.

### 5.4 Objetivos específicos

- 5.4.1 Determinar la composición química proximal de harina de semilla de chia rica en fibra y harina de avena.
- 5.4.2 Evaluar el efecto de la ingesta de harina de semilla de chia sobre daño hepático y esteatosis en ratones alimentados con dieta alta en grasa (HFD).
- 5.4.3 Evaluar el efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre alteraciones en el perfil lipídico y parámetros metabólicos (TAG, CT, C-LDL, C-HDL, glicemia, insulinemia, HOMA-IR y cambios en la composición de ácidos grasos hepáticos).
- 5.4.4 Evaluar el efecto de la ingesta de harina de semilla de chia en el estrés oxidativo e inflamación en ratones alimentados con HFD.

- 5.4.5 Evaluar el efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre el perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos.
- 5.4.6 Evaluar el efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta.

## **6. Materiales y métodos**

### 6.1 Diseño de investigación

Estudio experimental, aleatorizado, controlado, prospectivo, en modelo animal (ratón). El diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBA 1118 FMUCH).

### 6.2 Definición de la muestra

Se utilizaron ratones macho C57BL/6J los cuales se obtuvieron del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el Excel disponible de la Unidad de Epidemiología Clínica y Estadística del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. La variable crítica utilizada fue el cambio en el contenido lipídico hepático con una disminución del 50%, nivel de confianza del 95%, con un poder de 0,7 y una proporción esperada de pérdida de animales del 10%. El tamaño muestral estimado fue 6 ratones por grupo, dando un total de 24 animales.

### 6.3 Protocolo de intervención

Los ratones C57BL/6J fueron asignados aleatoriamente a uno de los grupos experimentales. Vivieron en una habitación con control de temperatura y ciclo luz/oscuridad de 12 horas. En primera instancia, los ratones fueron alimentados con una dieta de adaptación (dieta control) por una semana y luego fueron divididos en 2 grupos, dieta control (CD) y dieta alta en grasa, por 10 semanas. Finalmente, el grupo de HFD se subdividió en 3 grupos, HFD, HFD + harina de avena (HAV) y DAG + harina de semilla de chia (HCH), quedando 4 grupos los cuales fueron: CD, HFD, HFD + HAV, HFD + HCH, por 4 semanas más (ver Tabla 1). La recolección de muestras se realizó a las 14 semanas en la dieta control, dieta alta en grasa, dieta alta en grasa + HAV y dieta alta en grasa + HCH (Anexo 1). Cabe mencionar que la harina de avena fue considerada y utilizada como fibra control.

Tabla 1. Grupos experimentales

Grupo	Intervención
Grupo 1	CD
Grupo 2	HFD
Grupo 3	HFD + HAV
Grupo 4	HFD + HCH

#### 6.4 Definición de variables

6.4.1 Independiente: Intervención con harina de semilla de chia rica en fibra

6.4.2 Dependientes:

- Glicemia (mg/dL)
- Insulinemia ( $\mu$ U/mL)
- Índice HOMA-IR
- TAG séricos (mg/dL)
- Colesterol total sérico (mg/dL)
- Colesterol LDL sérico (mg/dL)
- Colesterol HDL sérico (mg/dL)
- Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) sérico (pg/ml)
- Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) sérica (pg/ml)
- Interleucina-6 (IL-6) sérica (pg/ml)
- Histología hepática (cualitativa y cuantitativa)
- Células hepáticas con infiltración lipídica (%)
- Grasa total en hígado (g de grasa/100 g de hígado)
- Ácidos grasos libres hepáticos (mg/g de hígado)
- Triglicéridos (TAG) hepáticos (mg/g de hígado)
- Niveles séricos de transaminasas GOT, GPT y GGT (U/L)
- Niveles séricos de ácidos grasos libres (AGL) ( $\mu$ M)
- Perfil de ácidos grasos hepáticos totales (% de esteres metílicos de ácidos grasos (% EMAG)).

- F8-isoprostano (pg/ml)
- TBARs séricos (nmol/mg proteína)
- Perfil de ácidos grasos del tejido adiposo epididimal (mg de ácidos grasos/100g de tejido)
- Perfil de ácidos grasos de eritrocitos (mg de ácidos grasos/100g de tejido)
- Concentración de ácidos grasos de cadena corta (mM/g de muestra)

#### 6.4.3 Descriptivas:

- Peso corporal inicial (g)
- Peso corporal final (g)
- Ganancia de peso total (g)
- Ingesta dietaria (g/día)
- Ingesta energética (kcal/día)
- Ingesta de nutrientes (g/día)
- Ingesta de agua (ml)

### 6.5 Procedimientos y técnicas

#### 6.5.1 Dieta y suplementación

Para los animales pertenecientes a cada grupo hubo acceso libre a comida y agua. Ambas dietas son certificadas, con aporte estandarizado de micro y macronutrientes: dieta control (Research Diet INC, dieta de ratón con 10% de las calorías provenientes de grasa, 20% de proteínas, 70% de carbohidratos, libre de fructosa (producto data D12450B.USA.); dieta alta en grasa (Research Diet INC, dieta de ratón con 60% de las calorías provenientes de grasa, 20% proteínas (producto data D12492. USA.), en la cual los hidratos de carbono fueron reemplazados por grasa, pero sigue siendo suficiente en micronutrientes, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos (Anexo 2). La suplementación con harina de semilla de chia fue calculada en base a las recomendaciones de la FDA y EFSA, que corresponde a 25g/día en base a una dieta de 2000 calorías considerando que el 5% es el valor inferior y el 20% es el superior. (EFSA Panel on Dietetic Products, 2010; FDA). La harina de semilla de



chia fue obtenida a partir de semillas de chia cultivadas en Chile por la empresa South Pacific Seeds (SPS). Las semillas fueron procesadas siendo inicialmente desgrasadas por prensado en frío, para posteriormente someter el subproducto obtenido, que denominaremos “pellet”, a molienda y fraccionamiento en seco para obtener la materia prima que se utilizó en esta investigación. En cuanto a la harina de avena, ésta se obtuvo a partir de la molienda de avena tradicional comercializada bajo el nombre “Quaker”. El proceso de producción y caracterización de la harina de semilla de chia rica en fibra dietética y harina de avena se realizó en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Universidad Central de Chile.

#### 6.5.2 Evaluación de la insulinoresistencia

- La glucosa plasmática y la insulina se midió con la prueba de glicemia (kit de Wiener-lab) y el kit de insulina ultra anti-ratón Elisa (Mercodia), respectivamente. La resistencia a la insulina se estimó utilizando el método de evaluación del modelo de homeostasis (HOMA) (Matthews y cols, 1985) (31).

#### 6.5.3 Evaluación del perfil lipídico sérico

- El colesterol (mg por 100 ml), colesterol LDL (mg por 100 ml), el colesterol HDL (mg por 100 ml) y los niveles de triglicéridos (mg/dL) fueron determinados utilizando kits de diagnóstico específicos (Wiener Lab, Argentina).

#### 6.5.4 Evaluación de la inflamación

- Niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ : fueron evaluados mediante kits ELISA disponibles comercialmente (R&D Systems, EE. UU.) Para determinar los niveles séricos de citocinas inflamatorias se utilizó TNF-alfa (catálogo del kit ELISA MTA00B); IL-1B (catálogo kit ELISA PMLB00C), según especificaciones del fabricante. Los valores se expresaron como pg/ml.

#### 6.5.5 Evaluación y determinación del contenido de grasa hepática

- Grasa hepática total: La grasa total de las muestras de hígado se extrajo y cuantificó gravimétricamente de acuerdo con el método de Bligh y Dyer (Bligh & Dyer, 1959) (32). Los valores fueron expresados como g de grasa/100 g de hígado.
- Análisis de ácidos grasos metilados: Las muestras fueron homogenizadas en frío para luego añadir cloroformo y metanol (2:1 v/v). Los lípidos saponificables que se obtuvieron del tejido hepático y fueron derivatizados a ésteres metílicos mediante la incubación a 95°C con BF<sub>3</sub> al 12% en metanol y NaOH saturado en metanol. El perfil de ácidos grasos hepáticos se realizó mediante cromatografía gas – líquido, utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con detector FID. Se utilizó los ácidos grasos C15:0, C17:0 o C23:0 (Nu-Check Prep, EE. UU.) como estándares internos. Los valores fueron expresados como mg de ácidos grasos/100g de tejido.
- TAG hepáticos y AGL en hígado: Los triglicéridos (TAG) y los ácidos grasos libres (AGL) se evaluaron mediante un kit de ensayo enzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) y se normalizaron mediante el peso del hígado (Echeverría y cols., 2018) (33).

#### 6.5.6 Evaluación de daño hepático y esteatosis

- Evaluación histológica: evaluación cuantitativa (en base a la acumulación hepática de lípidos medida como porcentaje de células con infiltración de vesículas lipídicas) y cualitativa (presencia o ausencia de esteatosis, inflamación y necrosis).
- Niveles séricos de transaminasas: niveles de AST y ALT (UI/l) en suero fueron determinadas mediante kit espectrofotométrico (Specific Diagnostic Kits, Biomerieux, Marcyll' Etoile, Francia). Los valores de expresaron como U/l.

#### 6.5.7 Evaluación del estrés oxidativo y capacidad antioxidante

- Niveles hepáticos de F8-isoprostanos: fueron evaluados mediante kit ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.) (Valenzuela y cols.,2017) (35). Los valores se expresaron como pg/mg hígado.
- Niveles hepáticos de TBARS: se determinaron mediante kit colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.). Los valores se expresaron como nmol/mg de proteína.

#### 6.5.8 Evaluación del perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos

- Análisis de ácidos grasos metilados: Las muestras fueron homogenizadas en frío para luego añadir cloroformo y metanol (2:1 v/v). Los lípidos saponificables que se obtuvieron del tejido fueron derivatizados a ésteres metílicos mediante la incubación a 95°C con BF<sub>3</sub> al 12% en metanol y NaOH saturado en metanol. El perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos se realizó mediante cromatografía gas – líquido, utilizando cromatógrafo de gases Agilent 7890A con detector FID. Se utilizó C15:0, C17:0 o C23:0 (Nu-Check Prep, EE. UU.) como estándares internos. Los valores se expresaron como mg de ácidos grasos/100g de tejido.

