

UNIVERSIDAD DE CHILE

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Doctor Fernando Monckeberg Barros

**“EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LA SUPLEMENTACIÓN CONJUNTA DE
ACIDO DOCOSAHEXAENOICO E HIDROXITIROSOLO FRENTE A UNA DIETA
ALTA EN GRASA EN RATON”**

Fondecyt de Iniciación, proyecto n° 11140174

Tesista: Macarena Ortiz Manrique

Director de Tesis: Dr. Rodrigo Valenzuela Báez

TESIS PARA OPTAR AL GRADO MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

MENCION NUTRICIÓN CLÍNICA

Octubre de 2016

Santiago-Chile

1. Cuerpo Preliminar

I. Comisión de Tesis

Luis Videla, Profesor Titular de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Miguel Llanos, Profesor Asociado del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Doctor Fernando Monckeberg Barros.

Daniel Bunout, Profesor Titular del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Doctor Fernando Monckeberg Barros.

II. Índice de Contenidos

| | <u>Pag.</u> |
|---|-------------|
| 1. Cuerpo Preliminar | 2 |
| I. Comisión de Tesis | 2 |
| II. Índice de Contenidos | 3 |
| III. Índice de Tablas | 5 |
| IV. Índice de Figuras | 5 |
| V. Lista de abreviaturas | 6 |
| 2. Resumen | 8 |
| 3. Abstract | 9 |
| 4. Introducción | 10 |
| 4.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico | 10 |
| 4.2 Patogénesis de la EHGNA | 11 |
| 4.3 Factores metabólicos relacionados con EHGNA | 12 |
| 4.4 Ácido docosahexaenoico: efectos protectores | 14 |
| 4.5 Hidroxitirosol: efectos protectores | 16 |
| 5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos | 18 |
| 5.1 Hipótesis | 18 |
| 5.2 Objetivo General | 18 |
| 5.3 Objetivos Específicos | 18 |
| 6. Metodología | 19 |
| 6.1 Definición del diseño de la investigación | 19 |
| 6.2 Definición de la muestra | 19 |



| | | |
|-----|--|----|
| 6.3 | Protocolo de intervención | 19 |
| 6.4 | Grupos experimentales | 20 |
| 6.5 | Dietas y suplementación | 20 |
| 6.6 | Variables | 21 |
| 6.7 | Procedimientos y técnicas | 22 |
| 6.8 | Análisis Estadístico | 24 |
| 7. | Resultados | 25 |
| 7.1 | Efecto de las intervenciones en las características generales de los grupos experimentales | 25 |
| 7.2 | Efecto de las intervenciones en la ingesta de los grupos experimentales | 25 |
| 7.3 | Efecto de las intervenciones en los parámetros de esteatosis hepática | 26 |
| 7.4 | Efecto de las intervenciones en los parámetros de inflamación | 29 |
| 7.5 | Efecto de las intervenciones en los parámetros de estrés oxidativo | 31 |
| 7.6 | Efecto de las intervenciones en el perfil de ácidos grasos hepáticos | 36 |
| 8. | Discusión | 38 |
| 9. | Conclusión | 52 |
| 10. | Referencias | 53 |
| 11. | Anexos | 63 |

III. Índice de Tablas

| | <u>Pag.</u> |
|--|-------------|
| Tabla 1. Grupos experimentales según tratamiento. | 19 |
| Tabla 2. Perfil de los AG hepáticos totales más importantes en los grupos experimentales. | 36 |

IV. Índice de Figuras

| | <u>Pag.</u> |
|--|-------------|
| Figura 1. Microscopía de cortes de hígado de ratón. | 24 |
| Figura 2. Contenido de grasa hepática total en los grupos experimentales. | 26 |
| Figura 3. Contenido total de TG hepáticos en los grupos experimentales. | 27 |
| Figura 4. Niveles séricos de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en los grupos experimentales. | 29 |
| Figura 5. Capacidad antioxidante plasmática y actividad de SOD en los grupos experimentales. | 30 |
| Figura 6. Glutación hepático total, GSH, GSSG, razón GSH/GSSG en los grupos experimentales. | 32 |
| Figura 7. Niveles hepáticos de carbonilos protéicos, TBARs y F8-isoprostanos en los grupos experimentales. | 33 |
| Figura 8. Mecanismos involucrados entre el estrés de RE y la esteatosis hepática. | 49 |
| Figura 9. Mecanismos involucrados en el efecto hepatoprotector de la suplementación de HT y DHA frente a una DAG. | 50 |

V. Lista de abreviaturas

| | |
|---------------------------------|---|
| AL | Ácido linoleico |
| AAL | Ácido α -linolénico |
| ACC | Acetil-CoA carboxilasa |
| AG | Ácido graso |
| AGL | Ácido graso libre |
| AGPICL | Ácido graso poliinsaturado de cadena larga |
| ALT | Alanina amino transferasa |
| AST | Aspartato amino transferasa |
| apoB-100 | Apolipoproteína B100 |
| ARA | Ácido araquidónico |
| ATF-4 | Factor de activación de transcripción 4 |
| ATF -6 | Factor de activación de transcripción 6 |
| BiP | Proteína inmunoglobulina |
| CHO | Hidratos de carbono |
| C/EBPβ | CCAAT/proteínas de unión al potenciador β |
| C/EBPγ | CCAAT/ proteínas de unión al potenciador γ |
| DAG | Dieta alta en grasa |
| DC | Dieta control |
| DHA | Ácido docosahexaenoico |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DPA | Ácido docosapentaenoico |
| EHGNA | Enfermedad por hígado graso no alcohólico |
| EHNA | Esteatohepatitis no alcohólica |
| EMAG | Ésteres metílicos de ácidos grasos |
| EO | Estrés oxidativo |
| EPA | Ácido eicosapentaenoico |
| ERAD | Degradación de proteínas asociadas al RE |
| EROs | Sustancias reactivas al oxígeno |
| FAS | Ácido graso sintasa |
| GCL | Ligasa glutamato-cisteína |
| GGT | γ -glutamil transpeptidasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| GST | Glutación S-transferasa |
| HT | Hidroxitinol |

| | |
|--|--|
| HO-1 | Hemo oxigenasa 1 |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| ICAM-1 | Moléculas de adhesión intracelular |
| IF γ | Interferon γ |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| IL-1β | Interleuquina 1 β |
| IR | Insulino resistencia |
| IRE1α | Inositol requirente de enzima 1 α |
| JNK | Quinasa c-Jun N-terminal |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LDN | Lipogénesis <i>de novo</i> |
| MDA | Malondialdehido |
| NF-$\kappa\beta$ | Factor nuclear kappa β |
| NQO1 | NAD(P)H quinona oxidoreductasa |
| Nrf2 | Factor de transcripción nuclear eritrocitario |
| O₂\cdot | Radical superóxido |
| p-eIF2α | Factor de iniciación de la traducción eucariótica |
| PPAR-α | Receptor de proliferación peroxisomal α |
| PPARGC1α | Receptor coactivador de proliferación peroxisomal 1 α |
| PERK | Proteína quinasa RNA-activado (PKR) ER quinasa |
| RE | Retículo endoplasmático |
| SCD1 | ATP citrato liasa, estearoil-CoA desaturasa-1 |
| SOD | Super óxido dismutasa |
| SREBP 1c | Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides |
| TBARs | Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico |
| TG | Triglicéridos |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral α |
| TRAF2 | Factor 2 asociado a receptor de TNF- α |
| UCP 2 | Proteína desacoplanete 2 |
| UPR | Respuesta a proteínas mal plegadas |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |
| 4HHE | 4-hidroxi2-hexenal |

2. Resumen

Introducción: La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA), es patología multifactorial, con complejas interacciones entre dieta, estilos de vida y genética. Se ha visto que es la causa más común de enfermedad hepática, lo que hace de esta un problema de salud pública. Observándose que la insulino resistencia (IR) y el estrés oxidativo (EO), son los mayores determinantes de la aparición de EHGNA y su progresión a esteatohepatitis. Por esto la EHGNA es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico y está directamente relacionada con el incremento de la prevalencia de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Actualmente, el único tratamiento es la dieta y cambios en el estilo de vida. Los pacientes con EHGNA, muestran un aumento en los parámetros relacionados al EO, IR y además depleción hepática de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) n-3, con aumento en la relación n-6/n-3. Por otro lado, el hidroxitirosol (HT) es un polifenol que se encuentra principalmente en los productos del olivo, el cual tiene una potente actividad antioxidante, protegiendo a las células del EO y mejorando la función cardíaca. Considerando esta evidencia, surge la interrogante en relación a estudiar si el uso de AGPICL n-3, específicamente ácido docosahexaenoico (DHA) más HT, podrían tener un efecto protector contra la EHGNA y las alteraciones metabólicas que la acompañan. **Objetivo:** Determinar el efecto de la suplementación dietaria con DHA e HT en la reducción de la esteatosis hepática, inflamación y EO inducidos por dieta alta en grasa en ratón. **Metodología:** Ratones macho C57BL/6J, fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los 8 grupos experimentales, en donde fueron alimentados con una dieta control (DC, 10% de las calorías como grasa) o con una dieta alta en grasa (DAG, 60% de las calorías como grasa), y suplementados con DHA (50mg/kg/día), HT (5mg/kg/día) o ambos por un periodo de 12 semanas. **Resultados:** La alimentación con DAG por 12 semanas, indujo un cuadro de esteatosis hepática acompañado de EO e inflamación. Respecto a esto, la administración oral conjunta de DHA e HT, logró un mayor efecto protector que la suplementación aislada de HT o DHA, frente a la DAG a través de i) reducción de la esteatosis hepática ii) menor respuesta inflamatoria iii) aumento de las defensas antioxidantes y iv) aumento de AGPICL n-3 en el perfil de ácidos grasos hepáticos. **Conclusión:** La suplementación conjunta de HT + DHA, tuvo un rol hepatoprotector frente a la injuria provocada por la DAG, por lo que podría ser considerada como una posible intervención clínico – nutricional para el manejo de la EHGNA y su evolución a esteatohepatitis en ratón.

3. Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is multifactorial disease with complex interactions between diet, lifestyle and genetics. It has been found that is the most common cause of liver disease, making this a public health problem. It has been shown that insulin resistance (IR) and oxidative stress (OS) are the major determinants of the onset of NAFLD and progression to steatohepatitis. NAFLD is considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome and is directly related to the increased prevalence of obesity and type 2 diabetes mellitus (DM2). Currently, the only treatment is diet and changes in lifestyle. NAFLD patients show an increase in the parameters related to OS, IR and also liver reduction of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) n-3, with increase in the ratio n-6/n-3. On the other hand, hydroxytyrosol (HT) is a polyphenol found mainly in olive products, which has potent antioxidant activity, protecting cells from OS and improving cardiac function. Given this evidence, we ask whether the use of LCPUFA n-3, specifically docosahexaenoic acid (DHA) plus HT, may have a protective effect against NAFLD and metabolic alterations that accompany it. **Objective:** To determine the effect of dietary supplementation with DHA and HT in reducing hepatic steatosis, inflammation and OS induced by high-fat diet in mice. **Methodology:** Male C57BL/6J mice were randomly assigned to each of the 8 experimental groups, where they were fed a control diet (CD, 10% of calories as fat) or a high-fat diet (HFD, 60% calories as fat) and supplemented with DHA (50mg/kg/day), HT (5mg/kg/day) or both for a period of 12 weeks. **Results:** HFD feeding for 12 weeks induced hepatic steatosis accompanied by OS and inflammation. In this regard, oral administration of DHA and HT achieved a greater protective effect than isolated supplementation of HT or DHA, compared to HFD through i) reduction of hepatic steatosis ii) less inflammatory response iii) increased antioxidant defenses and iv) increase the LCPUFA n-3 hepatic fatty acid profile. **Conclusion:** The HT + DHA mixed supplementation had a hepatoprotective role against injury caused by HFD, which could be considered as a possible clinical-nutritional intervention for handling NAFLD and its evolution steatohepatitis in mouse.

4. Introducción

4.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA), comprende un espectro de alteraciones, las que van desde simple esteatosis hepática hasta esteatosis más severa asociada a inflamación marcada conocida como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cual a menudo progresa con desarrollo de fibrosis (40-50%), cirrosis hepática (15-17%), falla renal (3%) y potencialmente carcinoma hepatocelular (1,2). La EHGNA corresponde a una enfermedad multifactorial, que envuelve complejas interacciones entre dieta, estilos de vida y genética, los cuales se combinan para desarrollar el fenotipo de EHGNA (3). La prevalencia de esta patología en la población general es de 20-30%, en adultos obesos alcanza un 80-90%, en pacientes con diabetes un 30-50% y hasta el 90% en pacientes con hiperlipidemia. La prevalencia entre niños es del 3-10%, con un aumento del 40-70% en niños obesos. Se ha visto que es la causa más común de enfermedad hepática en todo el mundo, lo que hace de esta un problema de salud pública mayor y una gran carga económica para el país (4). Las estimaciones actuales, señalan que un 40% de las personas que padecen EHGNA desarrolla EHNA⁵. Además, se ha visto un aumento en la incidencia de enfermedad vascular coronaria (10.8%), cerebrovascular (37.3%) y periférica (24.5%) en individuos que presentan EHGNA (6).

La esteatosis es definida como el nivel hepático de triglicéridos (TG), que excede el percentil 95 para individuos delgados y saludables (>55mg por gramo de hígado), o como la presencia de gotas de TG citoplasmáticos, en más del 5% de los hepatocitos¹. Es muy importante que al momento de diagnosticar EHGNA, se excluyan otros factores de enfermedad hepática (virales, autoinmunes y genéticos), además de tener un registro del consumo de alcohol de la persona y que estos no excedan el rango que produce esteatosis hepática por alcohol (<20gr/día en mujeres y <30gr/día en hombres) (4).

En la literatura científica se ha visto, que los factores genéticos, también serían importantes en la determinación de la susceptibilidad a EHGNA y su progresión a cirrosis. Muchos

desórdenes hereditarios del metabolismo de lípidos, están asociados con esteatosis hepática, además los polimorfismos en genes que afectan el metabolismo lipídico, estrés oxidativo (EO), insulino resistencia (IR) y regulación inmune, han sido identificados como factores predisponentes para el desarrollo de esteatosis hepática y el progreso de daño hepático (7).

En la actualidad, la EHGNA es la tercera causa de trasplante hepático en los EE.UU., pero según las proyecciones, esta enfermedad se convertirá en la causa número uno en los próximos años (8).

4.2 Patogénesis de la EHGNA

Dentro del cuerpo humano, el hígado, juega un rol crucial en el control del metabolismo de ácidos grasos (AG) y TG, a través de su síntesis, almacenamiento, secreción y oxidación de AG libres. El hígado responde y administra los AG provenientes a partir de la dieta, del tejido adiposo y de su propia producción en la lipogénesis *de novo* (LDN) (9).