#### 6.5.9 Evaluación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta.

- Análisis de ácidos grasos de cadena corta: se realizó mediante la metodología de acidificación de heces (Zhao y cols, 2006) (36). La cuantificación del AGCC se realizó por cromatografía de gases contra un estándar interno, el ácido graso butírico (C4:0), para el cálculo de los AGCC se tuvo en cuenta las áreas del analito y del ISTD. El perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos se realizó mediante cromatografía gas – líquido, utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con detector FID. Los valores se expresaron como mM/g de muestra.

## 6.6 Plan de análisis y técnicas estadísticas

La evaluación de la distribución normal se realizó mediante el test de Shapiro Wilk.

Las variables no presentaron una distribución normal, por lo que se aplicó estadística no paramétrica donde se evaluaron las diferencias estadísticas mediante el test de Kruskal Wallis, seguido de un test de comparaciones múltiples de Dunn y test de Mann Whitney entre los grupos de HFD y CD. Los análisis de correlación se realizaron aplicando el test de Spearman. La significancia estadística se determinó con un valor  $p < 0,05$ . Los resultados se expresaron como medianas y rangos intercuartílicos.

## **7. Resultados**

### **7.1 Composición proximal de harina de semilla de chia rica en fibra y harina de avena**

La composición proximal de la harina de semilla de chia utilizada arrojó una cantidad de proteínas de  $24,69 \pm 0,22$  g, mientras que de lípidos aporta  $10,10 \pm 0,46$  g. El macronutriente que no se observó como tal fueron los hidratos de carbono, mientras que en fibra total nos aporta 50,2 g de la cual se dividen en 4,9 g de fibra soluble y 45,2 g de fibra insoluble. Finalmente, en cuanto a cenizas, se obtuvo  $6,71 \pm 0,16$  g y de humedad  $7,64 \pm 0,08$  g. Las calorías calculadas corresponden a 290,06 kcal en 100 g de harina de semilla de chia rica en fibra.

En cuanto a la harina de avena, se determinó su composición proximal obteniendo  $11,31 \pm 0,09$  g de proteínas,  $8,77 \pm 0,58$  g de lípidos y 68,53 g de carbohidratos. La fibra total obtenida corresponde a  $11,54 \pm 0,05$  g, siendo  $4,09 \pm 0,12$  g de fibra soluble y  $6,87 \pm 0,15$  g de fibra insoluble. Finalmente, la harina de avena nos arrojó  $3,67 \pm 0,03$  g de cenizas y  $10,02 \pm 0,12$  g de humedad. Las calorías calculadas corresponden a 421,37 kcal en 100 g de harina de avena (Anexo 3).

También se evaluó el perfil de ácidos grasos de ambas harinas ya mencionadas, el cual se muestra en el Anexo 4.

### **7.2 Efecto de las intervenciones en las características corporales e ingesta por grupo experimental**

Las características generales de los grupos experimentales se presentan en el Anexo 5.

En el inicio del estudio se encontraron diferencias significativas solo en el peso corporal entre el grupo suplementado con harina de avena (HFD + HAV) y el grupo suplementado con harina de chia rica en fibra (HFD + HCH). Luego de 14 semanas de intervención el peso fue significativamente mayor en los grupos alimentados con HFD, HFD + HAV, HFD + HCH respecto al grupo control (CD), mientras que la ganancia de peso total fue significativamente mayor en los grupos HFD y HFD + HAV respecto a CD, sin encontrar diferencias significativas con

el grupo de HFD + HCH. La evolución del peso corporal se presenta en el Anexo 6.

Con relación al peso del hígado, se observaron diferencias significativas en los grupos HFD y HFD + HAV respecto a CD, mientras que no se encontraron diferencias significativas del grupo de HFD + HCH con ningún otro grupo (Anexo 2, Figura 1). En cuanto al peso del tejido adiposo, los grupos HFD, HFD + HAV y HFD + HCH tuvieron un peso significativamente mayor respecto al grupo CD (Anexo 6).

No se observaron diferencias significativas en la ingesta dietaria, tampoco en la ingesta de agua (Anexo 7), mientras que la ingesta calórica presentó diferencias significativas del grupo CD con los demás grupos (Anexo 8).

### **7.3 Efecto de las intervenciones en parámetros de esteatosis hepática**

#### **7.3.1 Análisis histológico**

El análisis de placas histológicas hepáticas de los grupos experimentales se presenta en la Figura 1. La alimentación con HFD durante 14 semanas indujo un cuadro de esteatosis hepática micro y macrovesicular, presentándose una histoarquitectura alterada con importantes focos de esteatosis. El score de esteatosis en los grupos HFD + HAV y HFD + HCH presentaron una diferencia significativa con respecto al grupo HFD (Figura 2).

#### **7.3.2 Transaminasas**

Los niveles de transaminasas en suero arrojaron diferencias significativas entre el grupo CD y el grupo HFD para GOT y GPT, mientras que en los niveles de GGT no hubo diferencias significativas entre los grupos (Figura 3).

#### **7.3.3 Grasa hepática**

Entre los grupos alimentados con dieta alta en grasa (HFD, HFD + HAV, HFD + HCH) no se encontraron diferencias significativas, pero todos los grupos presentaron diferencias significativas respecto del grupo control (Figura 2).

### 7.3.4 TAG y colesterol hepático

En cuanto a los TAG hepáticos, se encontró una disminución significativa por parte del grupo HFD+HCH en comparación con el grupo HFD, mientras que el grupo HFD + HAV tuvo diferencias con el grupo CD, lo mismo ocurre con el grupo HFD.

El colesterol hepático arrojó diferencias significativas solamente entre el grupo HFD+ HCH y el grupo HFD (Figura 2).

### 7.3.5 Perfil de AG hepáticos

El análisis del perfil de los AG hepáticos totales más relevantes en los grupos experimentales se presenta en el Anexo 9. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de ácido oleico (C18:1n9) entre grupos. Se observaron diferencias significativas en todos los niveles a ácidos grasos, destacando las diferencias significativas entre el grupo HFD y HFD + HCH en los niveles de ácidos grasos totales, ácidos grasos n6, ácido araquidónico (C20:4n6) y DHA (C22:6n3). En cuanto a la razón n6/n3, el grupo HFD + HAV presentó diferencias significativas con los grupos CD y HFD + HCH.

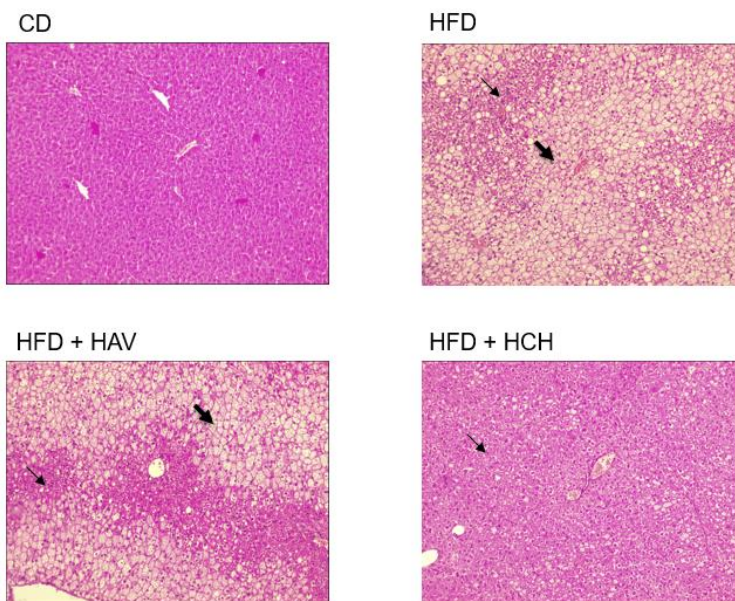


Figura 1. Histología hepática de ratones alimentados con dieta control, alta en grasa, alta en grasa con suplementación de harina de avena y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra; secciones representativas de tejido hepático; n= 6-7. Los cortes fueron

fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina (10X de aumento). Flechas gruesas (→) indican esteatosis macrovesicular y flechas delgadas (→) indican esteatosis microvesicular.

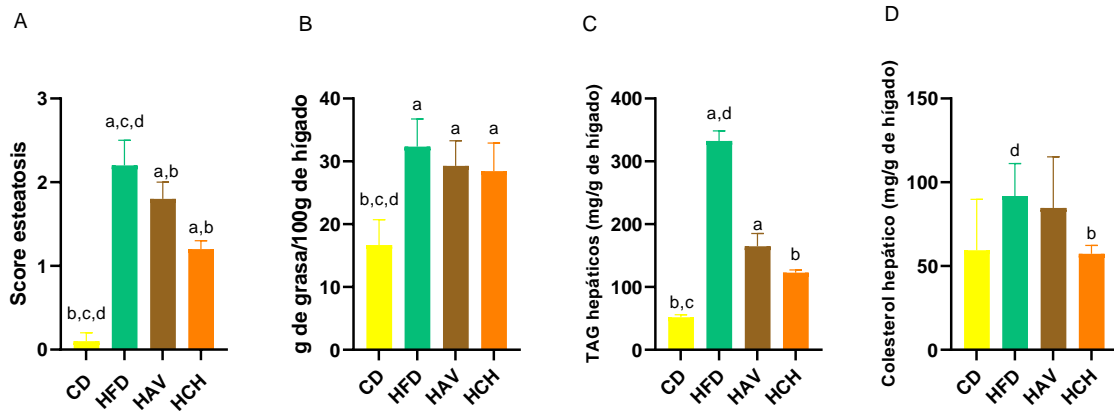


Figura 2. Score de esteatosis (A). Grasa Hepática total (g/100g hígado) (B). TAG hepáticos (mg/g de hígado) (C). Colesterol hepático (mg/g de hígado) (D). n= 6-7. Dieta control, CD (a), alta en grasa, HFD (b), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (c) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (d). Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

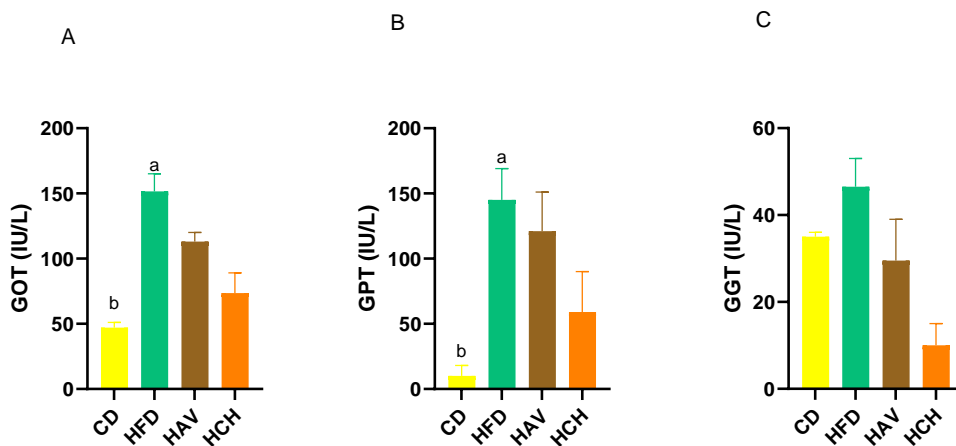


Figura 3. Niveles de transaminasas en suero. Aspartato aminotransferasa (GOT) (A). Alanina aminotransferasa (GPT) (B). Gamma-glutamyl transferasa (GGT) (C). n= 6-7. Dieta control, CD (a), alta en grasa, HFD (b), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (c) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (d). Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .



#### 7.4 Efecto de las intervenciones sobre alteraciones en el perfil lipídico y parámetros metabólicos.

Los resultados de los parámetros metabólicos evaluados se presentan en la tabla 2. Luego de 14 semanas de intervención se observó diferencias significativas en la glicemia e insulinemia del grupo CD con los grupos HFD y HFD + HCH. En cuanto al HOMA-IR se observan diferencias significativas entre los grupos HFD, HFD + HCH con el grupo CD, además de diferencias significativas entre HFD y HFD + HAV.

Los triglicéridos muestran diferencias significativas de todos los grupos (CD, HFD + HAV, HFD + HCH) con el grupo HFD, mientras que en colesterol total solo existen diferencias significativas entre el grupo CD y los grupos HFD, HFD + HAV. En cuanto al colesterol LDL y HDL sólo presentan diferencias significativas entre el grupo CD y el grupo HFD.

Tabla 2. Parámetros metabólicos por grupo experimental

Parámetros /Grupos	CD	HFD	HFD + HAV	HFD + HCH	Valor p
Glicemia (mg/dL)	95,46 <sup>b,d</sup> (90,64 – 99,34)	147,6 <sup>a</sup> (145,44 - 158,42)	111,55 (99,23 - 123,51)	123,50 <sup>a</sup> (117,49 - 128,75)	0,00137
Insulinemia (μU/mL)	4,74 <sup>b,d</sup> (4,74 – 9,48)	33,89 <sup>a</sup> (31,99 - 117,31)	31,99 (21,33 - 31,99)	33,59 <sup>a</sup> (31,99 - 34,10)	0,00031
HOMA-IR	1,12 <sup>b,d</sup> ( 1,06 – 2,29)	12,25 <sup>a,c</sup> (5,69 - 21,63)	8,52 <sup>b</sup> (5,44 - 9,29)	10,22 <sup>a</sup> (9,86 - 10,61)	0,0001
TAG (mg/dL)	67,56 <sup>b</sup> ( 56,88 – 75,99)	157,50 <sup>a,c,d</sup> (147,00 - 163,75)	66,67 <sup>b</sup> (59,64 - 79,54)	62,75 <sup>b</sup> (55,97 - 81,10)	0,0153
Colesterol total (mg/dL)	141,00 <sup>b,c</sup> ( 119,1 – 158,4)	287,70 <sup>a</sup> (260,7 - 326,0)	259,9 <sup>a</sup> (252,3 - 277,0)	229,20 (219,0 - 237,4)	0,0003
Colesterol LDL (mg/dL)	49,6 <sup>b</sup> (49,4 – 49,8)	114,8 <sup>a</sup> (102,6 – 127)	110,8 (92,8 – 119,2)	78,6 (78,2 – 90,8)	0,0237
Colesterol HDL (mg/dL)	54 <sup>b</sup> (52 – 59)	98 <sup>a</sup> (94 – 114)	66 (64 – 84)	91,5 (88 – 95)	0,0188

n= 6-7. Dieta control, CD (A), alta en grasa, HFD (B), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (C) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (D). Datos presentados como mediana (rango intercuartílico). Diferencias significativas establecidas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

## 7.5 Efecto de la ingesta de harina de semilla de chia en el estrés oxidativo e inflamación en ratones alimentados con HFD.

Los marcadores de estrés oxidativo se muestran en la figura 4.

### 7.5.1 Proteínas oxidadas hepáticas

Los resultados de la concentración de carbonilos proteicos arrojaron una disminución significativa en los grupos HFD + HAV y HFD+HCH en comparación con el grupo alimentado on HFD.

### 7.5.2 Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs)

En la concentración de TBARs no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

### 7.5.3 8-isoprostanos hepáticos

En cuanto a F8-isoprostanos se encontró un aumento significativo de estos en los grupos alimentados con HFD y HFD+HAV en comparación con el grupo CD.

### 7.5.4 Parámetros de inflamación

Los parámetros inflamatorios se presentan en la figura 5.

IL-6 mostró diferencias significativas entre todos los grupos con el grupo HFD, observando niveles superiores en este último.

Por otro lado, IL-1 $\beta$  arrojó diferencias significativas entre el grupo HFD y los grupos CD y HFD+HAV, mostrando un cuadro similar al de IL-6.

En cuanto a TNF- $\alpha$  no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

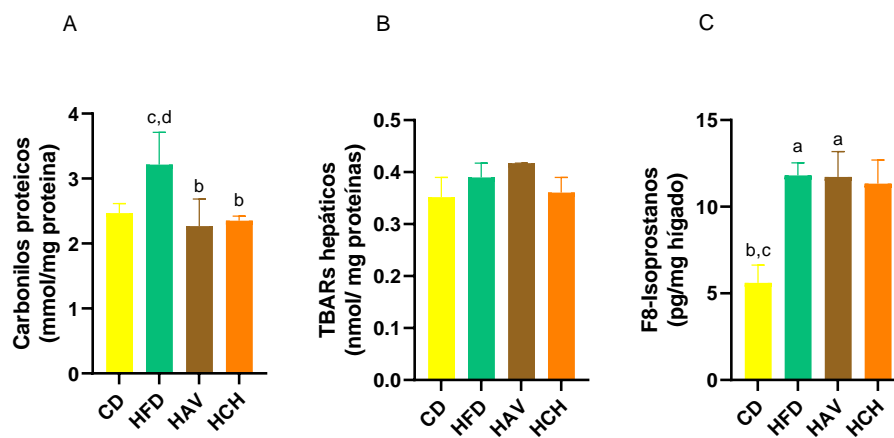


Figura 4. Parámetros de estrés oxidativo. Carbonilos proteicos (A). TBARs (B). F8-Isoprostanos (C). n= 6-7. Dieta control, CD (a), alta en grasa, HFD (b), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (c) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (d). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

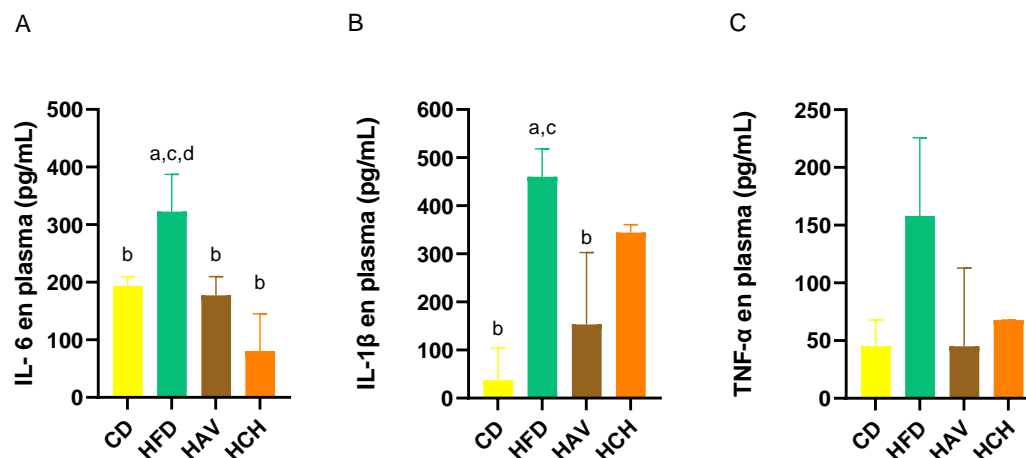


Figura 5. Parámetros inflamatorios. TNF-Alpha en plasma (pg/mL) (A). IL-1beta en plasma (pg/mL) (B). IL-6 en plasma (pg/mL) (C). n= 6-7. Dieta control, CD (a), alta en grasa, HFD (b), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (c) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (d). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

### 7.6 Efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre el perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos.

El análisis del perfil de AG más relevante encontrado en el tejido adiposo epididimal se observa en el anexo 10.

Se observaron diferencias significativas en el nivel de ácido esteárico (C18:0) entre el grupo control y el grupo HFD y entre el grupo control y el grupo HFD + HAV. También existen diferencias significativas en el nivel de ácido alfa linoléico (C18:3n3, ALA) entre el grupo HFD y el grupo HFD + HCH, presentando este último una mayor cantidad, ocurriendo lo mismo con el total de ácidos grasos poliinsaturados n3. Finalmente, en la razón n6/n3 existen

diferencias significativas entre los grupos control y HFD + HAV, entre los grupos HFD y HFD + HCH y entre los grupos HFD + HAV y HFD + HCH. En todos los otros ácidos grasos cuantificados no existieron diferencias significativas entre grupos.

Por otro lado, el análisis del perfil de AG en eritrocitos (Anexo 11 ) no arrojó diferencias significativas en la concentración en todos los grupos.

### **7.7 Efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre la concentración de ácidos grasos de cadena corta en heces.**

La concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces se muestra en el Anexo 12.

En los niveles de AGCC totales previo a la suplementación no se encontraron diferencias significativas entre grupos, ocurriendo lo mismo con el ácido acético. En cuanto al ácido propiónico, se observaron diferencias significativas entre el grupo HFD + HAV con los grupos HFD y HFD + HCH, mientras que el ácido butírico presentó diferencias significativas del grupo HFD contra todos los demás grupos en la semana 10.

En la semana 14, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en los niveles de AGCC totales ni en los niveles de ácido acético.

Se observaron diferencias significativas en los niveles de ácido propiónico del grupo HFD + HAV con los grupos CD y HFD + HCH, mientras que en los niveles de ácido butírico se observaron diferencias significativas entre el grupo HFD + HAV y todos los demás grupos (CD, HFD, HFD + HCH).