Aunque la etiología exacta de la EHGNA y EHNA aún no está completamente dilucidada, si se conoce que la IR está directamente relacionada con estas patologías, a través de los niveles alterados de lipólisis del tejido adiposo y de una utilización de glucosa periférica disminuida (10). Se considera que la patogénesis de la EHGNA involucra la “hipótesis de 2 golpes”. El “primer golpe”, está representado por la acumulación de TG en el hígado, lo que perjudica el metabolismo de AG, incluyendo la LDN, β – oxidación y exportación de TG (11). Las fuentes AG libres, como mencionamos anteriormente, son la dieta, LDN y lipólisis del tejido adiposo, se ha visto que la mayor cantidad de TG provienen de la lipólisis (59%) y de la LDN (26%) y en menor proporción de la dieta (17%) (12,13). En la EHGNA, el flujo aumentado de AG libres desde el tejido adiposo es atribuido a la supresión alterada de la lipólisis por la IR (7). El “segundo golpe”, es debido a condiciones pro oxidantes y hepatotóxicas y consta de un aumento en la susceptibilidad a la injuria inflamatoria, la cual es mediada por el aumento de la expresión de citoquinas y adipoquinas inflamatorias, EO, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplasmático (RE) y endotoxemia intestinal derivada del crecimiento bacteriano aumentado, lo que lleva a esteatohepatitis (12). Las citoquinas inflamatorias, incluyen el factor de necrosis tumoral

alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), e interleuquina 1 β (IL-1 β). El TNF α se correlaciona con un aumento de la severidad de EHGNA y promueve mayor IR. En la actualidad se ha añadido un componente adicional o “tercer golpe”, el cual refleja la inadecuada proliferación de los hepatocitos, este, sería la etapa final que lleva a fibrosis, resultado de un desbalance en la tasa de muerte y regeneración de los hepatocitos. Existe una inhibición de la proliferación hepática debido al EO, lo que resulta en una activación de las células estrelladas hepáticas y posterior diferenciación a miofibroblastos, los que a su vez producen un exceso de matriz y estimulan el reclutamiento de células hepáticas progenitoras. Estas células, se diferenciarán en hepatocitos y colangiocitos, los que también pueden producir quimioquinas, las que atraerán más células inflamatorias al hígado. Esta respuesta de reparación alternativa da lugar a una distorsión en la arquitectura hepática con presencia variable de fibrosis, nódulos de regeneración e infiltración de células inflamatorias (9,13,14). La esteatosis hepática finalmente es provocada por un aumento de la lipogénesis, una β – oxidación peroxisomal y mitocondrial deficiente y/o una menor capacidad del hígado de exportar lípidos, debido a una alteración en el ensamblaje de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (15). En este último caso, la acumulación de lípidos en el hígado, afecta el recambio de la apolipoproteína B-100 (apoB-100), la proteína estructural principal de las VLDL (16). Por otro lado, el ensamblaje y secreción de las VLDL, está influenciado por varios factores, dentro de los cuales se encuentra la proteína hepática de unión a ácidos grasos, que es regulada por AG de cadena larga, incluyendo AGPICL (17).

4.3 Factores metabólicos relacionados con EHGNA

En los últimos años, se ha visto que la IR y el EO, son los mayores determinantes de la aparición de EHGNA y de la progresión de esteatosis a esteatohepatitis (18). Además de estos factores, la EHGNA está muy relacionada con otras patologías características del síndrome metabólico, como la obesidad central, hipertensión e hiperlipidemia (10), es por esto que es considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico y su aumento está directamente relacionado con el incremento de la prevalencia de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (8). La IR promueve la lipólisis del tejido adiposo periférico, aumentando el flujo de AG libres hacia el hígado, el cual conduce a un aumento

de la producción de TG. Estudios en humanos han demostrado que la lipólisis periférica, niveles sistémicos de AG libres y la LDN a nivel hepático, están aumentados en los sujetos con EHGNA (7). La hiperinsulinemia, promueve la regulación transcripcional de genes, que a su vez promueven la LDN en el hígado. Además en presencia de IR se presentan mayores tasas de absorción de AG no esterificados en plasma, atribuible a la mayor liberación por parte del tejido adiposo aumentado, esto a su vez, explicado por la respuesta disminuida a la insulina. La grasa hepática está altamente correlacionada con todos los componentes del síndrome metabólico y esto es independiente de la presencia de obesidad o intolerancia a la glucosa (13).

Se ha observado que la mal nutrición por exceso, está asociada con un aumento en la movilización periférica de AG hacia el hígado debido a la IR y al aumento de la LDN. Estos hallazgos sugieren que el exceso de calorías puede imponer una sobre carga de AG en el hígado, que a su vez está asociada con mayores tasas de oxidación mitocondrial de AG y generación de especies reactivas al oxígeno (EROs), lo que aumenta el estado de EO en el hígado (19). Hay evidencia que muestra que la oxidación mitocondrial aumentada, como consecuencia de la IR, está asociada a injuria hepática, inflamación y fibrosis. Esto debido a que los ácidos grasos libres (AGL) y sus metabolitos son ligandos del receptor de proliferación de peroxisomas α (PPAR- α), un factor de transcripción que regula numerosos genes, incluidos algunos relacionados con oxidación de grasas a nivel mitocondrial, peroxisomal y microsomal (20). Los pacientes obesos con EHGNA, muestran un aumento en los parámetros relacionados al EO comparados con sujetos sanos, dentro de los cuales encontramos (i) potencial antioxidante reducido (ii) actividad de radicales libres elevada (iii) mayor formación del radical superóxido ($O_2\cdot^-$) dependiente de células Kupffer y respuesta de peroxidación lipídica (iv) disminución concomitante de la capacidad antioxidante sistémica del plasma (19).

Ya hemos visto que la obesidad está fuertemente ligada con la esteatosis hepática, por lo que la primera línea de tratamiento es un cambio en el estilo de vida, lo que considera una disminución de peso gradual y un aumento de la actividad física (21), para así lograr una disminución del peso corporal, mejorar el control glicémico, dislipidemia y riesgo

cardiovascular (3). Sin embargo, la mayoría de los estudios que han llevado a cabo este tipo de intervenciones, no realizan una segunda biopsia hepática, por lo que no se puede asegurar que haya una mejoría a nivel histológico (21).

4.4 Ácido docosahexaenoico: efectos protectores

El ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA), es un AG poliinsaturado de cadena larga (AGPICL), miembro de la familia de los AG n-3, con el primer doble enlace ubicado en el tercer carbono desde el extremo metilo (22). Junto con el ácido eicosapentaenóico (EPA) y el ácido docosapentaenóico (DPA), el DHA es uno de los principales AGPICL n-3 en los alimentos (23). El ácido alfa linolénico (C18:3 n-3, AAL), es un AG esencial que no puede ser sintetizado por los humanos y es el precursor de todos los AGPICL n-3 (24). Los humanos podemos convertir el AAL en EPA y DHA, pero la eficiencia de esta conversión es muy baja, por lo que se recomienda que la ingesta directa de estos nutrientes sea la adecuada (23). El DHA se encuentra envuelto en múltiples funciones en el cuerpo humano, donde ejerce un rol central en el desarrollo fisiológico y normal del individuo desde la etapa embrionaria (25). El depósito de este AG es crítica durante el embarazo y el primer año de vida de las personas, ya que este es esencial para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso y visual (26). Debido a que la acumulación de AG en las membranas celulares está influenciada por el tipo y la cantidad AG n-3 en la dieta, existe la posibilidad de que el contenido de estos en nuestra alimentación, pueda influir en muchas funciones fisiológicas (27). Recientemente, se ha reconocido el rol vital del DHA para las personas. Uno de los efectos mejores documentados del DHA, es en el ámbito cardiovascular, en donde se ha visto que disminuye el riesgo de arritmias, reduce la presión arterial y disminuye el ritmo cardíaco. También ha sido establecido, que el DHA posee efectos positivos en las funciones sensoriales, cognitivas y de comportamiento (27) y que además tiene propiedades anti inflamatorias que podrían alterar las funciones de linfocitos, monocitos y macrófagos (28). Este AGPICL n-3, es sustrato para dos grupos de resolvinas de la serie D, producidas durante la resolución de la inflamación en exudados inflamatorios. Las resolvinas de la serie D ejecutan acciones antiinflamatorias potentes (29).

Al respecto, en células de microglías, estas resolvinas bloquean las transcripciones de TNF- α inducidas por citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , la cual es expresada rápidamente in respuesta a una injuria neuronal (30).

En diversos estudios, se ha visto que un aumento en la relación AG saturados/insaturados en pacientes con esteatosis hepática, no solo conduce a una mayor injuria hepática, sino que también reduce la capacidad proliferativa y aumenta la susceptibilidad del hígado a las endotoxinas (31). Además estos pacientes muestran dos alteraciones importantes relacionadas, IR y depleción hepática de AGPICL n-3, con aumento en la relación n-6/n-3. Esta depleción se evidencia por una disminución del 50% en los niveles del EPA y DHA. Bajo estas condiciones, la reducción de AGPICL n-3 en el hígado puede ser causada por varios mecanismos (i) mayor peroxidación hepática de los AGPICL n-3 en vista del aumento en la generación de EROs y su susceptibilidad al ataque de radicales libres (15) (ii) disminución en la desaturación y elongación de ALA hacia EPA y DHA, como resultado de una actividad alterada de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas (32) (iii) bajo consumo de EPA + DHA o de su precursor ALA (15). La depleción de AGPICL en pacientes con EHGNA puede contribuir al desarrollo de hígado graso, debido a un desarreglo en la capacidad para regular el metabolismo lipídico, esta regulación puede ocurrir a dos niveles (i) modulación de la transducción de señal a través de la manipulación de la composición de los AG de membrana (ii) modificación de la transcripción genética (15). Se ha visto que las dietas que contienen aceite de pescado, el cual es rico en AG n-3, disminuyen el contenido hepático de TG y el grado de inflamación, debido a sus propiedades anti esteatóticas, anti inflamatorias y neuro protectivas (33,34). Los beneficios del DHA y EPA, derivados de una ingesta elevada de aceite de pescado, han sido demostrados en modelos animales de IR, estos beneficios incluyen (i) disminución de las concentraciones plasmáticas de AGL, TG, glucosa e insulina (ii) disminución de la LPN, secreción de VLDL y concentración de TG (iii) aumento de la utilización y almacenamiento de glucosa por el músculo esquelético (iv) aumento de la captación de glucosa por el tejido adiposo mediado por insulina (v) disminución del tamaño de los adipocitos y del contenido de grasa visceral (20).

4.5 Hidroxitirosol: efectos protectores

El 4-(2-Hidroxietyl)-1,2-benzenediol (C₈H₁₀O₃), más conocido como hidroxitirosol (HT), es un polifenol que se encuentra principalmente en los productos del olivo y sus derivados, el cual tiene una potente actividad antioxidante, protegiendo a las células del EO y mejorando la función cardíaca (35). Recientemente se ha visto que el HT y sus metabolitos, podrían acumularse de manera dosis – dependiente principalmente en hígado y riñón, pudiendo prevenir así patologías hepáticas y renales (36).

Un estudio realizado en células endoteliales de arteria, concluyó que el HT redujo los niveles de EROs a través de i) aumento de la expresión y actividad de la enzima catalasa, lo que suprimió la elevación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ii) inducción de la expresión del gen FOXO3a y subsecuente translocación dentro del núcleo vía activación de AMPK iii) la vía de señalización AMPK – FOXO3a, juegan un rol central en la expresión de catalasa dependiente de HT (37). Otro estudio en modelo animal, mostró que el HT posee tanto propiedades antioxidantes como antiinflamatorias, evidenciando que la suplementación de ratas con este polifenol, tuvo efectos citoprotectores a través de la supresión de la actividad del factor nuclear kappa β (NF-κB) (38).

Otros estudios realizados en animales, han demostrados que la ingesta de aceite de oliva rico en HT, lleva a una mejora en el perfil lipídico sanguíneo. Un estudio realizado en conejos, demostró una disminución en el colesterol total circulante y un aumento en el colesterol HDL. Por otro lado, diversos estudios en ratas, han encontrado una disminución en los niveles de colesterol total, colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) y TG, paralelo a un aumento de la concentración de colesterol HDL (39). También se ha visto que el HT podría disminuir los niveles de LDL oxidada a través de su unión al LDL y así evitar su oxidación (40).

Un estudio realizado en una cohorte de hombres de mediana edad con sobrepeso, demostró que la suplementación con HT mejoraba la sensibilidad a la insulina y la capacidad secretora de las células β-pancreáticas, considerándose así, capaz de modificar factores de riesgo cardiovascular (41). Otro estudio, realizado en adultos con EHGNA, quienes

consumieron por un año aceite de oliva suplementado con AG n-3 (EPA +DHA), encontró un efecto positivo sobre el hígado graso. Luego del tratamiento, los niveles de alanina amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST) y γ – glutamil transpeptidasa (GGT), disminuyeron significativamente, al igual que los TG, mientras que los niveles de HDL y adiponectina aumentaron (42).

El HT lo encontramos principalmente en el aceite de oliva extra virgen y se ha visto que es el compuesto antioxidante con mayor actividad a través de la eliminación de aniones súper óxido e inhibición de radicales derivados del ácido hipocloroso (43). Su absorción luego de la ingestión es dosis – dependiente y se ha visto que varía entre un 55 y 66% (39).

5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos

5.1 Hipótesis

La suplementación dietaria con ácido docosahexaenoico (DHA) e hidroxitirosol (HT) reduce el estrés oxidativo, inflamación y esteatosis hepática inducidos por dieta alta en grasa (DAG) en ratón.

5.2 Objetivo General

Determinar el efecto de la suplementación dietaria con DHA e HT en la reducción de la esteatosis hepática, inflamación y estrés oxidativo inducidos por DAG en ratón.

5.3 Objetivos Específicos

1. Determinar el grado de protección conferido por la suplementación dietaria con DHA e HT en ratones alimentados con dieta alta en grasa, sobre los siguientes parámetros:
 - a) Daño y esteatosis hepática, mediante evaluación histológica, determinación de marcadores plasmáticos de daño hepático: transaminasas, aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), y contenido lipídico y de triglicéridos (TG) hepáticos.
 - b) Respuesta inflamatoria a través de la determinación de los niveles séricos de los mediadores pro-inflamatorios: Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 1 β (IL-1 β).
 - c) Estrés oxidativo en tejido hepático a través de la capacidad antioxidante, relación glutatión reducido /glutatión oxidado (GSH/GSSG), super óxido dismutasa (SOD), carbonilación de proteínas, niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y F8-isoprostanos.
2. Evaluar el impacto de la suplementación dietaria con DHA e HT sobre el perfil de ácidos grasos (AG) hepáticos, considerando la relación entre n-6/n-3.

6. Metodología

6.1 Definición del diseño de la investigación

Estudio experimental, randomizado, controlado, prospectivo, en modelo animal.

6.2 Definición de la muestra

El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando el software nQuery Advisor. La variable crítica utilizada, fue el cambio en el contenido lipídico hepático (disminución del 50%), con una significancia estadística estimada de $p < 0,05$, con un poder de 0.9 y un margen de pérdida de animales del 10%. Considerando i) el análisis estadístico ii) el modelo experimental iii) el tipo de intervención (test ANOVA para muestras repetitivas). El tamaño muestral estimado fue 11 ratones por grupo, dando un total de 88 animales.

6.3 Protocolo de intervención

Ratones macho C57BL/6J serán obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Dichos animales de 21 días de edad luego del destete y con un peso inicial de entre 12 y 14 gramos, serán asignados aleatoriamente a cada uno de los 8 grupos experimentales ($n=11$ ratones por grupo), con acceso libre a dieta y agua, con control de la temperatura ambiente en un ciclo de luz – oscuridad de 12 horas cada uno, por un periodo de 12 semanas. Los animales pertenecientes a cada grupo, serán mantenidos en cajas separadas. Se trabajó con esta cepa de ratones dada su utilidad para el estudio de alteraciones metabólicas, seleccionando solo machos con el fin de evitar influencias hormonales que pudieran confundir los resultados del estudio.

Durante la intervención se evaluará la ingesta diaria de cada dieta y el aumento de peso de cada animal será medido semanalmente. Al final de la intervención se tomaran muestras de sangre y tejido hepático bajo anestesia (Isoflorano, Lunan Better Pharmaceutical Co., Ltd. Shandong, China) (**Anexo n°1**). 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 0667 FMUCH).