Finalmente, existe un aumento significativo entre la semana 10 y la 14 en todos los AGCC encontrados en el grupo HAV, mientras que el grupo HCH aumentó significativamente sólo en los AGCC totales y disminuyó significativamente en el ácido propiónico. Ocurriendo lo mismo con este último en los grupos CD y HFD.

## 8. Discusión

En la presente investigación se planteó que la esteatosis hepática y los efectos asociados como inflamación, alteraciones metabólicas, estrés oxidativo, entre otros, producidos por una dieta alta en grasas en ratones podría ser revertida por la suplementación de esta dieta con harina de semilla de chia rica en fibra, asociado a la relación de la fibra y su protección frente a la acumulación de lípidos hepáticos, resistencia a la insulina y alteración del perfil lipídico (28), además de la alta cantidad de fibra presente en la chia (24).

Las dietas utilizadas en este estudio corresponden a dietas certificadas con un aporte de 10% de grasa en la dieta control y un 60% de aporte de grasa en la dieta alta en grasas. Esta última, se utilizó como modelo para inducir esteatosis hepática, debido al alto aporte de AGS. Al respecto, una excesiva ingesta de AGS ha sido vinculada a un aumento en los depósitos de ácidos grasos y lipogénesis en el hígado, generando lipotoxicidad y activación de cascadas inflamatorias (17).

### **Determinación de la composición proximal de harina de semilla de chia rica en fibra y harina de avena**

Vázquez-Ovando y cols (2010), determinaron la composición química de una fracción rica en fibra de harina de semilla de chia obteniendo una cantidad de fibra de 56,46 g/100 g donde un 95% corresponde a fibra dietética insoluble (37). En esta investigación se obtuvo una cantidad de fibra total de 50,2 g/100g donde la fibra insoluble corresponde al 90%, siendo un poco inferior a lo encontrado por los autores mencionados. Esta diferencia se podría atribuir al tamaño de la partícula en el tamizado, ya que para este estudio se utilizó un tamiz de 212  $\mu\text{m}$  mientras que en el estudio de Vázquez-Ovando y cols utilizaron uno de 140 $\mu\text{m}$ . También existe una diferencia entre el contenido de grasa de la harina, ya que los autores mencionados determinaron una cantidad de 4,5 g/kg versus los 10,10g/100g de este estudio. Esta diferencia puede ser asociada al tipo de extracción de grasa utilizado; prensado en frío en nuestro estudio versus un sistema Friedrich (Travilab, Yucatán, México) empleando hexano como solvente en el de Vázquez-Ovando y cols.

En cuanto al perfil de ácidos grasos la harina de semilla de chia, a pesar del proceso de desgrasado, presenta mayoritariamente AGPI n3 predominando el ALA, al igual que lo encontrado en otros estudios con respecto a esta semilla (23,24).

Con respecto a la harina de avena, su composición química coincide con lo declarado por el etiquetado del producto comercializado, con diferencias solamente en la cantidad de fibra dietética, ya que el etiquetado menciona cantidades iguales de fibra soluble e insoluble, mientras que en este estudio la fibra dietética soluble fue de 4,09 g/100g y la insoluble fue de 6,87 g/100g.

### **Efecto de las intervenciones en las características corporales e ingesta dietaria**

En cuanto a las características corporales, se observó que el peso corporal en los animales alimentados con la suplementación de HCH no fue diferente al peso corporal final de los ratones alimentados con HFD, ocasionando solo una menor ganancia en los alimentados con CD, lo mismo ocurre con el peso del tejido adiposo. Mientras que la ganancia de peso total no tuvo diferencias con la suplementación con HCH con ninguno de los grupos. Esto se relaciona a los hallazgos encontrados por De Miranda y cols (2019), donde la harina de chia no protegió a los ratones alimentados con HFD frente al aumento de peso corporal y adiposidad (38). Estos resultados son similares a lo señalado por Nieman y cols (2009), donde la chia entera no promovió la reducción de peso corporal en humanos (39). Estos hallazgos, a pesar de que coinciden con la literatura, no se relacionan con la fibra dietética de la semilla de chia, ya que por su gran cantidad de fibra insoluble y alta capacidad de retención de agua se esperaba que regulara la homeostasis energética e indujera saciedad en cada tiempo de comida por la producción del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), lo que se puede atribuir a la porción de suplementación entregada y posiblemente a la matriz (28,39).

En cuanto a la suplementación con HAV, se observó que el peso corporal final, peso de hígado, peso de tejido adiposo y ganancia de peso total no tuvo diferencias significativas con el grupo alimentado con HFD. Estos hallazgos no se relacionan con lo encontrado en otras investigaciones en las que la suplementación con avena logró reducir la ganancia de peso mediante la producción de AGCC que promueven la secreción intestinal de GLP-1 y mejoran la secreción de insulina y leptina (30, 40).

### **Efecto de las intervenciones en la esteatosis hepática**

En el actual estudio, los animales que consumieron HFD por 14 semanas presentaron un cuadro de esteatosis hepática similar a lo mencionado por Soni, y cols. (2015), encontrándose un cuadro de esteatosis hepática micro y macrovesicular (20).

A pesar de que la suplementación con HCH no logró una disminución significativa en la cantidad de grasa en el hígado, fue la que logró una mayor reducción de la esteatosis hepática al disminuir el score de esteatosis, los TAG hepáticos y el colesterol, mientras que con HAV no disminuyó ninguno de los parámetros. Esto no coincide con lo reportado por Schweinlin y cols. (2018), donde relacionan la fibra dietética con la reducción del contenido de lípidos intrahepáticos debido a la disminución de peso corporal y de grasa hepática producido(30).

En cuanto a las transaminasas, que son un marcador fundamental para determinar esteatosis hepática, en este estudio ambas fuentes de fibra mostraron una tendencia a la disminución de GOT, GPT y GGT pero sin diferencias significativas con los demás grupos. Este comportamiento puede deberse al tipo de intervención, tiempo y cantidad, entre otros. Estos hallazgos son similares a lo encontrado por Maciejewska y cols. (2022), donde disminuyeron las transaminasas frente a la administración de fibra en pacientes con EHGNA (41).

### **Efecto de las intervenciones en el perfil de ácidos grasos hepáticos**

Los resultados de la presente investigación indican que la exposición a HFD indujo un aumento significativo de AA, al igual que en el grupo HFD+HAV. Lo mismo ocurre con respecto a la cantidad de ácidos grasos totales encontrados en ambos grupos.

Con respecto al grupo HFD+HCH, las cantidades de LA, ALA, AA, DHA son significativamente inferiores a las del grupo HFD, lo que puede explicarse debido a que la suplementación correspondió a una harina desgrasada y demuestra que el efecto producido en los parámetros evaluados no se relaciona a la cantidad de AGPI n3.

Los hallazgos encontrados en este estudio no se relacionan con el conocimiento actual ya que es conocido que la composición lipídica de la dieta modifica los ácidos grasos encontrados en los diferentes tejidos del organismo, pero si se relaciona a lo encontrado por Maciejewska y cols. (2022), donde el consumo de fibra ayudó a reducir ácidos grasos saturados como el palmítico y esteárico (41).

### **Efecto de las intervenciones en el perfil lipídico**

La suplementación con HCH disminuyó ( $p < 0,05$ ) los triglicéridos plasmáticos, pero a pesar de lograr una disminución en el colesterol total, LDL y HDL, no alcanzó la significancia. Esto puede deberse a que en su composición existe un mayor aporte de fibra insoluble que soluble, atribuyéndose la característica de hipocolesterémica a la segunda mencionada. Además, la reducción del colesterol por parte de la fibra insoluble se relaciona con la saciedad producida por esta, pero en este estudio no existieron diferencias significativas entre el consumo alimentario de los grupos (28). Lo mismo ocurrió con el perfil lipídico obtenido por la suplementación de HAV, siendo niveles más elevados de TG, colesterol total, LDL y niveles más bajos de HDL en comparación con la HCH, sin diferencias significativas entre ambas.

### **Efecto de las intervenciones en parámetros metabólicos**

La ingesta de HFD promovió la resistencia a la insulina y la adición de HCH no indujo cambios significativos. Al igual que lo encontrado por de Miranda y cols. (2019) la chia no logró la protección frente a las modificaciones en el metabolismo de la glucosa por parte de la dieta HFD (38). Lo mismo plantea Nieman y cols. (2009) (39) donde la suplementación con chia no produjo cambios significativos con respecto a la glicemia en adultos. Lo contrario ocurre en el estudio de Medina-Urrutia y cols. (2020) donde los parámetros metabólicos mejoran con el uso de harina de chia como suplemento en la dieta (42). Debido a esto, los resultados sugieren que la cantidad, tipo de administración (semilla, harina o aceite) y tiempo de intervención influyen en los efectos que pudiese tener la chia.

Por otro lado, la suplementación con HAV produjo una disminución en los niveles de glicemia plasmática y disminuyó significativamente el índice HOMA-IR, por lo que logró una mejora en el metabolismo de la glucosa debido a la proporción de fibra encontrada en ella. Lo mismo se encontró en el estudio de Schweinlin y cols. (2018), donde el índice HOMA-IR disminuyó con la fórmula enriquecida con fibra de avena (30).

### **Efecto de las intervenciones en el estrés oxidativo**

Las proteínas carboniladas, como marcadores de estrés oxidativo producto de la disfunción mitocondrial generada por la EHGNA, afectó la homeostasis de grasas en el hígado llevando



a una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (43). En esta investigación las proteínas oxidadas arrojaron que con ambas suplementaciones, HAV y HCH, se logra una disminución significativa en el daño oxidativo producido por ROS. En cuanto a los TBARS, estos muestran el daño celular debido a la lipoperoxidación de la membrana, no existiendo diferencias significativas entre los grupos de este estudio. Adicionalmente, los niveles de F8-isoprostanos están dados por la lipoperoxidación no mediada por enzimas de DHA, EPA y AA producto del estrés oxidativo (43). En este caso, sólo se encontró una producción disminuida en el grupo control, mientras que el grupo HFD+HCH no se observaron diferencias con ningún grupo, lo que puede deberse a una menor concentración del AA. En este sentido, estudios en modelos animales muestran que al administrar una dieta que incluye chia puede restaurar la actividad de enzimas como la catalasa y superóxido dimutasa, disminuyendo marcadores de oxidación (42,44).