6.4 Grupos experimentales

Durante 12 semanas, los animales deberán seguir uno de los tratamientos expuestos en la siguiente tabla.

Tabla 1: Grupos experimentales según tratamiento.

| Grupo Experimental | Tratamiento |
|--------------------|--|
| Grupo 1 | Dieta Control (DC, 10%kcal como grasa) |
| Grupo 2 | DC + HT (5mg/kg/día) |
| Grupo 3 | DC + DHA (50mg/kg/día) |
| Grupo 4 | DC + HT (5mg/kg/día) + DHA (50mg/kg/día) |
| Grupo 5 | Dieta Alta en Grasa (DAG, 60%kcal como grasa) |
| Grupo 6 | DAG + HT (5mg/kg/día) |
| Grupo 7 | DAG + DHA (50mg/kg/día) |
| Grupo 8 | DAG + HT (5mg/kg/día) + DHA (50mg/kg/día) |

6.5 Dietas y suplementación

Dieta Control (DC): Certificada (Research Diet INC – D12450B) y estandarizada en micro y macronutrientes. Contiene 10% de las calorías a partir de grasas (**Anexo n°2 y n°3**).

Dieta alta en grasa (DAG): Certificada (Research Diet INC – D12492) y estandarizada en micro y macronutrientes. Contiene 60% de las calorías a partir de grasas (**Anexo n°2 y n°3**).

Hidroxitirosol (HT): Extracto de olivo. DSM Nutritional Products Company, Holanda. La dosis suplementación fue de 5mg/kg/día.

Ácido Docosahexaenoico (DHA): El DHA fue aportado a través de la suplementación con aceite (triglicéridos) de anchoveta (Golden Omega S.A. Santiago, Chile), procesado y concentrado con un alto contenido de DHA (68%). La dosis administrada fue de 50mg/kg/día (**Anexo n°4**).

6.6 Variables

6.6.1 Independientes

- Dieta
- Suplementación

6.6.2 Dependientes

- Variable dependiente crítica: cambio en el contenido lipídico hepático (reducción del 50%) evaluado a través de la variable grasa total en el hígado (g/100 g de hígado).
- Histología del hígado (cuantitativa y cualitativa).
- Grasa hepática total (g de grasa/100g de hígado).
- Perfil AG hepáticos (% de ésteres metílicos de AG (EMAG)).
- TG hepáticos (mg/g de hígado).
- Transaminasas (AST y ALT) (U/L).
- Capacidad antioxidante sérica (mM equivalentes Trolox).
- Glutación reducido (GSH) en hígado ($\mu\text{mol/g}$ de hígado).
- Glutación oxidado (GSSG) en hígado ($\mu\text{mol/g}$ de hígado).
- Razón GSH/GSSG.
- Super óxido dismutasa (SOD) (U/mg de proteínas).
- Proteínas carboniladas (mmol/ mg de proteína).
- TBARs séricos (malondialdehído (MDA) μM).
- F8-isoprostanos en hígado (pg/mg de hígado).
- TNF- α sérico (pg/ml).
- IL-6 sérica (pg/ml).
- IL-1 β sérica (pg/ml).

6.6.3 Descriptivas

- Peso corporal (g).
- Peso hígado (g).

- Peso tejido adiposo (g).
- Ingesta de alimento (g).
- Ingesta de energía (kcal).

6.7 Procedimientos y técnicas

6.7.1 Evaluación de la Esteatosis Hepática

Histología: Los cortes de hígado fueron lavados con agua destilada, sumergidos en alcohol 70° por 1 hora, luego en alcohol 95° por 2 horas para extraer el agua y finalmente en alcohol absoluto/silol (50:50), para sumergir las muestras en parafina líquida. Las muestras se dejan reposar por 24 horas en el refrigerador, para que así la parafina se solidifique y se puedan realizar los cortes y colocar en el porta objetos. Posteriormente los cortes se pasan por silol para retirar la parafina y luego en alcohol absoluto para retirar el silol. Finalmente los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para luego ser evaluados por microscopía óptica. Se realizó valoración cuantitativa y cualitativa de las muestras. Cuantitativamente se determinó la acumulación hepática de lípidos medida como % de células con infiltración de vesículas lipídicas. Cualitativamente la presencia de esteatosis se clasificó como micro o macrovascular y la inflamación como ausente, leve, moderada o severa (44).

Cuantificación grasa hepática total: Para medir la grasa hepática total, se utilizaron 200mg de hígado. La grasa fue extraída de las muestras de hígado de acuerdo a la técnica descrita por Bligh and Dyer (45) y cuantificada por determinación gravimétrica. Los valores fueron expresados como g de grasa/100g de hígado.

Cuantificación TG hepáticos: Para medir TG hepáticos, se pesaron 200mg de hígado que luego fue homogeneizado en un diluyente estándar junto con un inhibidor de proteasa. Los TG fueron determinados a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (Trygliceride Colorimetric Assay Kit – ítem No. 10010303). Los valores fueron expresados como mg/g de hígado.

Niveles séricos de transaminasas: Niveles de AST y ALT (UI/l), fueron medidos en suero con un kit específico (Biomerieux, Marcy). El ensayo enzimático se realizó a una temperatura estándar de 37°C, leyéndose la absorbancia 4 veces (90 segundos, 2:30 minutos, 3:30 minutos y 4:30 minutos). Los valores fueron expresados como U/L.

6.7.2 Evaluación Inflamación

Cuantificación de TNF- α : Los niveles de TNF- α fueron medidos en suero a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (TNF- α (mouse) ELISA kit – ítem No. 500850). Los valores fueron expresados como pg/ml de suero.

Cuantificación de IL-6: Los niveles de IL-6 fueron medidos en suero a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (Interleukin-6 (mouse) ELISA kit – ítem No. 583371). Los valores fueron expresados como pg/ml de suero.

Cuantificación de IL-1 β : Los niveles de IL-1 β fueron medidos en suero a través de un kit de ensayo enzimático ELISA (abcam – ítem ab100704). Los valores fueron expresados como pg/ml de suero.

6.7.3 Evaluación Estrés oxidativo

Cuantificación capacidad antioxidante sérica: La capacidad antioxidante del plasma fue medida a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (Antioxidant Assay Kit – ítem No. 709001). Los valores fueron expresados como mM equivalentes Trolox.

Cuantificación SOD: Los niveles de SOD fueron medidos en suero a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (Superoxide Dismutase Assay Kit – ítem No. 706002). Para esto se utilizaron 200mg de hígado homogenizados en una solución buffer HEPES. Los valores fueron expresados como U/mg de proteínas.

Cuantificación glutatión, glutatión oxidado y razón glutatión oxidado/glutatión: El glutatión y glutatión oxidado, serán medidos mediante el método de reciclaje enzimático (47). Los valores fueron expresados como $\mu\text{mol/g}$ de hígado.

Cuantificación proteínas carboniladas: Las proteínas carboniladas fueron medidas por espectrometría, según la técnica de Reznick y Packer (46). Para esto se utilizaron 100mg de hígado homogenizado en una solución buffer (50mM fosfato + 1mM EDTA), y se realizó un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (Protein Carbonyl Colorimetric assay Kit – ítem No. 10005020). Los valores fueron expresados como mmol de carbonilos proteicos/mg de proteína.

Cuantificación TBARS: Los niveles de TBARS fueron medidos en hígado a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (TBARS Assay Kit – ítem No. 10009055). Los valores fueron expresados como μM de MDA en suero y μM de MDA/mg de hígado.

Cuantificación F8-isoprostanos: Los niveles de F8-isoprostanos fueron medidos en hígado a través de un kit de ensayo enzimático Cayman Chemical Company (8 – Isoprostane ELISA Kit – ítem No. 516351). Los valores fueron expresados como pg/mg de hígado.

6.8 Análisis Estadístico

Los datos recopilados fueron registrados en planillas y analizados por el software Graph Pad Prism 5. Se excluyeron los datos que presentaron ± 2 desviaciones estándar (D.E) de la media. Los resultados fueron expresados como promedio \pm D.E. La evaluación de la distribución normal de los datos se realizó mediante el test Shapiro Wilk. La significancia estadística de las diferencias entre los grupos fueron determinadas por ANOVA two way (presentándose solamente los valores de los grupos con DAG), seguido del test de Bonferroni para ver específicamente entre que grupos se produjo dicha diferencia. Luego se realizó t student para comparar las medias del grupo DC con el grupo DAG + HT + DHA y ver si existían diferencias significativas. Finalmente, el análisis de los efectos netos se determinó por ANOVA one way. Un valor $p < 0.05$, fue considerado estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1 Efecto de las intervenciones en las características generales de los grupos experimentales

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

Al inicio del estudio, no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal de los grupos experimentales. Al finalizar la intervención, luego de 12 semanas, tanto el peso corporal como la ganancia de peso total, fueron mayores ($p<0.05$), en todos los grupos alimentados con DAG respecto de sus controles alimentados con DC (DC vs DAG; DC + HT vs DAG + HT; DC + DHA vs DAG + DHA; DC + HT + DHA vs DAG + HT + DHA). Al observar el peso del tejido adiposo luego de 12 semanas de suplementación, se ve un aumento significativo de todos los grupos alimentados con DAG respecto de sus controles, sin haber diferencias significativas entre los grupos con DAG. La relación peso tejido adiposo/peso final, mostró un aumento ($p<0.05$), para todos los grupos con DAG al compararlos con sus respectivos controles.

7.2 Efecto de las intervenciones en la ingesta de los grupos experimentales

La ingesta de los grupos experimentales se presenta en el **Anexo n°6**.

Respecto a la ingesta dietaria, se observó que el grupo con DC tuvo una ingesta dietaria mayor ($p<0.05$), respecto de DAG, mientras que entre los grupos alimentados con DAG, no se observaron diferencias significativas. Algo similar ocurre con la ingesta energética, en donde se vio que el grupo con DC tuvo una ingesta energética mayor ($p<0.05$), respecto de DAG, por otro lado DAG + DHA y DAG + HT + DHA, tuvieron una ingesta energética significativamente mayor que sus grupos controles. En la ingesta de lípidos como en la de hidratos de carbono (CHO), se observan diferencias significativas entre los grupos con DAG y su respectivo control, siendo mayor la ingesta de lípidos en los grupos alimentados con DAG, mientras que en los grupos con DC la ingesta de CHO es mayor.

7.3 Efecto de las intervenciones en los parámetros de esteatosis hepática

7.3.1 Análisis Histológico

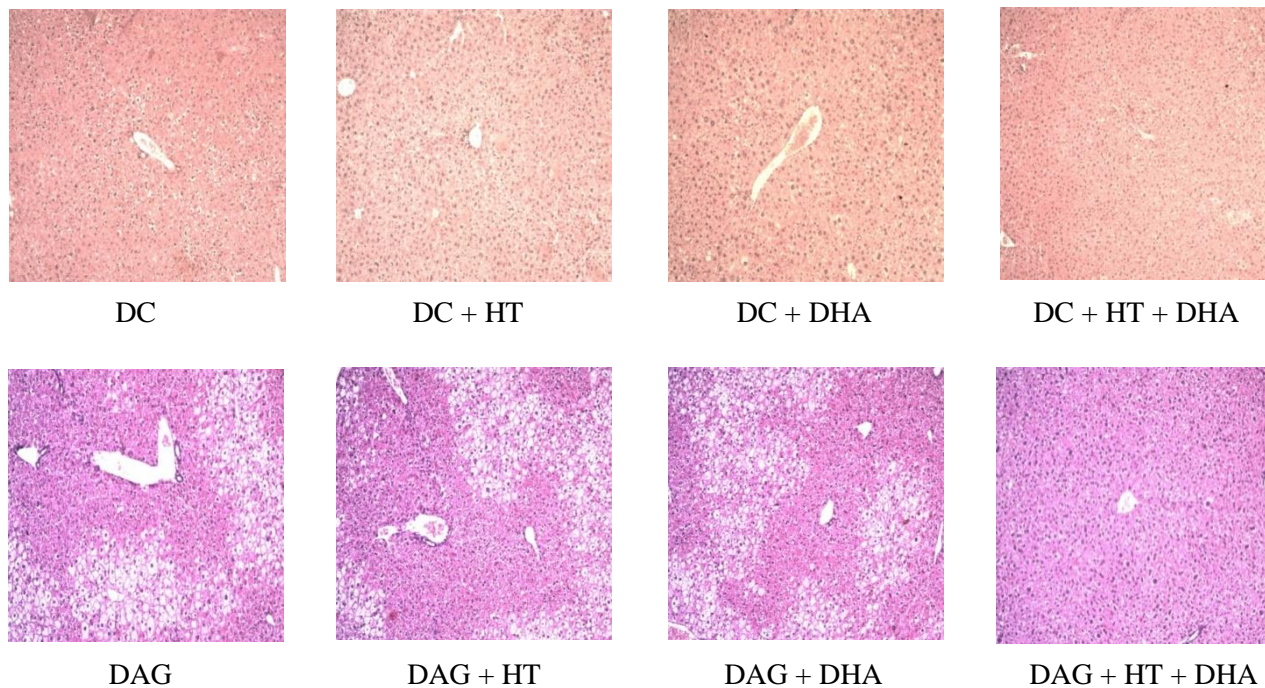


Figura 1. Microscopía de cortes de hígado de ratones. Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina.

El análisis de las placas histológicas hepáticas de los diferentes grupos experimentales se presenta en la **Figura 1**. Se puede observar que todos los grupos experimentales alimentados con DC, presentan una histo-arquitectura normal de las células hepáticas, en donde no se observa presencia de focos de esteatosis hepática, inflamación o necrosis. Por otro lado, la alimentación con DAG, durante 12 semanas, produjo una histo-arquitectura alterada, observándose importantes focos de esteatosis micro y macro vesicular superior al 60% de los campos estudiados. A pesar de que los grupos suplementados con HT y DHA, también presentaron una histo-arquitectura alterada, los focos de esteatosis micro y macro vascular fueron menores comparados con el grupo alimentado con DAG (50% y 40% de los campos estudiados respectivamente). El resultado más interesante, lo presentó el grupo con

suplementación mixta HT + DHA, en donde la presencia de focos de esteatosis hepática sólo abarca un 10% a 20% de los campos estudiados

7.3.2 Grasa Hepática Total

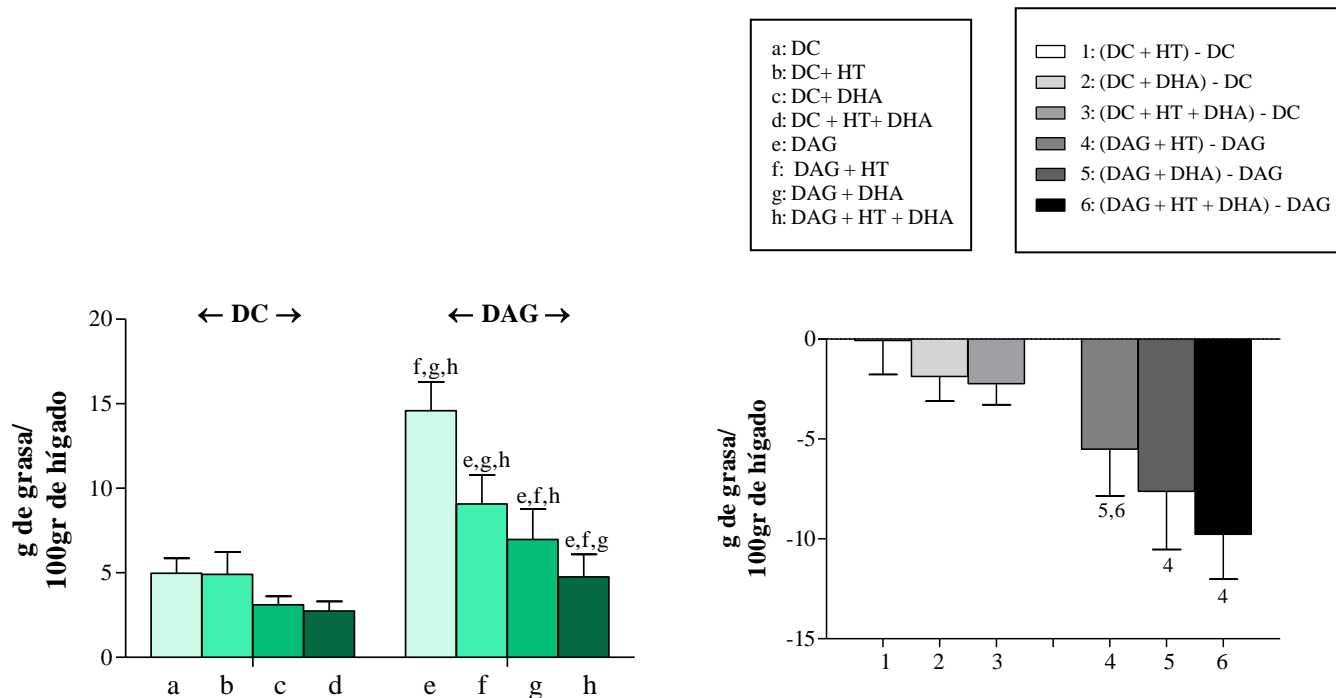


Figura 2. Contenido de grasa hepática total en los grupos experimentales. Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos DC y DAG + HT + DHA iii) Efectos Netos test Anova one way. Simbología ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT + DHA; ⁴ $p < 0.05$ con (DAG+HT)-DAG; ⁵ $p < 0.05$ con (DAG+DHA)-DAG; ⁶ $p < 0.05$ con (DAG+HT+DHA)-DAG.