### **Efecto de las intervenciones en la inflamación**

El estrés oxidativo inducido por la enfermedad puede causar expresión de citoquinas proinflamatorias. El aumento en los depósitos de grasa de los ratones alimentados con HFD indujo un estado proinflamatorio característico de la obesidad, aumentando la producción de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (38). La suplementación con HCH disminuyó los niveles de citoquinas proinflamatorias pero sólo fue significativamente menor en la IL-6, lo que difiere a lo encontrado por Nieman y cols. (2009), quienes no encontraron diferencias entre el grupo placebo y el suplementado con chia con respecto a las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 (39). Los TBARS son el producto de la peroxidación lipídica que pueden actuar como segundos mensajeros para la activación de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, asociando específicamente los niveles de TBARS con los niveles de TNF- $\alpha$ , por lo que la no significancia en ambos puede ser resultado de esta asociación (45).

Existe una asociación inversa entre el consumo de chia y la producción de citoquinas proinflamatorias debido, en su mayoría, a la presencia de AGPI, específicamente el ALA a través de la inhibición de la cascada de señalización inducida por NF- $\kappa$ B y el efecto antiinflamatorio mediado por la activación de PPAR $\gamma$  (44). Además, la presencia de compuestos fenólicos presentes en la chia como daidzina, genisteína, glicitina, quercetina y kaempferol la hacen un alimento con una alta actividad antioxidante (25).

### **Efecto de las intervenciones sobre el perfil de ácidos grasos en tejido adiposo y eritrocitos.**

El perfil de ácidos grasos del tejido adiposo sólo arrojó un aumento significativo de ácido esteárico y de la razón n6/n3 en ratones suplementados con HAV, lo cual no coincide con las concentraciones de ácidos grasos de la harina ya que tiene en mayor cantidad ácido oleico.

Por otro lado, la suplementación con HCH logró un aumento significativo de los AGPI n3, específicamente de ALA, debido a que dentro de su perfil es el ácido graso en mayor concentración. Estos hallazgos coinciden con lo encontrado por Ferreira y cols. (2018), donde hubo incorporación de AGPI n3 en la membrana de los adipocitos además de mejorar la relación de n6/n3 después de la administración de chia (44).

En cuanto al perfil de ácidos grasos en eritrocitos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, esto puede deberse a que este es un marcador de la ingesta dietaria de ácidos grasos a largo plazo.

La finalidad de evaluar estos dos perfiles de ácidos grasos fue dilucidar si la incorporación de ácidos grasos a la membrana celular era similar a lo encontrado en el hígado debido a la capacidad que tienen los ácidos grasos de modular en el metabolismo celular (20).

### **Efecto de la ingesta de HFD con harina de semilla de chia sobre la concentración de AGCC en heces.**

Dentro de los efectos que puede desencadenar una dieta alta en grasas, se encuentra la liberación de citoquinas proinflamatorias que pueden causar daño en la microbiota intestinal provocando disfunción de la barrera epitelial (46). Este efecto puede ser reparado por la ingesta de fibra dietética la cual posterior al consumo va a ser fermentada por microorganismos anaerobios produciendo AGCC los cuales ayudan a proteger la barrera intestinal, se utilizan como energía para el colonocito y colaboran en el metabolismo de nutrientes como los lípidos e hidratos de carbono (41).

Los resultados de esta investigación sobre el perfil de AGCC mostraron un aumento significativo de la producción de estos por parte de ambas fuentes de fibra, HCH y HAV, lo

cual coincide con lo encontrado por Mishima y cols. (2022), donde el consumo de chia en una dieta alta en grasas aumentó la producción de estos ácidos grasos, sólo diferenciándose con lo encontrado en este estudio con el ácido propiónico, el cual disminuyó (46). Lo mismo ocurre con lo encontrado por Kundi y cols. (2021), donde la fibra dietaria de avena aumentó la producción de AGCC mejorando la función de barrera intestinal (40).

## 9. Conclusiones

En el presente estudio, se buscó aprovechar un producto de descarte de la industria productora de aceite de chia, la fracción rica en fibra, para evaluar efectos en la reversión de esteatosis hepática y otras alteraciones asociadas gracias a los mecanismos de esta para mejorar la permeabilidad intestinal. Al respecto, la alimentación con HFD durante 10 semanas indujo esteatosis hepática, RI, estrés oxidativo e inflamación. Por otro lado, la suplementación con HCH por 4 semanas, mejoró los marcadores hepáticos de esteatosis, logrando normalizar valores en relación al grupo alimentado con CD, que se ve reflejado en las histologías hepáticas, niveles de TAG y colesterol hepáticos. Además, la HCH mejoró discretamente el perfil lipídico, parámetros de estrés oxidativo, como las proteínas carboniladas e inflamación, a través de una disminución de IL-6 y TNF- $\alpha$ , frente a los animales que siguieron alimentándose con HFD. Por lo tanto, el conjunto de estos resultados indican que, la ingesta de HCH generó una protección moderada frente al daño ocasionado por una HFD, debido a lo que podría ser considerada como un potencial terapéutico para el manejo de la esteatosis hepática en ratón. Se sugiere evaluar los efectos asociados a HCH en la prevención de EHGNA, para posteriormente ser evaluada en ensayos clínicos con humanos.

## 10. Referencias

1. Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018; 24, 908–922.
2. Papatheodoridi M, Cholongitas E. Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts. *Curr Pharm Des.* 2018;24(38):4574-4586.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73-84.
4. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology.* 2012;55(6):2005-23.
5. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, Wai-Sun Wong V, Yilmaz Y, George J, Fan J, Vos MB. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology.* 2019;69(6):2672-2682.
6. Fan JG, Kim SU, Wong VW. New trends on obesity and NAFLD in Asia. *J Hepatol.* 2017;67(4):862-873.
7. Saavedra-Chacón María Fernanda, Pérez Santiago, Guevara Luis Gonzalo. Enfermedad del hígado graso asociada con la disfunción metabólica. Una nueva propuesta para una dolencia en auge. *Iatreia.* 2021; 34( 3 ): 241-252.
8. Huang J, Ou W, Wang M, Singh M, Liu Y, Liu S, Wu Y, Zhu Y, Kumar R, Lin S. MAFLD Criteria Guide the Subtyping of Patients with Fatty Liver Disease. *Risk Manag Healthc Policy.* 2021;14:491-501.
9. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1038-48.
10. Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model”. *World J Gastroenterol.* 2018;24(27):2974-2983.

11. Yki-Järvinen, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2014; 2(11), 901–910.
12. Harrari G, Buch A, Nitzan Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol*. 2012;56(5):1145-1151.
13. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59(3):1174-97.
14. Samuel V.T., Liu Z.X., Qu X., Elder B.D., Bilz S., Befroy D. et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004; 30: 32345-32353
15. Bugianesi, E.; Moscatiello, S.; Ciaravella, M.F.; Marchesini, G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Pharm. Des.* 2010, 16, 1941–1951.
16. Hernandez-Rodas M, Valenzuela R, Videla L. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2015;16(10):25168–98.
17. Byrne CD. Dorothy Hodgkin Lecture 2012 Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: A new problem in diabetes management. *Diabet Med* 2012;29(9):1098–107.
18. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang DH, Tolan DR, Sanchez-Lozada LG, Rosen HR, Lanasa MA, Diehl AM, Johnson RJ. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018;68(5):1063-1075.
19. Jump, D.B.; Lytle, K.A.; Depner, C.M.; Tripathy, S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacol. Ther.* 2018, 181, 108–125.
20. Soni NK, Nookaew I, Sandberg AS, Gabrielsson BG. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis.* 2015;14(74):1-13.
21. Monroy-Torres R, Mancilla-Escobar ML, Gallaga-Solórzano JC, et al. Protein

- digestibility of chia seed *Salvia Hispanica* L. *Rev Salud Publica Nutr.* 2008;9(1):1-9.
22. Valdivia-López MÁ, Tecante A. Chia (*Salvia hispanica*): A review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *Adv Food Nutr Res.* 2015;75:53-75.
  23. Sandoval-Oliveros MR, Paredes-López O. Isolation and Characterization of Proteins from Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.). *J Agric Food Chem.* 2013; 61(1), 193–201.
  24. Jiménez P, Masson L, Quitral V. Chemical composition of chia seed, flaxseed and rosehip and its contribution in fatty acids omega-3. *Rev. chil. Nutr.* 2013; 40(2): 155-160.
  25. Da Silva BP, Anunciação PC, Matyelka JCDS, Della Lucia CM, Martino HSD, Pinheiro-Sant’Ana HM. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chem.* 2017; 221: 1709–1716.
  26. Samarasinghe, K., Dharmadasa, C., Waisundara, V. Agrawaly R., Dorcas O., Aderonke G., y cols. *Dietary Fibers*. 1<sup>st</sup> ed. London: IntechOpen; 2022, 94p.
  27. K. Makki, et al. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe* 2018; 23, pp. 705-715.
  28. Chen J-P, Chen G-C, Wang X-P, Qin L, Bai Y. Dietary Fiber and Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis and Review of Related Mechanisms. *Nutrients.* 2018; 10(1):24.
  29. Krawczyk M, Maciejewska D, Ryterska K, Czerwińska-Rogowska M, Jamioł-Milc D, Skonieczna-Żydecka K, Milkiewicz P, Raszeja-Wyszomirska J, Stachowska E. Gut Permeability Might be Improved by Dietary Fiber in Individuals with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Undergoing Weight Reduction. *Nutrients.* 2018; 10(11):1793.
  30. Schweinlin, A.; Ulbrich, S.; Stauß, S.; Teutsch, M.; Walle, H.; Basrai, M.; Bischoff, S.C. Vergleich einer kommerziell erhältlichen, Formula-basierten, mit Haferballaststoffen angereicherten Ernährungstherapie mit einer isokalorischen diätetischen Therapie ohne Formula zur Therapie der nicht-alkoholischen