Entre los grupos alimentados con DAG, el grupo con suplementación de HT + DHA, obtuvo valores significativamente menores de grasa hepática total (Figura 2), que el resto de los grupos experimentales alimentados con DAG. Al compararlo con el grupo alimentado solamente con DAG, se observó una disminución de un 67% de la grasa hepática, logrando una normalización de los valores, al compararlo con el grupo DC. Al observar los efectos netos, podemos ver que los grupos alimentados con DAG y suplementados con HT, DHA o HT + DHA, producen una disminución en la cantidad de grasa hepática, al compararlos con los grupos experimentales alimentados con DC.

7.3.3 TG Hepáticos

Se puede observar que el grupo alimentado con DAG, aumentó sus niveles de TG (Figura 3), en un 310% respecto del grupo control, mientras que el grupo DAG más suplementación mixta disminuyó los niveles de TG en un 58% respecto del grupo DAG, sin lograr una normalización de los valores respecto del grupo DC. Con respecto a los efectos netos se puede observar que en todos los grupos experimentales hubo una disminución significativa de los TG hepáticos, sin embargo, el grupo con suplementación conjunta de HT + DHA, fue el que presentó la disminución más significativa en los TG.

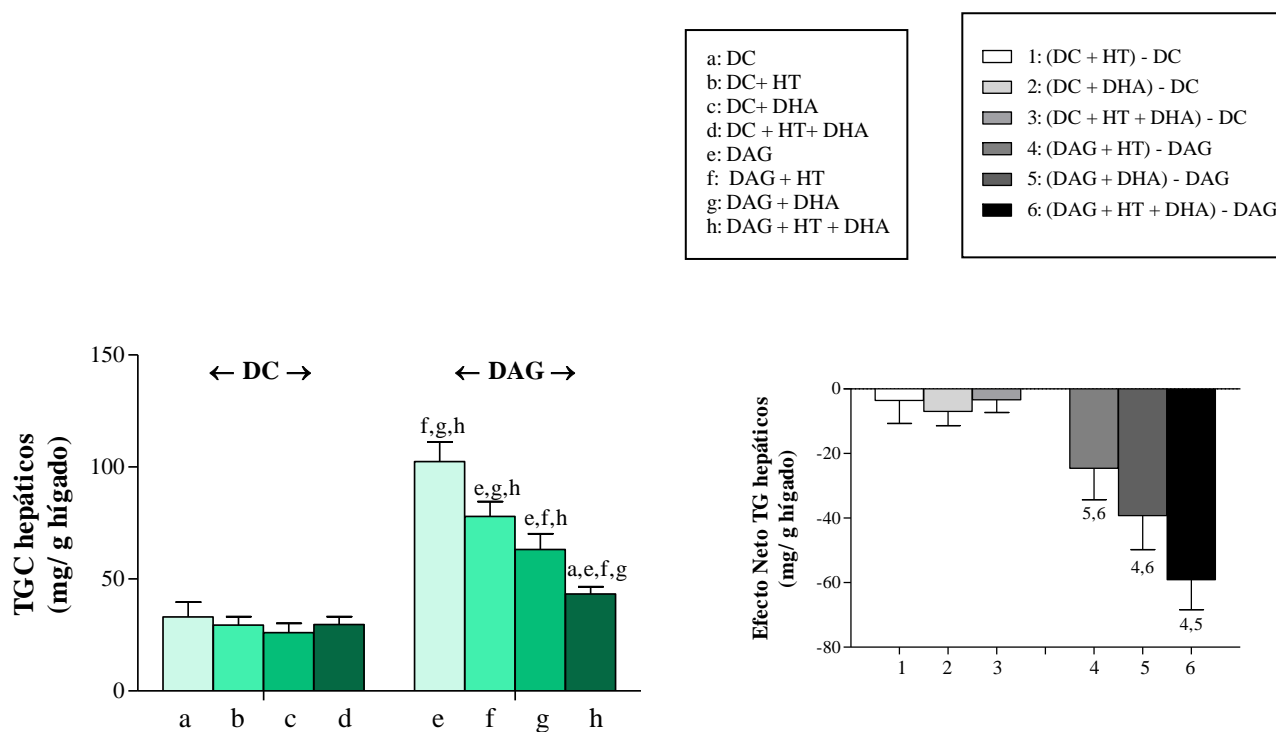


Figura 3. Contenido total de TG hepáticos en los grupos experimentales. Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos DC y DAG + HT + DHA iii) Efectos Netos test Anova one way. Simbología ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT + DHA; ⁴ $p < 0.05$ con (DAG+HT)-DAG; ⁵ $p < 0.05$ con (DAG+DHA)-DAG; ⁶ $p < 0.05$ con (DAG+HT+DHA)-DAG.

7.3.4 Transaminasas

Al observar los niveles de transaminasas (AST y ALT), se puede ver que no hubo diferencias significativas entre los grupos con DC ni entre los grupos con DAG (**Anexo n°7**).

7.4 Efecto de las intervenciones en los parámetros de inflamación

7.4.1 TNF- α , IL-6, IL-1 β

En los grupos alimentados solamente con DAG, los valores de TNF- α , IL-6 e IL-1 β aumentaron ($p < 0.05$) en un 222%, 168% y 382% respectivamente, en comparación a la DC. Entre los grupos con DAG, el grupo que recibió la suplementación mixta, presentó niveles de TNF- α , IL-6 e IL-1 β significativamente menores que el grupo que recibió solamente DAG. Los valores presentados por el grupo con suplementación mixta, fueron un 75% menor en el caso de TNF- α (**Figura 4A**), un 58% en el caso de IL-6 (**Figura 4B**) y un 73% en el caso de IL-1 β (**Figura 4C**), comparados con el grupo que recibió solamente DAG. Por lo tanto, el grupo con DAG y suplementado con HT + DHA, logró una normalización de todos los parámetros inflamatorios, sin presentar diferencias significativas con el grupo DC. Con respecto a los efectos netos, podemos observar que en todos los parámetros inflamatorios se vio una disminución significativa de las citoquinas inflamatorias tanto con la suplementación única de DHA o con la suplementación mixta, siendo mayor ($p < 0.05$), el efecto positivo sobre estos parámetros con la suplementación conjunta de DHA + HT.

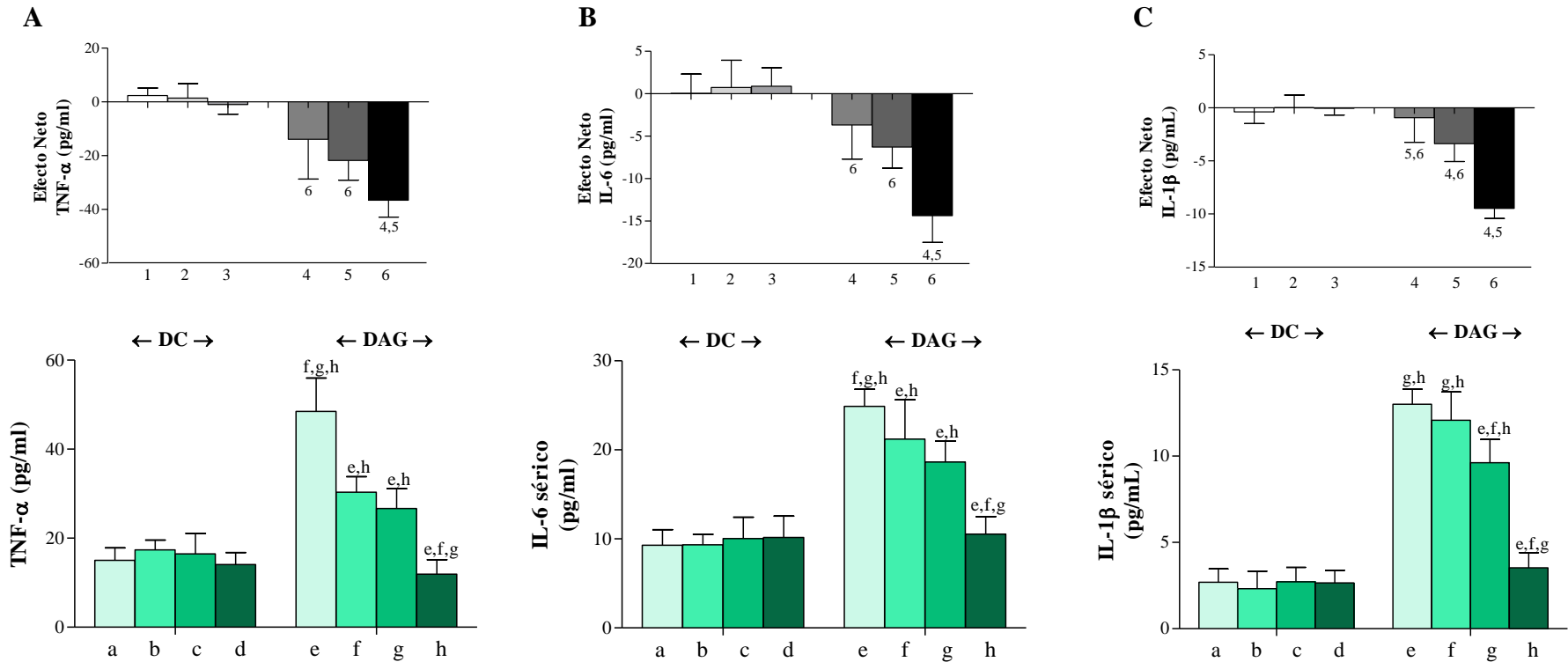
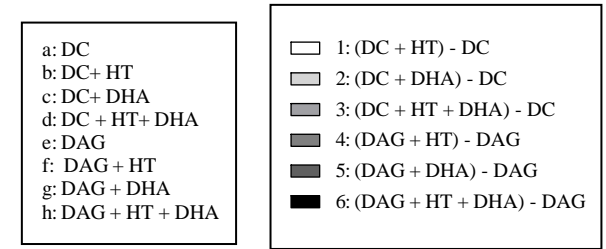


Figura 4. Niveles séricos de TNF - α (A), IL - 6 (B) e IL - 1 β (C) en los grupos experimentales. Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupo DC y DAG + HT + DHA iii) Efectos Netos test Anova one way. Simbología ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT + DHA; ⁴ $p < 0.05$ con (DAG+HT)-DAG; ⁵ $p < 0.05$ con (DAG+DHA)-DAG; ⁶ $p < 0.05$ con (DAG+HT+DHA)-DAG.

7.5 Efecto de las intervenciones en los parámetros de estrés oxidativo

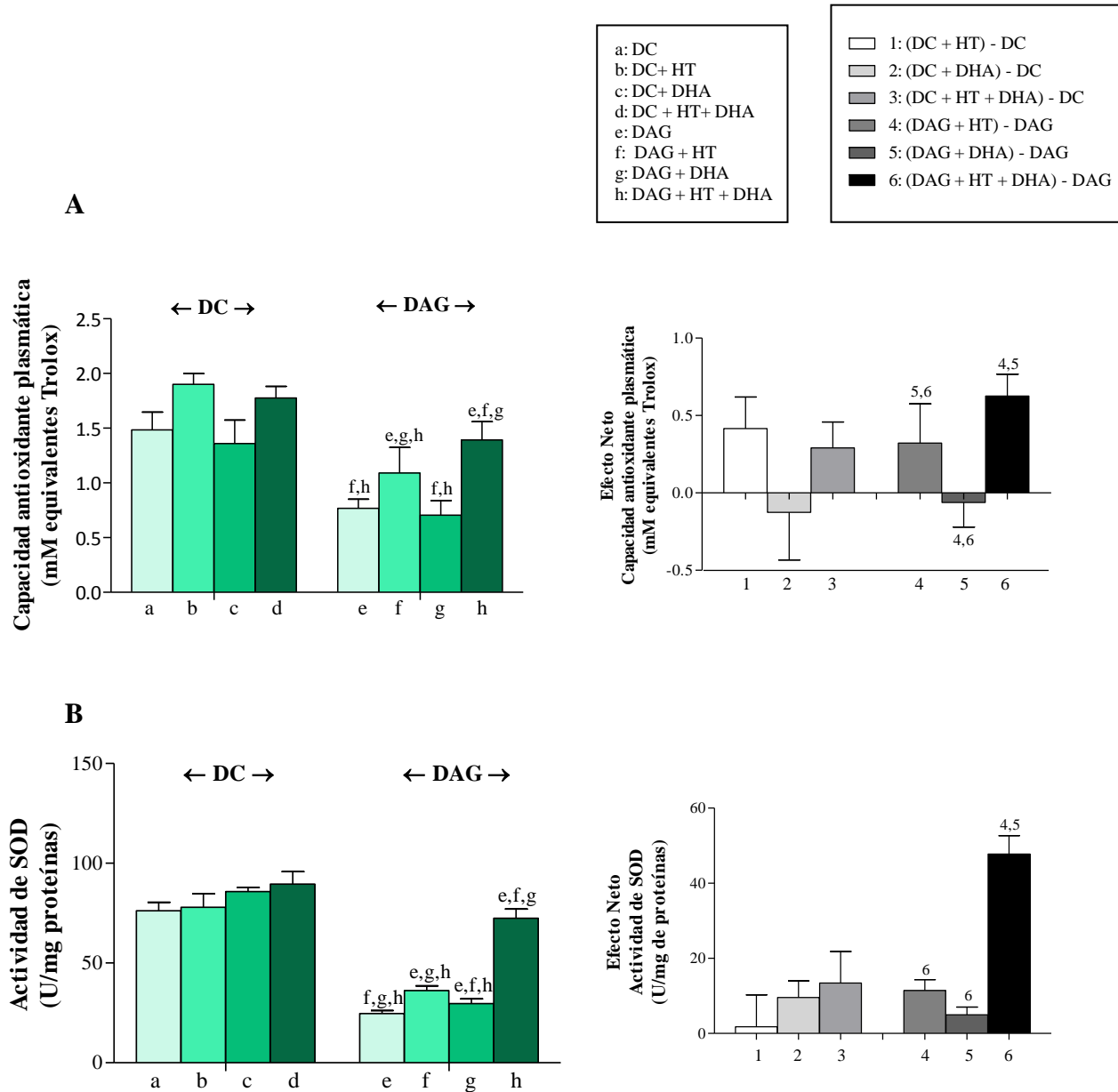


Figura 5. Capacidad antioxidante plasmática (A) y actividad de SOD (B) en los grupos experimentales. Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos DC y DAG + HT + DHA iii) Efectos Netos test Anova one way. Simbología ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT + DHA; ⁴ $p < 0.05$ con (DAG+HT)-DAG; ⁵ $p < 0.05$ con (DAG+DHA)-DAG; ⁶ $p < 0.05$ con (DAG+HT+DHA)-DAG.

7.5.1 Capacidad Antioxidante

Al observar los grupos alimentados con DAG, el grupo con suplementación mixta tuvo valores mayores ($p<0.05$), de capacidad antioxidante (**Figura 5A**), comparado con el resto de los grupos, aumentando en un 86% su capacidad antioxidante, al compararlo con el grupo DAG y logrando así, normalizar los valores de capacidad antioxidante respecto del grupo DC. Al observar los efectos netos, se puede ver que tanto la suplementación con HT, como con HT + DHA, produjeron un aumento significativo en la capacidad antioxidante plasmática, respecto de los grupos suplementados solamente con DHA.

7.5.2 SOD

Los grupos experimentales con DAG, presentaron diferencias entre sí, siendo el grupo DAG + HT + DHA el que presentó niveles significativamente mayores de SOD (Figura 5C), que el resto de los grupos, mostrando un aumento ($p<0.05$) de un 193% al compararlo con el grupo DAG sin suplementación, alcanzando una normalización de los valores al compararlo con el grupo DC. Como se esperaba, al observar los efectos netos, se ve que el grupo con DAG y suplementación mixta, fue el que produjo el efecto más notorio sobre la actividad de SOD, produciendo un incremento en sus niveles, significativamente superior que los otros grupos experimentales.

7.5.3 Glutación Hepático

En relación a los niveles hepáticos de glutatión total (**Figura 6A**), el grupo con DAG y suplementación conjunta de HT + DHA, mostró un aumento ($p<0.05$), de un 36% respecto del grupo solo con DAG, logrando una normalización de sus niveles respecto del grupo con DC. Para el GSH (**Figura 6B**), nuevamente entre los grupos con DAG, el grupo con suplementación mixta, alcanzó los mayores niveles, mostrando un aumento ($p<0.05$), de un 45% respecto del grupo solo con DAG, nuevamente, normalizando los niveles al compararlo con el grupo DC. Respecto GSSG (**Figura 6C**), entre los grupos alimentados con DAG, el grupo con DAG y sin suplementación, presentó mayores niveles ($p<0.05$), de GSSG que el resto de los grupos, siendo el grupo DAG + HT el que presentó los niveles

más bajos. Finalmente, al observar la razón GSH/GSSG (**Figura 6D**), el grupo que presentó la razón más elevada, fue DAG + HT, presentado diferencias ($p < 0.05$), con DAG y DAG + DHA. En el caso de DAG + HT, presentó un aumento de un 106% respecto al grupo con DAG y para DAG + HT + DHA, el aumento fue de un 100%, lográndose en ambos casos una normalización de la razón respecto de DC.

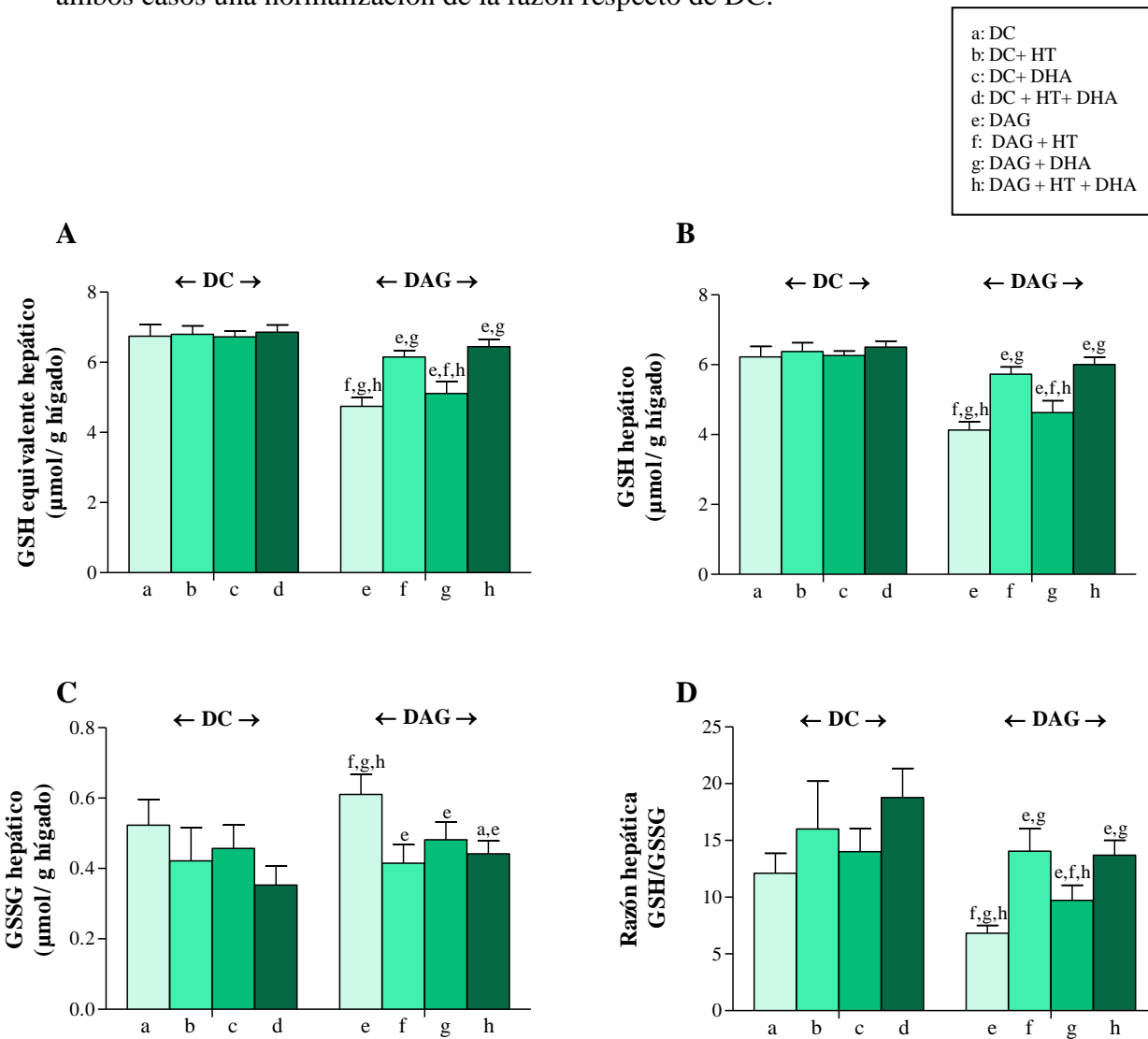


Figura 6. Glutación hepático total (A), GSH (B), GSSG (C), razón GSH/GSSG (D) en los grupos experimentales. Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos DC y DAG + HT + DHA iii) Efectos Netos test Anova one way. Simbología ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT + DHA;

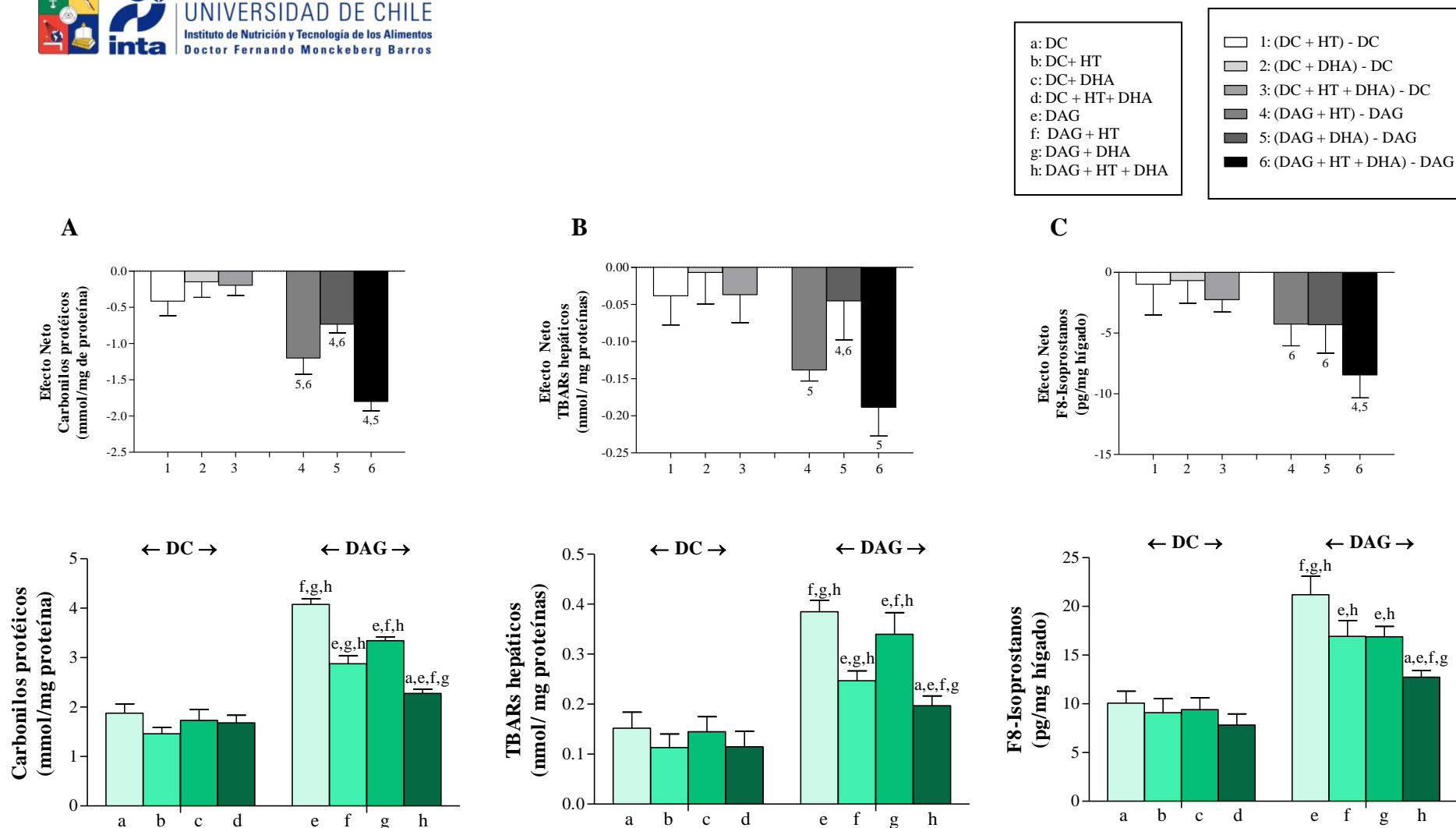


Figura 7. Niveles hepáticos de carbonilos protéicos (A), TBARs (B) y F8-isoprostanos (C) en los grupos experimentales. Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos DC y DAG + HT + DHA iii) Efectos Netos test Anova one way. Simbología ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT + DHA; ⁴ $p < 0.05$ con (DAG+HT)-DAG; ⁵ $p < 0.05$ con (DAG+DHA)-DAG; ⁶ $p < 0.05$ con (DAG+HT+DHA)-DAG.

7.5.4 Proteínas Carboniladas

En relación a las proteínas oxidadas (**Figura 5D**), el grupo con DAG y sin suplementación, presentó valores superiores ($p<0.05$) que el resto de los grupos, mientras que el grupo con DAG + HT, presentó niveles significativamente más bajos de carbonilos proteicos al compararlo con el grupo DAG + DHA, este efecto se vio potenciado en el grupo con suplementación mixta, el cual presentó niveles menores ($p<0.05$) comparado con el resto de los grupos alimentados con DAG; mostrando una disminución del 44% respecto del grupo solo con DAG, sin embargo, no se logró una normalización de los parámetros al compararlo con el grupo DC. Al observar los efectos netos, se ve que el grupo de DAG y suplementación conjunta logró una disminución significativamente mayor de los parámetros respecto al resto de los grupos con DAG.

7.5.5 TBARs

Entre los grupos alimentados con DAG, como se esperaba, tanto el grupo con DAG + HT, como el grupo con DAG + HT + DHA, presentaron niveles menores ($p<0.05$), de TBARs (**Figura 5E**), al compararlos con DAG y DAG + DHA. En el caso de DAG + HT, la reducción fue de un 36%, al compararlo con DAG y para el caso de DAG + HT + DHA, la reducción fue de un 49%, sin embargo, no se logró una normalización de los parámetros al compararlo con el grupo DC. Al observar los efectos netos, se puede ver que tanto el grupo DAG + HT como DAG + HT + DHA presentan un mayor efecto ($p<0.05$), en la disminución de los niveles de TBARs al compararlos con el grupo con DAG + DHA.

7.5.6 F8 - isoprostanos

Se puede observar que el grupo con DAG, presentó mayores niveles ($p<0.05$) de F8-isoprostanos (**Figura 5F**), que el resto de los grupos, mientras que el grupo con DAG y suplementación mixta, fue el que obtuvo una mayor reducción ($p<0.05$) de los niveles de F8 - isoprostanos, logrando disminuirlos en un 40% respecto de DAG, sin embargo, no se alcanzó lograr una normalización de los valores al compararlo con DC. Con respecto a los efectos netos, como se esperaba, el grupo experimental con DAG y suplementación

conjunta posee diferencias significativas con el resto de los grupos, siendo el que produce la mayor disminución en los niveles de F8-isoprostanos.

7.6 Efecto de las intervenciones en el perfil de ácidos grasos hepáticos

El análisis del perfil de los AG hepáticos totales más importantes en los grupos experimentales se presenta en la **Tabla n°2**.

Entre el total de ácidos grasos saturados (AGS), sólo se encontraron diferencias significativas entre el grupo de DAG + HT y los grupos DAG y DAG + HT + DHA, en donde estos presentaron niveles mayores ($p < 0.05$), de AGS. En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados (AGM), los grupos DC y DAG + HT, presentaron niveles significativamente mayores que el grupo con DAG y suplementación, lo que se ve también en los niveles del ácido oleico (18:1 n-9). Como se esperaba, al observar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los grupos alimentados con DAG + DHA y DAG + HT + DHA, muestran niveles superiores ($p < 0.05$) que el grupo suplementado con HT. Además el grupo con DAG y suplementación conjunta, también muestra niveles significativamente mayores que el grupo con DC. Al observar específicamente el DHA, se encontraron diferencias significativas entre los grupos DAG + DHA y DAG + HT + DHA versus DAG y DAG + HT, siendo estos últimos los que presentaban valores menores. El grupo con suplementación de DHA, aumentó ($p < 0.05$) en un 125% sus niveles de DHA respecto al grupo con DAG y el grupo con suplementación mixta, aumentó ($p < 0.05$) en un 85% sus niveles de DHA respecto al grupo DAG. Además DAG + HT + DHA presentó niveles significativamente mayores de DHA al compararlo con el grupo DC.

Finalmente, al observar la razón AGPI n-6/AGPI n-3, se puede ver que tanto la suplementación con DHA como la suplementación mixta, produjeron una disminución ($p < 0.05$) de la razón n-6/n-3, al compararlos con los grupos experimentales alimentados con DAG y DAG + HT. Además el grupo con DAG y suplementación mixta, logró una disminución significativa de la razón n-6/n-3 al compararlo con el grupo DC.

Tabla 2: Perfil de los AG hepáticos totales más importantes en los grupos experimentales.

| Ácidos Grasos | Grupos Experimentales | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | DC (a) | DC + HT (b) | DC + DHA (c) | DC + HT + DHA (d) | DAG (e) | DAG + HT (f) | DAG + DHA (g) | DAG + HT + DHA (h) |
| 16:0 | 24,4 ± 1,22 ^(h) | 24,67 ± 0,90 | 24,6 ± 1,96 | 25,0 ± 0,41 | 22,7 ± 0,97 | 22,7 ± 0,46 | 22,2 ± 0,60 | 22,9 ± 0,19 ^(a) |
| 18:1 | 39,9 ± 3,37 ^(h) | 30,8 ± 6,37 | 23,5 ± 2,26 | 20,6 ± 2,04 | 25,4 ± 3,74 | 27,6 ± 4,80 ^(h) | 24,9 ± 4,70 | 22,0 ± 5,94 ^(a, f) |
| 18:2 n-6, AL | 9,6 ± 1,35 ^(h) | 13,2 ± 1,85 | 13,1 ± 2,58 | 14,6 ± 0,20 | 21,2 ± 0,49 | 20,5 ± 1,66 | 21,1 ± 2,42 | 20,4 ± 1,34 ^(a) |
| 18:3 n-3, AAL | 0,3 ± 0,05 ^(h) | 0,7 ± 0,16 | 0,5 ± 0,12 | 0,6 ± 0,14 | 0,6 ± 0,06 | 0,8 ± 0,19 | 0,7 ± 0,09 | 0,7 ± 0,18 ^(a) |
| 20:4 n-6, ARA | 6,3 ± 1,12 | 5,3 ± 0,92 | 2,9 ± 0,36 | 2,5 ± 0,746 | 9,7 ± 1,87 ^(f, g, h) | 6,7 ± 2,82 ^(e, g) | 2,7 ± 0,39 ^(e, f, h) | 6,0 ± 0,94 ^(e, g) |
| 20:5 n-3, EPA | 0,2 ± 0,05 ^(h) | 2,1 ± 0,73 | 3,4 ± 0,67 | 3,5 ± 0,23 | 0,4 ± 0,06 ^(g, h) | 0,4 ± 0,06 ^(g, h) | 1,6 ± 0,33 ^(e, f) | 1,9 ± 0,55 ^(a, e, f) |
| 22:6 n-3, DHA | 4,7 ± 1,21 ^(h) | 9,2 ± 3,42 | 19,2 ± 2,09 | 22,2 ± 2,73 | 6,8 ± 1,01 ^(g, h) | 6,8 ± 2,81 ^(g, h) | 15,1 ± 2,85 ^(e, f) | 12,4 ± 3,48 ^(a, e, f) |
| Total AGS | 30,9 ± 1,14 | 31,1 ± 1,92 | 31,3 ± 2,29 | 32,1 ± 0,82 | 31,08 ± 1,54 ^(g) | 30,7 ± 1,49 | 28,9 ± 1,32 ^(d, h) | 31,7 ± 1,98 ^(g) |
| Total AGM | 45,7 ± 4,25 ^(h) | 36,3 ± 7,09 | 27,3 ± 2,44 | 24,1 ± 2,81 | 27,4 ± 4,18 | 29,9 ± 5,32 ^(h) | 26,7 ± 5,37 | 23,8 ± 6,65 ^(a, f) |
| Total AGPI | 23,2 ± 3,85 ^(h) | 32,5 ± 5,59 | 41,4 ± 1,99 | 44,4 ± 1,73 | 40,9 ± 1,73 | 39,1 ± 4,79 ^(g, h) | 44,2 ± 4,99 ^(f) | 44,4 ± 1,95 ^(a, f) |
| Total AGPI n-6 | 17,5 ± 2,63 ^(h) | 19,6 ± 1,77 | 17,2 ± 2,51 | 16,5 ± 1,68 | 32,7 ± 0,05 ^(f, g, h) | 28,7 ± 2,74 ^(e, g) | 25,7 ± 2,94 ^(e, f) | 27,7 ± 1,46 ^(a, e) |
| Total AGPI n-3 | 5,6 ± 1,39 ^(h) | 12,9 ± 4,15 | 24,2 ± 2,75 | 27,3 ± 2,52 | 8,3 ± 0,91 ^(g, h) | 10,4 ± 5,79 ^(g, h) | 18,6 ± 2,86 ^(e, f) | 16,7 ± 4,01 ^(a, e, f) |
| Razón AGPI n-6/ AGPI n-3 | 3,2 ± 0,31 ^(h) | 1,6 ± 0,35 | 0,7 ± 0,18 | 0,6 ± 0,10 | 4,0 ± 0,27 ^(g, h) | 3,6 ± 1,51 ^(g, h) | 1,4 ± 0,19 ^(e, f) | 1,6 ± 0,17 ^(a, e, f) |

Los valores se presentan como promedio ± D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos con DC vs DAG + HT + DHA. Simbología ^a: p<0.05 con DC; ^b: p<0.05 con DC + HT; ^c: p<0.05 con DC + DHA; ^d: p<0.05 con DC + HT + DHA; ^e: p<0.05 con DAG; ^f: p<0.05 con DAG + HT; ^g: p<0.05 con DAG + DHA; ^h: p<0.05 con DAG + HT + DHA. Ácidos grasos saturados (AGS) son: 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0 y 24:0. Ácidos grasos monoinsaturados (AGM) son: 14:1, 16:1, 18:1, 20:1 n-9, 22:1 n-9 y 24:1. Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son: 18:2 n-6 (ácido linoleico, AL), 18:3 n-6, 18:3 n-3 (ácido α-linolénico, AAL), 20:2 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6 (ácido araquidónico, ARA), 20:5 n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA), 22:5 n-3 (ácido docosapentaenoico, DPA) y 22:6 n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA).

8. Discusión

Efecto de las intervenciones en las características generales y dietarias de los grupos experimentales.

Respecto al peso de los animales, se observó que la suplementación conjunta de HT + DHA, no modificó el peso final ni la ganancia de peso de los animales alimentados con DAG, sin embargo al ver la ingesta de estos, se observa que el grupo alimentado con DAG y sin suplementación tuvo una menor ingesta al compararlo con el resto de los grupos alimentados con DAG (**Anexo n°6**), hallazgo coherente con estudios que indican que un aumento de las citoquinas pro inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β (**Figura 4**), podrían tener un efecto anorexígeno (48,49), siendo esta la razón por la que los animales alimentados con DAG al tener niveles mayores de citoquinas pro inflamatorias, tendrían una ingesta disminuida.

Efecto de las intervenciones en los parámetros de esteatosis hepática.

En este estudio, la alimentación con DAG por 12 semanas indujo un cuadro de esteatosis micro y macrovesicular (**Figura 1**), debido al desequilibrio en la disponibilidad de lípidos, ya sea por una mayor absorción desde la sangre, LDN y/o exceso de lípidos por una disminución en la oxidación de AG mitocondrial y peroxisomal y/o una menor exportación desde el hígado (33). La suplementación conjunta de HT + DHA, fue la que tuvo un mayor impacto en la reducción de la esteatosis hepática, al disminuir la grasa total acumulada en los hepatocitos (**Figura 2**), y los TG (**Figura 3**), este resultado concuerda con lo propuesto por Tapia y cols. (33), en donde se observa que la suplementación con AGPICL n-3, podría favorecer la oxidación de AG a través de PPAR- α y señalizaciones asociadas con (i) el aumento sustancial de la expresión de PPAR- α – mRNA sobre sus valores basales, (ii) la regulación de la expresión y liberación de la adiponectina, promoviendo la fosforilación de PPAR- α y sus genes diana de transcripción y (iii) una mayor disponibilidad de AGPICL n-3 en el hígado, activando PPAR- α y logrando así una recuperación de la vía de señalización luego de que esta disminuyera por la DAG, lo que coincide con otros estudios en donde concluyen que bajo condiciones fisiológicas, los AGPICL n-3 y/o sus metabolitos oxidados

regulan el metabolismo hepático actuando como (i) ligandos de PPAR- α , promoviendo así la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la oxidación de AG a nivel mitocondrial, peroxisomal y microsomal, sitios de unión a AG en las células y ensamblaje y transporte de lipoproteínas y (ii) reguladores de la expresión e inactivación (mediante PPAR- α), del factor de transcripción lipogénico conocido como proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBPs-1c) (50). Este factor de transcripción está encargado de regular la homeostasis lipídica, a través de la activación directa de la expresión de más de 30 genes relacionados con la síntesis y captación de colesterol, AG, TG y fosfolípidos, además, en el hígado existen 3 isoformas de SREBPs que regulan la producción de lípidos para exportar hacia el plasma como lipoproteínas y hacia la bilis como micelas (51). Por lo tanto, la depleción de AGPICL n-3 en el hígado de pacientes obesos con EHGNA podría favorecer la síntesis de AG y TG sobre la oxidación de AG, promoviendo así la esteatosis hepática (50). Dossi y cols. (52) realizaron un estudio con ratones C57BL/6J, en donde dividieron los animales en 2 grupos, el primero con DC y el segundo con DAG, luego de 12 semanas de alimentación, ambos grupos se subdividieron en 2, suplementándose con AGPICL n-3 (0.2 ml de aceite de pescado diario), un grupo DC y otro DAG. Este estudio demostró que la suplementación con AGPICL n-3 abolió el aumento de la tasa hepática de SREBP-1c/PPAR- α , logrando así un cambio en el estado metabólico del hígado, pasando de una condición pro lipogénica a una que favorece la oxidación de AG y atenúa la esteatosis hepática.

Por otro lado, Cao y cols. (53), concluyeron que el HT (10mg/kg/día) puede normalizar la obesidad, diabetes, dislipidemia, inflamación, hígado graso e IR inducida por DAG en ratas. Los mecanismos principales de estas observaciones incluyen la regulación de la vía SREBP-1c/FAS (ácido graso sintasa), reducción del EO, reducción de anormalidades mitocondriales y supresión de la apoptosis. Otro estudio de Assy y cols. (54), encontró que el aceite de oliva mejora la IR, aumenta la liberación de TG desde el hígado y disminuye el flujo de AGL libres desde el tejido adiposo periférico hacia el hígado. Debido a esto, la suplementación conjunta de DHA e HT podría tener un mayor efecto en lograr una prevención de la esteatosis hepática.

Con respecto a la hepatoprotección otorgada por la suplementación mixta en la DAG, estudios realizados en roedores en donde se indujo esteatosis hepática por DAG y se suplementó con AGPICL n-3 (8g/kg), han mostrado una disminución de la injuria hepática ocasionada por la dieta (55). Otro estudio realizado en personas con EHGNA, en donde se dio aceite de oliva enriquecido con AGPICL n-3 por un periodo de tiempo prolongado (12 meses), mostró una disminución de las enzimas hepáticas, nivel de TG en plasma y aumento de los niveles de adiponectina (42).

Otro factor muy importante que se ha estudiado recientemente, es el estrés de RE, este es un organelo muy importante presente en las células eucariotas, responsable de la síntesis de proteínas (transmembrana y secretoras), formación de lípidos y almacenamiento y homeostasis del calcio intracelular (Ca^{2+}). Existen factores intra y extracelulares que pueden perturbar la homeostasis de estas funciones en el RE, principalmente la homeostasis del Ca^{2+} y la síntesis de proteínas, produciéndose así el estrés de RE, lo que deriva en una acumulación de proteínas mal plegadas o mal formadas en el lumen del retículo (56,57). Otras causas de estrés de retículo incluyen la deprivación de glucosa y oxígeno, un aumento del óxido nítrico y radicales libres, cambios de pH y falla en la degradación de proteínas asociadas al RE. Para poder protegerse y combatir el estrés de RE, la célula evoca la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR), promoviendo así la expresión de proteínas chaperonas que ayudan en la plegación de proteínas. Sin embargo, si el estrés de RE es prolongado y hay una activación permanente de la UPR, las defensas de la célula se agotan, activándose vías pro apoptóticas que posteriormente eliminarán las células dañadas por el estrés de RE para asegurar la sobrevivencia del organelo; este sistema se denomina degradación de proteínas asociadas al RE (ERAD) (57,58). La UPR es mediada por la activación de 3 proteínas del RE: proteína quinasa RNA-activado (PKR) ER quinasa (PERK), inositol requirente de enzima 1α (IRE1 α) y factor activador de transcripción 6 (ATF-6). Estas proteínas son activadas por el estrés de RE para regular la transcripción de varios genes y así restaurar la homeostasis del retículo. Los sensores de UPR, normalmente se encuentran inactivados por la unión de una chaperona, la proteína inmunoglobulina (BiP) (58). Se ha visto que altas concentraciones de lípidos intracelulares como AGL, diglicéridos,

fosfolípidos y colesterol libre, son tóxicos y activan una serie de procesos celulares de estrés, incluyendo el estrés de RE. Estudios también han reportado que la UPR regula la lipogénesis, incluyendo el metabolismo del colesterol a través de la activación de SREBPs (1a y 1c), NF- κ B y a través de la disminución de la expresión de genes relacionados con la oxidación de AG y lipólisis (58). Por otro lado, el aumento en la acumulación hepática de AG de cadena corta y de citoquinas proinflamatorias en la EHNA también puede activar la UPR, lo que sugiere que la relación entre estrés de RE y metabolismo lipídico, podría ser bidireccional. En relación con esto, muchos estudios han demostrado que la activación de PERK, del factor de iniciación de la traducción eucariótica 2α (eIF2 α) y del factor de activación de transcripción 4 (ATF-4), aumentan la expresión de genes y enzimas pro lipogénicas como FAS, ATP citrato liasa, esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1), PPAR γ , SREBP 1c y acetil-CoA carboxilasa (ACC). En línea con esto, la activación de IRE1 α aumenta la expresión de reguladores clave de la transcripción como CCAAT/ proteínas de unión al potenciador β y γ (C/EBP β y C/EBP γ), y PPAR γ , además de enzimas relacionadas con la síntesis de TG. Finalmente, también se ha observado que la activación de ATF-6 disminuye la β -oxidación y la síntesis de VLDL. En conclusión, las proteínas mediadoras de la UPR pueden modular el metabolismo y la acumulación de lípidos en los hepatocitos (**Figura 8**) (58).

Este, podría ser uno de los mecanismos involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática (aumento de grasa total y TG hepáticos), inducida por DAG en los ratones.

En relación al nivel sérico de transaminasas (**Anexo n°7**), se encontró que tanto los grupos con DC como con DAG, no presentaron diferencias significativas en estos parámetros, lo que coincide con el estudio publicado por Browning y cols. (59), en donde se concluyó que los niveles séricos de ALT, proporcionan poco valor diagnóstico o de seguimiento, por lo que sería un marcador poco sensible tanto para EHGNA como para EHNA.