- Fettlebererkrankung (NAFLD) eine randomisierte, kontrollierte Interventionsstudie. *Z. Gastroenterol.* 2018; 56:1247–1256.
31. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28:412–9.
  32. Bligh, E. G. y Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37: 911–7.
  33. Echeverría F, Valenzuela R, Bustamante A, Álvarez D, Ortiz M, Soto-Alarcon SA, Muñoz P, Corbari A, Videla LA. Attenuation of High-Fat Diet-Induced Rat Liver Oxidative Stress and Steatosis by Combined Hydroxytyrosol- (HT-) Eicosapentaenoic Acid Supplementation Mainly Relies on HT. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:5109503.
  34. Rahman I, Kode A, Biswas S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159–65.
  35. Valenzuela, R., Echeverria, F., Ortiz, M., Rincón-Cervera, M. Á., Espinosa, A., Hernandez-Rodas, M., y cols. “Hydroxytyrosol prevents reduction in liver activity of  $\Delta$ -5 and  $\Delta$ -6 desaturases, oxidative stress, and depletion in long chain polyunsaturated fatty acid content in different tissues of high-fat diet fed mice.” *Lipids in health and disease.* 2017;16(1):64.
  36. Zhao G, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20(8):674-82.
  37. Vázquez-Ovando, J. A.; Rosado-Rubio, J. G.; Chel-Guerrero, L. A.; Betancur-Ancona, D. A. (2010). Dry processing of chia flour: chemical characterization of fiber and protein. *CyTA - Journal of Food*, 8(2), 117–127.
  38. de Miranda DA, Pinheiro da Silva F, Carnier M, Mennitti LV, Figuerêdo RG, Hachul ACL, Boldarine VT, Neto NIP, Seelaender M, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM, Carnier J, Oyama LM. Chia flour (*Salvia hispanica* L.) did not

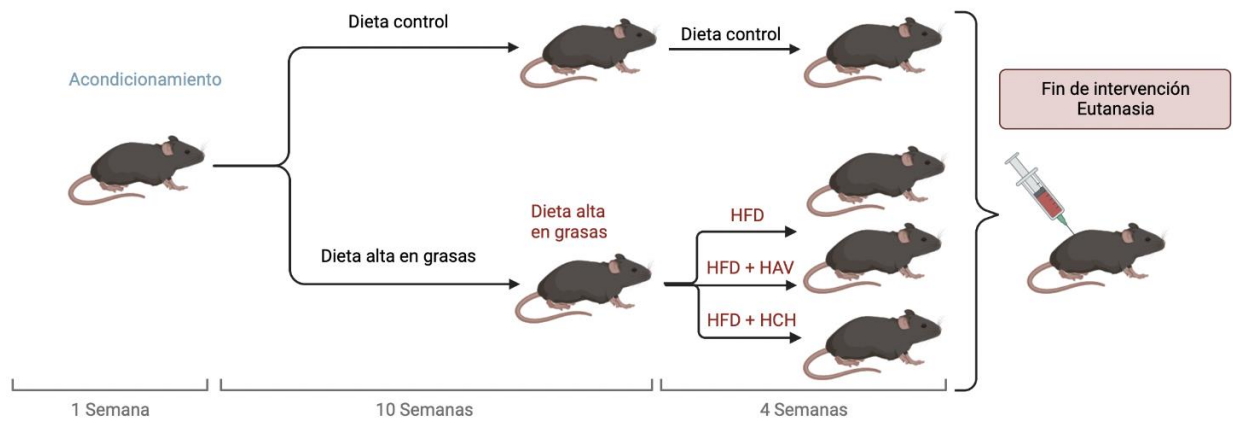


- improve the deleterious aspects of hyperlipidic diet ingestion on glucose metabolism, but worsened glycaemia in mice. *Food Res Int.* 2019; 121:641-647.
39. Nieman DC, Cayea EJ, Austin MD, Henson DA, McAnulty SR, Jin F. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutr Res.* 2009 ;29(6):414-8.
  40. Kundi ZM, Lee JC, Pihlajamäki J, Chan CB, Leung KS, So SSY, Nordlund E, Kolehmainen M, El-Nezami H. Dietary Fiber from Oat and Rye Brans Ameliorate Western Diet-Induced Body Weight Gain and Hepatic Inflammation by the Modulation of Short-Chain Fatty Acids, Bile Acids, and Tryptophan Metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 2021 Jan;65(1):e1900580.
  41. Maciejewska-Markiewicz D, Drozd A, Palma J, Ryterska K, Hawryłkiewicz V, Załęska P, Wunsh E, Kozłowska-Petriczko K, Stachowska E. Fatty Acids and Eicosanoids Change during High-Fiber Diet in NAFLD Patients-Randomized Control Trials (RCT). *Nutrients.* 2022;14(20):4310.
  42. Medina-Urrutia A, Lopez-Uribe AR, El Hafidi M, González-Salazar MDC, Posadas-Sánchez R, Jorge-Galarza E, Del Valle-Mondragón L, Juárez-Rojas JG. Chia (*Salvia hispanica*)-supplemented diet ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and its metabolic abnormalities in humans. *Lipids Health Dis.* 2020; 19(1):96.
  43. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(39):14205-18.
  44. Ferreira MR, Alvarez SM, Illesca P, Giménez MS, Lombardo YB. Dietary Salba (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Eur J Nutr.* 2018 ;57(1):83-94.
  45. Palladini G, Di Pasqua LG, Berardo C, Siciliano V, Richelmi P, Perlini S, Ferrigno A, Vairetti M. Animal Models of Steatosis (NAFLD) and Steatohepatitis (NASH) Exhibit Hepatic Lobe-Specific Gelatinases Activity and Oxidative Stress. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2019, 3;2019:5413461.

46. Mishima MDV, Da Silva BP, Gomes MJC, Toledo RCL, Mantovani HC, José VPBS, Costa NMB, Tako E, Martino HSD. Effect of Chia (*Salvia hispanica* L.) Associated with High-Fat Diet on the Intestinal Health of *Wistar* Rats. *Nutrients*. 2022 ;14(22):4924.

## 11. Anexos

### Anexo 1. Protocolo de intervención



*HAV: harina de avena HCH: harina de chia rica en fibra*

## Anexo 2. Información nutricional y composición de las dietas experimentales

	Dieta control (CD)		Dieta alta en grasa (HFD)	
	g	kcal (%)	g	kcal (%)
Macronutrientes				
Proteínas	19,2	20	26,2	20
Carbohidratos	67,3	70	26,3	20
Lípidos	4,3	10	34,9	60
Total		100		100
Kcal/g		3,85		5,24
Ingrediente	g	kcal	g	kcal
Caseína	200	800	200	800
L-Cisteína	3	12	3	12
Maicena	315	1260	0	0
Maltodextrina	35	140	125	500
Sacarosa	350	1400	68,8	275,3
Celulosa	50	0	50	0
Aceite de soja	25	225	25	225
Manteca de cerdo	20	180	245	2205
Mezcla de minerales	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato de Calcio	5,5	0	5,5	0
Citrato de Potasio	16,5	0	16,5	0
Mezcla de Vitaminas	10	40	10	40
Bitartrato de Colina	2	0	2	0
Tartracina	0,05	0	0,05	0
Total	1055,05	4057	773,85	4057

### Anexo 3. Composición proximal de harina de chia rica en fibra y harina de avena

Composición (g/100g)	Harina de semilla de chia rica en fibra	Harina de avena
Proteínas *	24,69 ± 0,22	11,31 ± 0,09
Lípidos	10,10 ± 0,46	8,77 ± 0,58
Hidratos de carbono	0	68,53
Fibra dietética total	50,2	11,54 ± 0,05
Fibra soluble	4,9	4,09 ± 0,12
Fibra insoluble	45,2	6,87 ± 0,15
Cenizas	6,71 ± 0,16	3,67 ± 0,03
Humedad	7,64 ± 0,08	10,02 ± 0,12
Energía	290,06	421,37

\*Factor de 6,25. Datos presentados como media ± desviación estándar.

#### Anexo 4. Perfil de ácidos grasos de harina de semilla de chia rica en fibra y harina de avena

Ácidos grasos (g/100g de harina)	Harina de semilla de chia rica en fibra	Harina de avena
C16:0	0,80 ± 0,00	1,09 ± 0,01
C18:0	0,39 ± 0,00	0,18 ± 0,00
C18:1n9	0,69 ± 0,02	3,06 ± 0,03
C18:2n6 (LA)	1,80 ± 0,00	2,83 ± 0,02
C18:3n3 (ALA)	5,69 ± 0,04	0,09 ± 0,00
AGS totales	1,20 ± 0,00	1,43 ± 0,21
AGM totales	0,69 ± 0,02	3,06 ± 0,03
AGP totales	7,53 ± 0,03	2,98 ± 0,01
AGP n3	5,72 ± 0,04	0,09 ± 0,00
AGP n6	1,80 ± 0,00	2,83 ± 0,02
AG totales	9,42 ± 0,02	7,47 ± 0,25

Datos presentados como media ± desviación estándar.

## Anexo 5. Características generales de los animales

Parámetros / Grupos	CD (A)	HFD (B)	HFD+HAV (C)	HFD+HCH (D)	Valor p
Peso tejido adiposo (g)	0,57 <sup>b,c,d</sup> (0,53 - 0,64)	2,06 <sup>a</sup> (1,82 - 2,17)	2,11 <sup>a</sup> (2,01 - 2,37)	1,99 <sup>a</sup> (1,93 - 2,18)	0,00135
Peso hígado (g)	0,97 <sup>b,c</sup> (0,92 - 1,08)	2,54 <sup>a</sup> (2,32 - 3,21)	2,59 <sup>a</sup> (2,37 - 2,80)	2,11 (1,89 - 2,30)	0,00039
Peso corporal final (g)	28,2 <sup>b,c,d</sup> (26,7 - 28,9)	45,85 <sup>a</sup> (44,43 - 49,63)	46,5 <sup>a</sup> (45,3 - 47,8)	45,3 <sup>a</sup> (44,1 - 48,7)	0,00126
Peso corporal inicial (g)	19,6 (18,6 - 21,2)	21,25 (19,05 - 22,13)	19,6 <sup>d</sup> (18,7 - 19,9)	21,3 <sup>c</sup> (21,0 - 22,1)	0,01426
Ganancia de peso total (g)	8,1 <sup>b,c</sup> (7,7 - 8,4)	25,7 <sup>a</sup> (25,0 - 28,1)	27,1 <sup>a</sup> (26,7 - 28,2)	23,8 (23,2 - 25,9)	0,00019

n= 6-7. Dieta control, CD (A), alta en grasa, HFD (B), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (C) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (D). Datos presentados como mediana (rango intercuartílico). Diferencias significativas establecidas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

## Anexo 6. Evolución del peso corporal

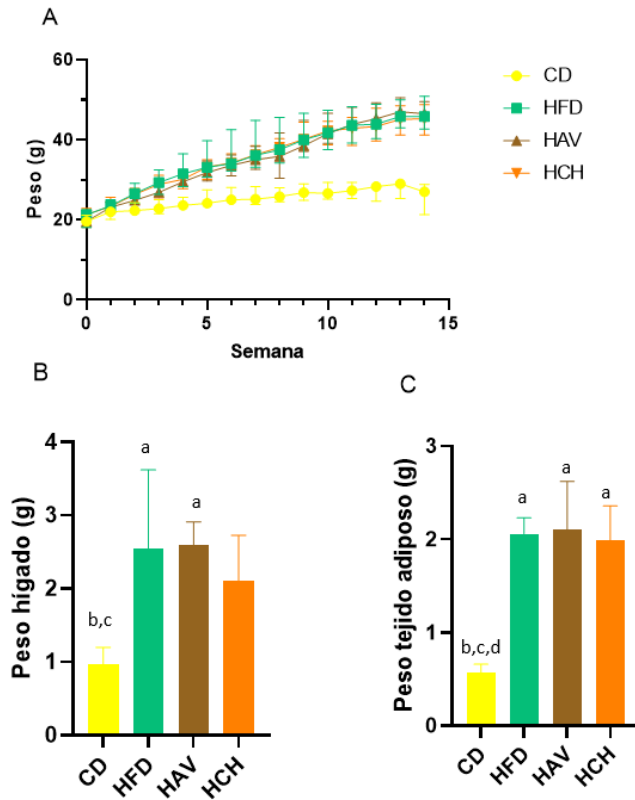


Figura. Evolución de peso corporal semanal por grupo experimental (A). Peso de hígado por grupo experimental (B). Peso tejido adiposo epididimal por grupo experimental (C). n= 6-7. Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .



## Anexo 7. Control de ingesta dietaria

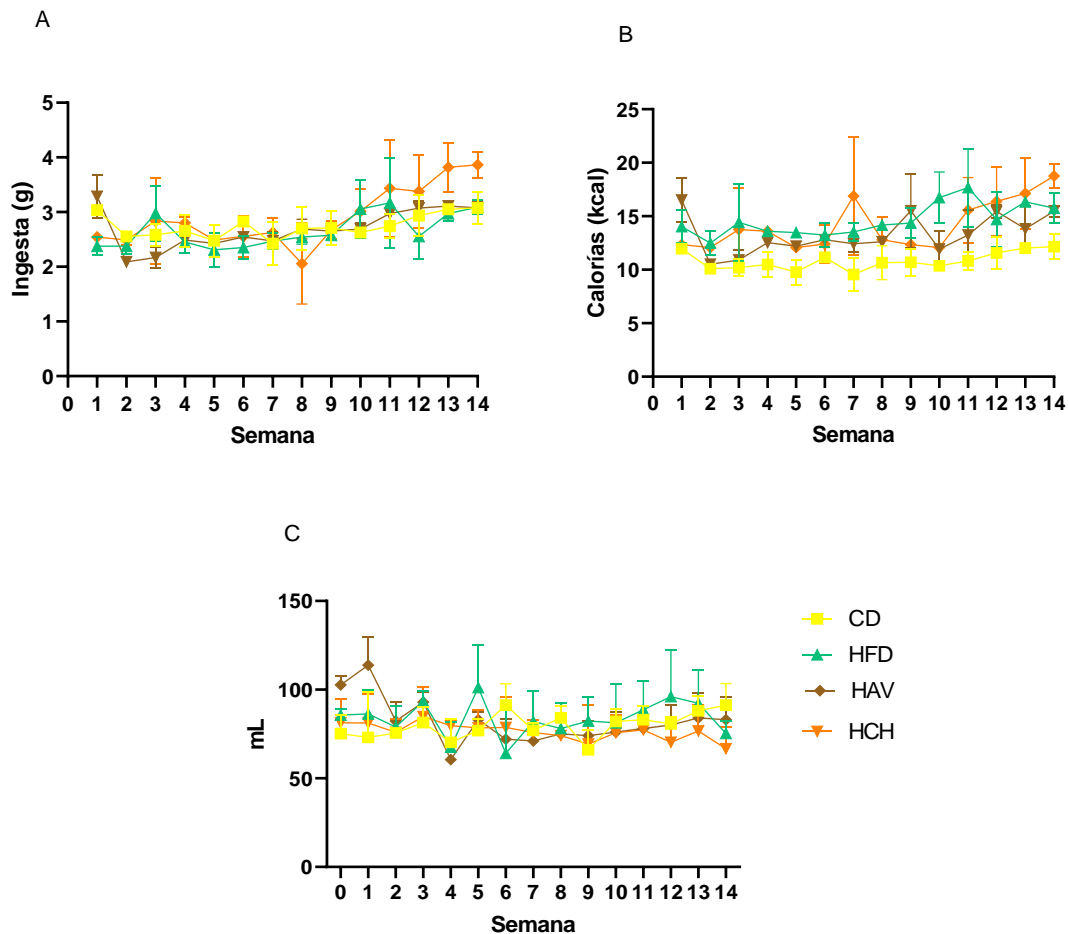


Figura. Control de ingesta (g/día) (A). Ingesta de calorías (kcal/día) (B). Ingesta de agua (ml/día) (C). Los valores se presentan como medianas y rangos intercuartílicos. N=6-7. CD, dieta control; HFD, dieta alta en grasas; HCH, harina de semilla de chia rica en fibra; HAV, harina de avena.

## Anexo 8. Ingesta dietaria por grupo experimental

Parámetros /Grupos	CD (A)	HFD (B)	HFD + HAV (C)	HFD + HCH (D)	Valor p
Ingesta dietaria (g/día)	2,73 (2,55 – 2,98)	2,55 (2,42 – 2,94)	2,54 (2,37 – 3,00)	2,68 (2,51 – 3,13)	NS
Ingesta energética (kcal/día)	10,79 <sup>b,c,d</sup> (10,06 - 11,78)	13,89 <sup>a</sup> (12,93 – 15,69)	12,77 <sup>a</sup> (11,93 – 15,07)	13,02 <sup>a</sup> (12,19 – 15,20)	0,0001
Ingesta de proteínas (g/día)	0,52 <sup>b,c,d</sup> (0,49 – 0,57)	0,68 <sup>a,c</sup> (0,64 – 0,77)	0,58 <sup>a,b,d</sup> (0,55 – 0, 69)	0,69 <sup>a,c</sup> (0,65 – 0,79)	0,0001
Ingesta de hidratos de carbono (g/día)	1,84 <sup>b,c,d</sup> (1,72 – 2,01)	0,68 <sup>a,c,d</sup> (0,64 – 0,77)	0,84 <sup>a,b,d</sup> (0,79 – 0,99)	0,56 <sup>a,b,c</sup> (0,53 – 0,64)	0,001
Ingesta de lípidos (g/día)	0,12 <sup>b,c,d</sup> (0,11 – 0,13)	0,91 <sup>a,c</sup> (0,85 – 1,02)	0,75 <sup>a,b</sup> (0,71 – 0,89)	0,80 <sup>a</sup> (0,75 – 0,91)	0,0001
Fibra total (g/día)	0,14 <sup>d</sup> (0,13 – 0,15)	0,13 <sup>c,d</sup> (0,12 – 0,15)	0,15 <sup>b,d</sup> (0,14 – 0,18)	0,38 <sup>a,b,c</sup> (0,35 – 0,43)	0,0001
Fibra soluble (g/día)	0 <sup>c,d</sup>	0 <sup>c,d</sup>	0,02 <sup>a,b,d</sup> (0,017 – 0,021)	0,03 <sup>a,b,c</sup> (0,02 – 0,03)	0,0001
Fibra insoluble (g/día)	0,14 <sup>d</sup> (0,13 – 0,15)	0,13 <sup>d</sup> (0,12 – 0,15)	0,13 <sup>d</sup> (0,12 – 0,16)	0,35 <sup>a,b,c</sup> (0,33 – 0,40)	0,0001
ALA (g/día)	0,002 <sup>b,c,d</sup> (0,002 – 0,003)	0,017 <sup>a,d</sup> (0,016 – 0,019)	0,014 <sup>a,d</sup> (0,013 – 0,016)	0,045 <sup>a,b,c</sup> (0,042 – 0,051)	0,0001

n= 6-7. Dieta control, CD (A), alta en grasa, HFD (B), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (C) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (D). Datos presentados como mediana (rango intercuartílico). Diferencias significativas establecidas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa p<0,05.

## Anexo 9. Perfil de ácidos grasos hepáticos por grupo experimental

Ácidos grasos (mg/g de hígado)	CD (a)	HFD (b)	HFD + HAV (c)	HFD + HCH (d)	Valor p
C16:0	0,30 (0,30 – 0,60) <sup>b,c</sup>	4,50 (2,80 – 4,90) <sup>a</sup>	4,00 (3,10 – 5,90) <sup>a</sup>	1,70 (1,10 – 3,30)	0,01638
C18:0	0,20 (0,10 – 0,20) <sup>b,c</sup>	0,50 (0,40 – 0,60) <sup>a,d</sup>	0,40 (0,40 – 0,50) <sup>a,d</sup>	0,30 (0,20 – 0,40) <sup>b,c</sup>	0,00585
C18:1n9	0,70 (0,40 – 0,90)	7,70 (3,60 – 8,40)	4,90 (0,70 – 8,00)	2,60 (1,20 – 5,50)	NS
C18:2n6 (LA)	0,20 (0,10 – 0,30) <sup>b,c,d</sup>	2,00 (1,70 – 2,20) <sup>a</sup>	2,10 (1,70 – 2,60) <sup>a,d</sup>	0,80 (0,60 – 1,70) <sup>a,c</sup>	0,00470
C18:3n3 (ALA)	0 <sup>b,c,d</sup>	0,05 (0,04 – 0,05) <sup>a</sup>	0,05 (0,04 – 0,07) <sup>a</sup>	0,06 (0,04 – 0,13) <sup>a</sup>	0,01568
C20:4n6 (AA)	0,20 (0,10 – 0,30) <sup>b,c</sup>	0,60 (0,50 – 0,60) <sup>a,d</sup>	0,60 (0,50 – 0,60) <sup>a,d</sup>	0,20 (0,20 – 0,40) <sup>b,c</sup>	0,00238
C22:6 n3 (DHA)	0,10 (0,04 – 0,20) <sup>b,d</sup>	0,40 (0,30 – 0,40) <sup>a,d</sup>	0,30 (0,30 – 0,40)	0,20 (0,20 – 0,40) <sup>a,b</sup>	0,00827
AGS totales	4,00 (1,50 – 5,40) <sup>b,c</sup>	10,4 (8,60 – 13,2) <sup>a,d</sup>	10,90 (0,30 – 12,1) <sup>a,d</sup>	3,20 (2,50 – 8,30) <sup>b,c</sup>	0,00728
AGM totales	0,50 (0,30 – 0,90) <sup>b,c</sup>	6,40 (4,00 – 9,10) <sup>a</sup>	5,40 (1,70 – 8,80) <sup>a</sup>	2,80 (1,40 – 6,00)	0,01753
AGP totales	0,50 (0,20 – 0,70) <sup>b,c,d</sup>	3,30 (2,70 – 3,50) <sup>a</sup>	3,20 (2,70 – 4,00) <sup>a,d</sup>	1,50 (1,10 – 2,80) <sup>a,c</sup>	0,00503
AGP totales n3	0,10 (0,04 – 0,20) <sup>b,c,d</sup>	0,50 (0,40 – 0,50) <sup>a</sup>	0,40 (0,30 – 0,40) <sup>a</sup>	0,30 (0,20 – 0,50) <sup>a</sup>	0,01031
AGP totales n6	0,40 (0,20 – 0,50) <sup>b,c</sup>	2,70 (2,20 – 2,90) <sup>a,d</sup>	2,70 (2,20 – 3,20) <sup>a,d</sup>	1,10 (0,80 – 2,30) <sup>b,c</sup>	0,00243
AG totales	5,1 (2,70 – 6,30) <sup>b,c</sup>	21,8 (15,4 – 25,8) <sup>a,d</sup>	17,6 (14,3 – 22,6) <sup>a,d</sup>	7,1 (5,50 – 17,1) <sup>b,c</sup>	0,00810
Ratio n6/n3	0,96 (0,86 – 1,10) <sup>c</sup>	5,95 (5,63 – 6,00)	7,19 (6,41 – 7,32) <sup>a,d</sup>	3,95 (3,79 – 4,17) <sup>c</sup>	0,00024