Efecto de las intervenciones en los parámetros de inflamación

Este estudio encontró que solo el grupo con DAG y suplementación mixta, logró normalizar los valores de citoquinas pro inflamatorias, tanto de TNF- α , como de IL-6 e IL-1 β (**Figura 4**), logrando equiparar sus valores con los del grupo con DC. Se ha visto que algunas citoquinas pro inflamatorias como TNF- α e IL-1 β y las EROs activan un factor de transcripción conocido como NF- κ B, el cual es crucial en una serie de procesos celulares como inflamación, inmunidad, proliferación celular y apoptosis (60). La activación hepática de este factor se ha observado en pacientes con EHNA y conduce a un aumento en la expresión de mediadores inflamatorios (**Figura 9**) (61). Por otro lado, se ha observado que a nivel nuclear, NF- κ B puede formar un heterodímero junto con PPAR- α , lo que lleva a la formación del complejo transcripcional inactivo p65-PPAR- α , dando como resultado la inactivación del factor de transcripción NF- κ B (51).

Las propiedades anti inflamatorias del DHA han sido estudiadas ampliamente y se ha visto que este AGPICL n-3, es capaz de sintetizar una serie de mediadores lipídicos endógenos. Estos derivados inmunoresolventes especializados, comprenden una serie de moléculas conocidas como resolvinas (resolvinas D1 y D6), protectinas (protectinas D1) y maresinas (maresinas 1) (62). Estos compuestos ejercen potentes acciones anti inflamatorias y resolutivas durante la inflamación crónica y aguda, ayudando a restaurar la homeostasis de los tejidos a través de la disminución de la agregación plaquetaria, atenuación en la señalización de NF- κ B y por ende en la producción de citoquinas proinflamatorias, reducción del TNF- α e interferón γ (IF- γ) y reducción en la trans migración de polimorfos nucleares (63,64).

Por otro lado, los efectos anti inflamatorios del HT, han sido demostrados en diversos estudios, en el estudio realizado por Urpi-Sarda y cols. (65), en donde se incorporó a la dieta habitual de un grupo de personas el aceite de oliva extra virgen, se observó que esta intervención tuvo efectos anti inflamatorios a través de la reducción plasmática del receptor de TNF, IL-6 y de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1). Estos resultados podrían atribuirse al HT, uno de los principales polifenoles presente en el aceite de oliva, el

cual podría ejercer un rol anti inflamatorio a través de la reducción de la activación de NF- κ B y su posterior traslocación al núcleo (66). Coherente con estos hallazgos, el estudio de Richard y cols. (67), observó que en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos, el HT inhibió la secreción de IL-1a, IL-1B, IL-6, IL-12 y TNF- α , avalando la teoría de que la inhibición de la actividad de NF- κ B podría reducir la producción de citoquinas inflamatorias fundamentales (**Figura 9**).

Nuevamente en este punto, es importante mencionar el estrés de RE, ya que se ha visto en diversos estudios que los mediadores de la inflamación como NF- κ B, quinasa c-Jun N-terminal (JNK), EROs, IL-6 y TNF- α , han sido asociados con la UPR. Cuando se gatilla el estrés de RE, IRE1 α conecta con el factor 2 asociado a receptor de TNF- α (TRAF2), formando un complejo y activando a NF- κ B y JNK, los que a su vez producen citoquinas pro inflamatorias (**Figura 8**) (58).

Estos planteamientos son coherentes con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la suplementación de DAG con HT + DHA, puede haber actuado, inhibiendo este factor de transcripción tan importante en la mediación de la inflamación, NF- κ B y así repercutir sobre los parámetros inflamatorios.

Efecto de las intervenciones en los parámetros de estrés oxidativo

Los resultados de este estudio, mostraron que la suplementación con HT produjo una mejora en las defensas antioxidantes, al observarse un aumento de la capacidad antioxidante plasmática (**Figura 5A**), un aumento de la actividad de SOD (**Figura 5B**), y un aumento en la razón GSH/GSSG (**Figura 6D**), además produjo una disminución en algunos parámetros de estrés oxidativo como carbonilos protéicos, TBARs y F8-isoprostanos (**Figura 7**). Estos hallazgos podrían explicarse debido a que el HT puede actuar como antioxidante a través de (i) la captación de radicales libres y ruptura de la cadena radical (ii) actuar como anti radicales de oxígeno y (iii) actuar como quelante de metales. Debido su estructura catecólica, es capaz de secuestrar los radicales peróxilo y romper las cadenas de reacciones peroxidativas, logrando producir sustancias muy estables

(68). En el estudio de Zhu y cols. (69), se demostró que el HT era capaz de activar el factor de transcripción nuclear eritrocitario 2 (Nrf2), el cual se activa cuando las células están sometidas a un ambiente de estrés oxidativo, la activación de este factor nuclear, induce la expresión de genes que codifican para el conjunto de enzimas de fase II de detoxificación (70) y de genes involucrados en las defensas anti oxidantes (**Figura 9**). Normalmente Nrf2 se encuentra inactivo en el citoplasma debido a la formación de un complejo con su inhibidor citosólico keap-1. Luego de la activación y liberación de este complejo, Nrf2 se transloca al núcleo, en donde se une a promotores que contienen elemento de respuesta antioxidantes, resultando en la activación de los genes respectivos de las enzimas de fase II de detoxificación. Estas enzimas incluyen principalmente: GSH, glutatión S-transferasa (GST), hemo oxigenasa 1 (HO-1), NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y ligasa glutamato-cisteína (GCL), las que aumentan su expresión, llevando a un aumento en los niveles de antioxidantes endógenos como el antioxidante endógeno principal (GSH) y quinonas reducidas. Es por esto que el HT podría conferir una protección antioxidante indirecta adicional además de sus propiedades antioxidantes directas (69). En el mismo estudio también se demostró que el HT podría estimular la biogénesis mitocondrial a través del aumento de la expresión del receptor coactivador de proliferación de los peroxisomas 1 α (PPARGC1 α), en línea con esto, se vio que el HT incrementó los niveles de proteínas de los complejos mitocondriales I, II, III y V. Además el HT regula la expresión génica de la proteína desacoplante 2 (UCP2), un factor mitocondrial controlado por PPARGC1 α , que participa en la mantención de los niveles aceptables de EROs y es neuroprotector durante la isquemia/reperfusión (71). Por lo que podría tener un rol fundamental en la prevención y corrección de la disfunción mitocondrial (70).

Por otro lado, la suplementación con DHA, mostró resultados contradictorios sobre los parámetros de estrés oxidativo ya que la capacidad antioxidante plasmática (**Figura 5A**), se vio disminuida en los animales con DAG y suplementación única de DHA, sin embargo la actividad de SOD (**Figura 5B**), y la razón GSH/GSSG (**Figura 6D**), aumentaron mientras que los niveles de carbonilos protéicos, TBARs y F8-isoprostanos (**Figura 7**), disminuyeron. Sobre esto, se han observado resultados muy controvertidos, el estudio de

Tsudoku y cols. (72), concluyó que la suplementación con AGPICL n-3 en ratones senescentes, produjo un aumento de los hidroperóxidos de fosfolípidos y TBARs en hígado y plasma, promoviendo el estrés oxidativo y disminuyendo la esperanza de vida de los animales; concordante con esto, el estudio de Mcanulty y cols. (73), realizado en adultos jóvenes ciclistas, observó un aumento de los F2-isoprostanos y ningún cambio en los parámetros plasmáticos de capacidad antioxidante. En contraste con estos hallazgos, el estudio de Zhang y cols. (74), demostró que la suplementación con AGPICL n-3 en ratones, tenía un rol neuroprotector durante la isquemia, a través de la oxidación de los AGPICL n-3, produciendo 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE), el cual regula la expresión de la HO-1 a través de la activación de Nrf2.

Los resultados obtenidos por la suplementación conjunta de HT + DHA sobre los parámetros de estrés oxidativo fueron los más significativos, siendo la suplementación que obtuvo los resultados más favorables; sobre los resultados logrados con suplementación única de DHA o HT. Con la suplementación mixta, se logró una normalización de los niveles de capacidad antioxidante (**Figura 5A**), actividad de SOD (**Figura 5B**), y niveles hepáticos de glutatión (**Figura 6**), al compararlos con el grupo con DC, sin embargo, los niveles de proteínas carboniladas, TBARs y F8-isoprostanos (**Figura 7**), a pesar de que disminuyeron en comparación al grupo solo con DAG, no lograron alcanzar los niveles del grupo con DC. El efecto de la suplementación mixta puede ser debido a un efecto sinérgico del HT y el DHA, además de que el HT al ser un potente antioxidante, evita la oxidación del DHA (75), logrando así que este pueda actuar correctamente.

El estrés de RE también juega un rol importante en la mediación del EO, a través de la UPR. Al activarse PERK, también induce mecanismos antioxidantes mediante la activación de Nrf2, el cual se encuentra altamente expresado en el hígado y su activación es dependiente de PERK (**Figura 8**). Bajo condiciones patológicas como la EHNA, la actividad de Nrf2 se ve alterada, llevando a disfunción mitocondrial y a un aumento de los niveles de AGL, resultando en el desarrollo de EHGNA y EHNA. Además, PERK también regula el aumento del factor de transcripción ATF-4, el cual ha sido relacionado con la mantención de GSH celular junto con Nrf2 (58).

En línea con lo expuesto anteriormente, estudios recientes, han demostrado que el DHA posee efectos neuroprotectores a través de la disminución del estrés de RE, el DHA podría reducir la expresión de 2 marcadores de estrés de RE, p-eIF2 α y ATF-4 además de reducir la muerte celular por isquemia (76).

Estos hallazgos, serían concordantes con los resultados obtenidos en este estudio, ya que el DHA podría disminuir el estrés de RE producido por la DAG y así influir en la atenuación de los parámetros de EO.

Una posible explicación del mal funcionamiento de algunas enzimas involucradas en la capacidad antioxidante del organismo, es que debido a la DAG y al aumento de los radicales libre y EO, ocurra estrés de RE, dando como resultado una síntesis de proteínas alterada, las cuales posteriormente no serán funcionales y llevarán a una desregulación de múltiples procesos fisiológicos. Específicamente, la actividad de SOD (**Figura 5B**), se vio muy disminuida con la DAG por lo explicado anteriormente, mientras que por el contrario, al observar la actividad de SOD en el grupo con DAG y suplementación conjunta de HT + DHA, se vio un aumento de esta, logrando una recuperación de los niveles al compararlo con el grupo DC, lo que podría explicarse debido al efecto del DHA sobre el estrés de RE y la ayuda de HT para evitar que el DHA se oxide y así pueda realizar sus funciones adecuadamente.

Otro hallazgo interesante, es en relación a los niveles hepáticos de TBARs (**Figura 7B**), ya que el grupo con DAG, presentó niveles superiores que el resto de los grupos con DAG y suplementación de HT, DHA o HT + DHA. Sin embargo, el grupo con suplementación exclusiva de DHA, mostro niveles superiores que el grupo con HT o HT + DHA, este hallazgo concuerda con resultados de diversos estudios, en donde se ha estudiado la variación en la lipoperoxidación producida por la suplementación con AGPICL n-3. En el estudio de Hyang y Miyasawa (77), se observó que el consumo de aceite de DHA (aportado como fosfolípidos, TG y dietil ester), resultó en un aumento de los hidroperóxidos de fosfolípidos y TBARs en plasma, hígado y membranas microsomaes. Esta elevada

peroxidación, se vio junto con un aumento de la incorporación de AG n-3 en los fosfolípidos y una disminución de los niveles de α -tocoferol.

Es importante destacar que en este estudio, a pesar de que la suplementación exclusiva con DHA, disminuyó los niveles hepáticos de proteínas carboniladas, TBARs y F8-isoprostanos respecto de la DAG, no logró atenuar los procesos de peroxidación lipídica al igual que la suplementación única de HT o la suplementación mixta.

Efecto de las intervenciones en el perfil de ácidos grasos hepáticos

Los resultados de este estudio, indican que la alimentación con DAG y sin suplementación, indujo un perfil de AGPICL con mayor contenido de ácido araquidónico (C20:4 n-6, ARA) y menor contenido de EPA y DHA, es decir mayor contenido de AGPICL n-6 que n-3 (**Tabla 2**). Además, todos los grupos con DAG, presentaron mayores niveles de ácido linoleico (AL) en comparación con los grupos con DC. Sin embargo, los grupos alimentados con DAG y suplementados con DHA o HT + DHA, presentaron niveles mayores de AGPICL n-3 (EPA y DHA) (**Tabla 2**). Estos resultados podrían deberse a que la DAG aporta mayor cantidad de AL que AAL, estos AG en el organismo van a producir AGPICL n-6 (ARA) y n-3 (EPA y DHA) respectivamente a través de una serie de reacciones que se llevan a cabo en el RE y constan de una serie de desaturaciones (insertar dobles enlaces entre las moléculas de carbono), elongaciones (adicionar 2 carbonos a la cadena hidrocarbonada de los AG) y retroconversión metabólica a través de β -oxidación (acortamiento de la cadena hidrocarbonada) en los peroxisomas (78). Las enzimas principales que participan en estas reacciones son la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa, las cuales se ha visto que tienen una actividad disminuida en pacientes con EHGNA (32), además estas enzimas participan tanto en la conversión de AL como de AAL, por lo que se produce una competencia entre los AG y al haber mayor cantidad de AL en la dieta, este tendería a tener una mayor conversión hacia sus derivados (78). En el estudio de Emken y cols. (79) se demostró que las dietas ricas en AL, reducen la conversión de AAL a sus derivados en un 40%, con una reducción neta de la acumulación de AGPICL n-3 de un 70%. Por otro lado, la suplementación con DHA o HT + DHA, presentó niveles hepáticos elevados de EPA y

DHA al compararlos con los grupos experimentales sin suplementación o con suplementación exclusiva de HT, esto se debe a que se administró DHA directamente vía oral. Este resultado concuerda con diversos estudios en los que se ha observado que la suplementación con DHA en pacientes con deficiencia de AGPICL n-3, resulta en un marcado aumento tanto de EPA como de DHA plasmático (80). Además se ha visto que la concentración de DHA en los fosfolípidos plasmáticos, es muy sensible a la ingesta dietaria de este AG a dosis que superen los 2g/día y que el contenido de EPA y DHA aumenta, mientras que el de ARA disminuye de manera dosis dependiente en cerebro, corazón e hígado de ratas, luego de una suplementación con DHA por 3 meses. El aumento del EPA, al suplementar DHA, es explicado por la retroconversión metabólica de DHA a EPA y DPA por β -oxidación (78).

Es importante destacar que a pesar de que el grupo con DAG + HT + DHA mostró niveles mayores de DHA al compararlo con el grupo con DAG sin suplementación, estos niveles fueron inferiores que el grupo con DC + HT + DHA (**Tabla 2**), esto podría ser explicado porque en el grupo con DAG y suplementación mixta, el hígado está utilizando el DHA para producir derivados bioactivos como método de protección contra la injuria inducida por la dieta.

Por último, es importante saber que un desbalance entre la razón n-6/n-3, en favor de los AGPICL n-6, es altamente pro trombótico y pro inflamatorio, lo que contribuye a la prevalencia de aterosclerosis, obesidad y diabetes; de hecho, un consumo regular de AGPICL n-3 en la dieta ha sido asociado con menor incidencia de estas enfermedades (81). Diversos estudios experimentales, han sugerido que los AG n-6 y n-3 podrían provocar diferentes efectos en la ganancia de grasa corporal a través de la adipogénesis, homeostasis lipídica, eje cerebro-intestino-tejido adiposo e inflamación sistémica. Los metabolitos del ARA juegan un rol importante en la diferenciación terminal de pre adipocitos a adipocitos maduros, este efecto puede ser inhibido por los AG n-3. AG n-6, aumentan el contenido de TG a través del incremento en la permeabilidad de la membrana, mientras que los AG n-3 disminuyen la deposición de grasa en el tejido adiposo a través de la supresión de enzimas lipogénicas y el aumento de la β -oxidación (81). Estudios en animales y humanos han

demostrado que la suplementación con EPA y DHA sería un factor protector contra la obesidad y podría producir una disminución en la ganancia de peso en animales y humanos obesos (82). Estos hallazgos, tendrían relación con los resultados obtenidos en este estudio, observándose que la disminución en la relación n-6/n-3 en el hígado en el grupo experimental con suplementación mixta respecto al grupo con DAG (**Tabla 2**), tendría una directa vinculación con un menor estado lipogénico a nivel hepático (19).

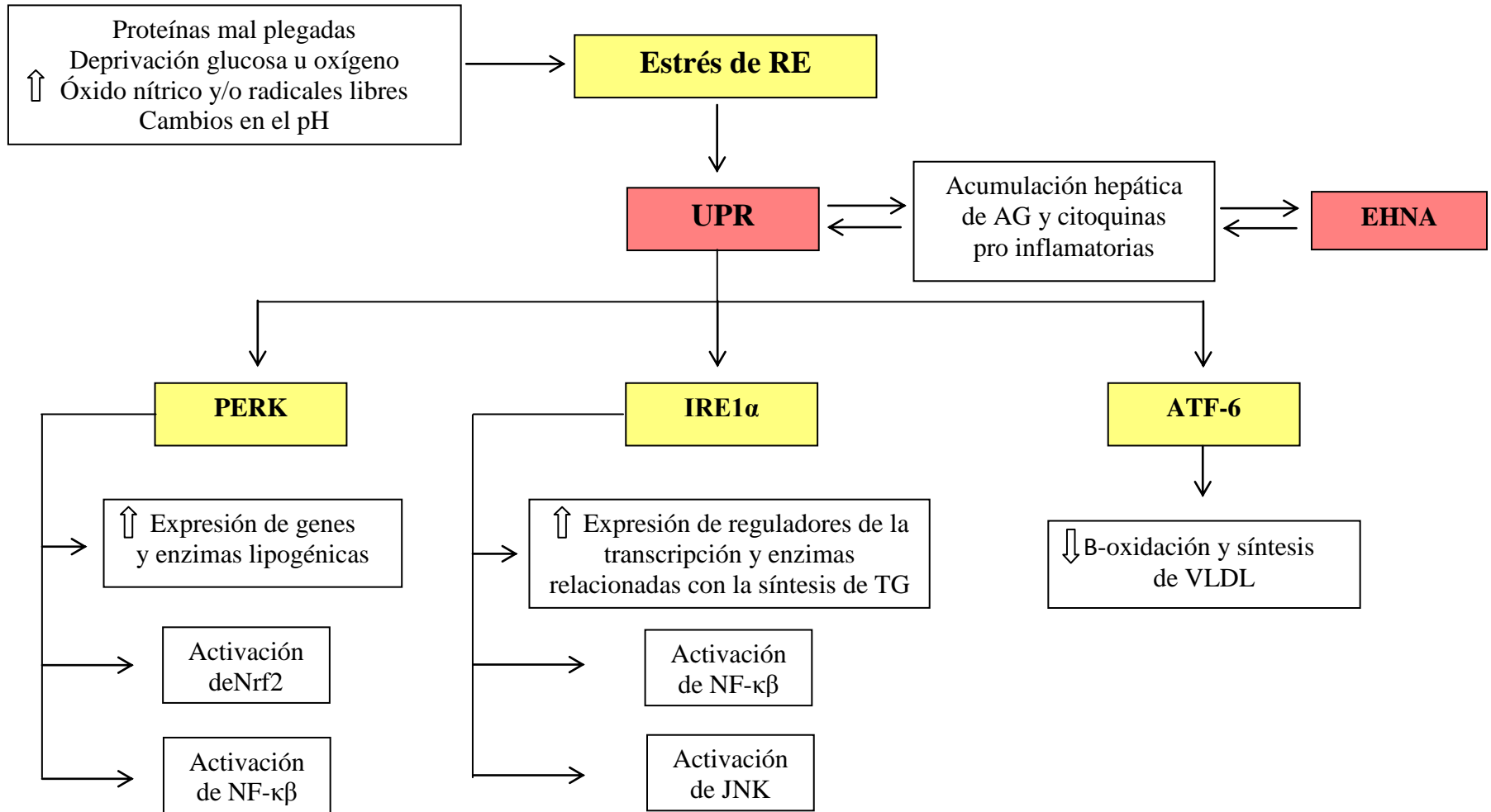


Figura 8. Mecanismos involucrados entre el estrés de RE y la esteatosis hepática.

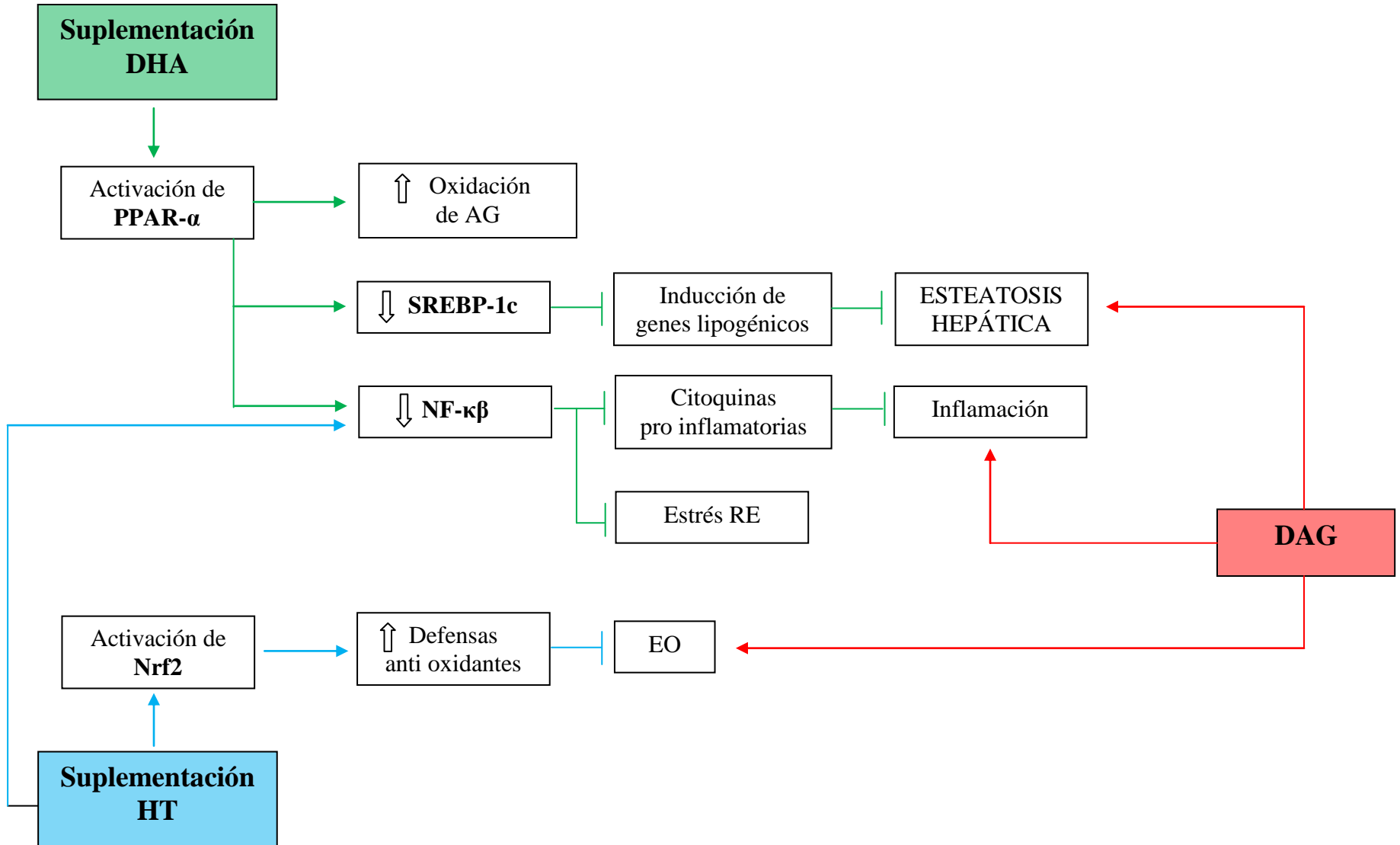


Figura 9. Mecanismos involucrados en el efecto hepatoprotector de la suplementación de HT y DHA frente a una DAG.

9. Conclusión

En esta investigación, se evaluó si la suplementación conjunta de HT y DHA, podría tener un mayor efecto hepatoprotector que la suplementación aislada de HT o DHA frente a una DAG en ratón, a través de la evaluación de parámetros de esteatosis hepática, inflamación y EO. La alimentación con DAG provocó el desarrollo de EHGNA en los animales de experimentación. Al respecto, se observó que la suplementación HT+DHA, logró (i) prevenir la esteatosis hepática, logrando normalizar sus valores respecto del grupo DC, lo que se vio reflejado por una menor cantidad de grasa total en hígado y por una disminución del total de TG hepáticos, (ii) disminución de la inflamación, a través de una disminución de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , lográndose una normalización de estos parámetros al compararlos con el grupo DC, (iii) aumento de la capacidad antioxidante del organismo, a través de un incremento en la capacidad antioxidante plasmática y razón GSH/GSSG, logrando nuevamente una normalización de los valores respecto del grupo con DC, (iv) disminución del estrés oxidativo, medido por formación de proteínas carboniladas, TBARs y F8-isoprostanos y (v) aumento de la relación AGPI n-3/n-6 en el perfil hepático de AG.

Todos estos resultados, proponen que la administración conjunta de HT y DHA podría ser una línea terapéutica considerada para una intervención clínico – nutricional para el manejo de la EHGNA y la prevención de su evaluación a ENHA en ratón. Es importante considerar que el siguiente paso a seguir, sería realizar estudios clínicos controlados en humanos para poder validar este tratamiento en pacientes con EHGNA.

10. Referencias

1. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:462–468.
2. 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.
3. Nseir W, Hellou E, Assy N. Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2014;20(28):9338–44.
4. Milić S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig. Dis.* 2012;30(2):158–62.
5. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 2006;44(4):865–73.
6. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *J. Hepatol.* 2010;53(4):713–8.
7. Hooper AJ, Adams L, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J. Lipid Res.* 2011;52(4):593–617.
8. Charlton MR, Burns JM, Pedersen R, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising R. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology.* 2011;141(4):1249–53.
9. Schreuder T, Verwer B, Nieuwkerk C, Mulder C. Nonalcoholic fatty liver disease: An overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J. Gastroenterol.* 2008;14(16):2474–2486.

10. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease A Feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes*. 2001;50:1844-50.
11. Kani H, Moayed S, Haghghatdoost F, Azadbakht L. Diet macronutrients composition in nonalcoholic Fatty liver disease: a review on the related documents. *Hepat. Mon.* 2014;14(2):1-9.
12. Day CP, James OF. Steatohepatitis: A Tale of Two “Hits”? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842–845.
13. Onyekwere CA, Ogbera AO, Samaila AA, Balogun BO, Abdulkareem FB. Nonalcoholic fatty liver disease : Synopsis of current developments. *Niger. J. Clin. Pract.* 2015;18(6):703–712.
14. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2010;103(2):71–83.
15. Araya J, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6 / n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci*. 2004;643:635–643.
16. Chan DC, Watts GF, Barrett PHR, Beilin LJ, Redgrave TG, Mori TA. Regulatory Effects of HMG CoA Reductase Inhibitor and Fish Oils on Apolipoprotein B-100 Kinetics in Insulin-Resistant Obese Male Subjects With Dyslipidemia. *Diabetes*. 2002;51(11):2377–86.
17. Meunier-durmort C, Poirier H, Niot I, Forest C, Besnard P. Up-regulation of the expression of the gene for liver fatty acid-binding protein by long-chain fatty acids. *Biochem. J*. 1996;487:483–487.
18. Videla L, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol. Med*. 2006;12:555–8.

19. Valenzuela R, Videla L a. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct.* 2011;2(11):644–8.
20. Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* 2009;116:539–64.
21. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol.* 2011;17:3377–89.
22. Russell FD, Bürgin-Maunders CS. Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Mar. Drugs.* 2012;10(11):2535–59.
23. Abedi E, Sahari MA. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* 2014;2(5):443–63.
24. Lassandro C, Banderali G, Radaelli G, Borghi E, Moretti F, Verduci E. Docosahexaenoic Acid Levels in Blood and Metabolic Syndrome in Obese Children: Is There a Link? *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(8):19989–20000.
25. Janssen CIF, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog. Lipid Res.* 2014;53:1–17.
26. Valenzuela R, Bascuñán K, Chamorro R, et al. Modification of Docosahexaenoic Acid Composition of Milk from Nursing Women Who Received Alpha Linolenic Acid from Chia Oil during Gestation and Nursing. *Nutrients.* 2015;7(8):6405–6424.
27. Gustafson KM, Colombo J, Carlson SE. Docosahexaenoic acid and cognitive function: Is the link mediated by the autonomic nervous system? *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids.* 2008;79(0):1–12.
28. Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 1999;40(3):211-225.

29. Serhan C, Chiang N, Van Dyke T. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(5):349–361.
30. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac R, Serhan CN. Novel Docosatrienes and 17 S -Resolvins Generated from Docosahexaenoic Acid in Murine Brain, Human Blood , and Glial Cells. *J. Biol. Chem.* 2003;278(17):14677–14687.
31. Gentile C, Pagliassotti M. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Nutr. Biochem.* 2009;19:567–576.
32. Araya J, Rodrigo R, Pettinelli P, Araya a V, Poniachik J, Videla L a. Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients. *Obesity.* 2010;18(7):1460–1463.
33. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- α upregulation and NF- κ B DNA binding abrogation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58(6):1333–1341.
34. Valenzuela R, Espinosa A, Llanos P, et al. Anti-steatotic effects of an n-3 LCPUFA and extra virgin olive oil mixture in the liver of mice subjected to high-fat diet. *Food Funct.* 2016;7(1):140–150.
35. Cheng Z, Schmelz EM, Liu D, Hulver MW. Targeting mitochondrial alterations to prevent type 2 diabetes--evidence from studies of dietary redox-active compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58(8):1739–1749.
36. López de las Hazas MC, Rubió L, Kotronoulas A, de la Torre R, Solà R, Motilva MJ. Dose effect on the uptake and accumulation of hydroxytyrosol and its metabolites in target tissues in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015;59(7):1395–1399.

37. Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;660(23):275–282.
38. Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, et al. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J. Nutr. Biochem.* 2013;24(12):2152–2157.
39. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11(2):458–479.
40. Gimeno E, de la Torre-Carbot K, Lamuela-Raventós RM, et al. Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *Br. J. Nutr.* 2007;98(6):1243–1250.
41. De Bock M, Derraik JGB, Brennan CM, et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One.* 2013;8(3):1-8.
42. Sofi F, Giangrandi I, Cesari F, et al. Effects of a 1-year dietary intervention with n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched olive oil on non-alcoholic fatty liver disease patients: a preliminary study. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2010;61(8):792–802.
43. Bendini A, Cerretani L, Carrasco-pancorbo A, et al. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules.* 2007;12:1679–1719.
44. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM Di, Neuschwander-tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. *Am. J. Gastroenterol.* 1999;94:2467-74.

45. Bligh, E. Dyer W. A Rapid Method Of Total Lipid Extraction And Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37(8):911–7.
46. Reznick A, Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectro photometric Method for Carbonyl Assay. *Methods Enzymol.* 1994;233(1991):357–363.
47. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006;1(6):3159–65.
48. Chida D, Osaka T, Hashimoto O, Iwakura Y. Combined Interleukin-6 and Interleukin-1 Deficiency