n= 6-7. Dieta control, CD (A), alta en grasa, HFD (B), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (C) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (D). Datos presentados como mediana (rango intercuartílico). Diferencias significativas establecidas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa p<0,05.

## Anexo 10. Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal por grupo experimental

Ácidos grasos (mg/g de tejido adiposo)	CD (a)	HFD (b)	HFD + HAV (c)	HFD + HCH (d)	Valor p
C16:0	9,73 (8,12 – 11,37)	11,03 (6,73 – 12,53)	12,44 (10,65 – 13,72)	10,19 (8,08 – 12,30)	NS
C18:0	0,95 <sup>b,c</sup> (0,71 – 1,12)	2,11 <sup>a</sup> (1,23 – 2,50)	2,30 <sup>a</sup> (2,03 – 2,78)	1,77 (1,31 – 2,22)	0,00387
C18:1n9	24,11 (18,60 – 27,11)	29,46 (18,21 – 31,78)	27,26 (24,92 – 32,71)	21,35 (18,93 – 29,77)	NS
C18:2n6 (LA)	9,52 (7,89 – 10,62)	10,93 (7,06 – 11,61)	11,11 (9,70 – 13,88)	9,73 (7,78 – 11,69)	NS
C18:3n3 (ALA)	0,50 (0,45 – 0,63)	0,34 <sup>d</sup> (0,20 – 0,44)	0,36 (0,34 – 0,37)	0,62 <sup>b</sup> (0,56 – 0,68)	0,01207
C20:4n6 (AA)	0,263 (0,261 – 0,264)	0,18 (0,13 – 0,18)	0,22 (0,20 – 0,26)	0,18 (0,14 – 0,22)	NS
C22:6 n3 (DHA)	0,086 (0 – 0,10)	0	0	0,75 (0,067 – 0,084)	NS
AGS totales	11,40 (9,44 – 15,52)	13,83 (8,59 – 15,85)	15,40 (13,59 – 17,32)	12,65 (9,97 – 15,34)	NS
AGM totales	29,07 (23,22 – 33,66)	31,52 (19,69 – 34,47)	29,56 (27,30 – 35,29)	26,60 (20,94 – 32,26)	NS
AGP totales	10,76 (9,06 – 12,19)	11,74 (7,63 – 12,50)	12,14 (10,48 – 14,85)	10,86 (8,75 – 12,96)	NS
AGP totales n3	0,61 (0,45 – 0,72)	0,34 <sup>d</sup> (0,20 – 0,50)	0,36 (0,34 – 0,48)	0,70 <sup>b</sup> (0,63 – 0,77)	0,01586
AGP totales n6	9,78 (8,17 – 10,88)	11,08 (7,18 – 11,79)	11,35 (9,84 – 14,07)	9,91 (7,92 – 11,91)	NS
AG totales	51,23 (41,73 – 58,78)	57,09 (36,35 – 62,66)	59,47 (51,37 – 62,71)	50,11 (39,66 – 60,56)	NS
Ratio n6/n3	17,05 <sup>c</sup> (13,85 – 18,84)	29,59 <sup>d</sup> (23,05 – 32,54)	31,67 <sup>a,d</sup> (27,41 – 33,23)	14,11 <sup>b,c</sup> (12,67 – 15,55)	0,00058

n= 6-7. Dieta control, CD (A), alta en grasa, HFD (B), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (C) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (D). Datos presentados como mediana (rango intercuartílico). Diferencias significativas establecidas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn s para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa p<0,05.

### Anexo 11. Perfil de ácidos grasos en eritrocitos por grupo experimental

Ácidos grasos (mg/g de eritrocitos)	CD (a)	HFD (b)	HFD + HAV (c)	HFD + HCH (d)	Valor p
C16:0	0,18 (0,16 – 0,26)	0,26 (0,18 – 0,39)	0,22 (0,17 – 0,24)	0,25 (0,16 – 0,36)	NS
C18:0	0,07 (0,07 – 0,09)	0,12 (0,07 – 0,17)	0,07 (0,07 – 0,12)	0,08 (0,06 – 0,11)	NS
C18:1n9	0,08 (0,08 – 0,11)	0,10 (0,07 – 0,15)	0,08 (0,07 – 0,11)	0,08 (0,06 – 0,10)	NS
C20:4n6 (AA)	0,12 (0,10 – 0,15)	0,11 (0,09 – 0,17)	0,10 (0,10 – 0,13)	0,12 (0,10 – 0,12)	NS
AGS totales	0,25 (0,22 – 0,35)	0,38 (0,25 – 0,56)	0,29 (0,24 – 0,37)	0,34 (0,22 – 0,45)	NS
AGM totales	0,08 (0,08 – 0,11)	0,10 (0,07 – 0,15)	0,08 (0,07 – 0,11)	0,10 (0,06 – 0,13)	NS
AGP totales	0,20 (0,12 – 0,22)	0,11 (0,09 – 0,17)	0,10 (0,10 – 0,13)	0,12 (0,10 – 0,12)	NS
AG totales	0,53 (0,42 – 0,71)	0,59 (0,41 – 0,88)	0,48 (0,41 – 0,59)	0,54 (0,41 – 0,71)	NS

n= 6-7. Dieta control, CD (A), alta en grasa, HFD (B), alta en grasa con suplementación de harina de avena, HFD + HAV (C) y alta en grasa con suplementación de harina de chia rica en fibra, HFD + HCH CD (D). Datos presentados como mediana (rango intercuartílico). Diferencias significativas establecidas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn s para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

## Anexo 12. Concentración de ácidos grasos de cadena corta

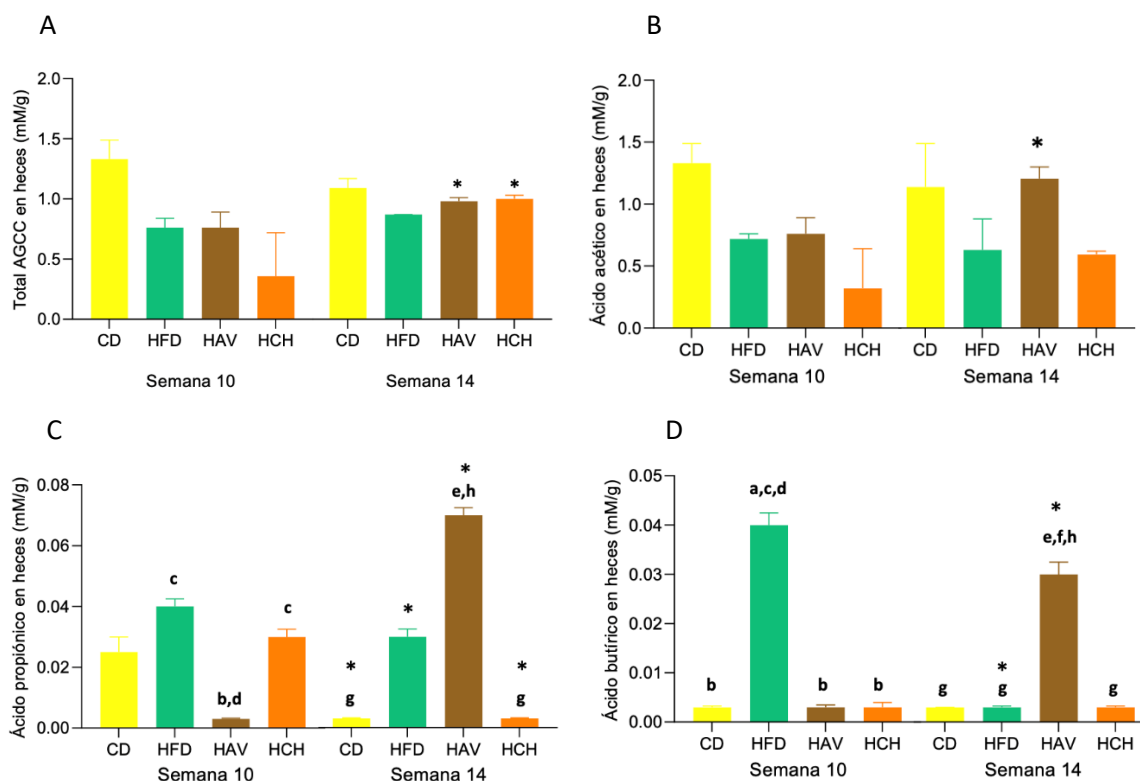


Figura 2. Ácidos grasos de cadena corta en heces pre-suplementación (semana 10) y post-suplementación (semana 14) por grupo experimental. n= 6-7. Ácidos grasos de cadena corta totales (mM/g) (A); Ácido acético (mM/g) (B); Ácido propiónico (C); Ácido butírico (D). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas según test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ . \* indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre pares según el test de Mcnemar.



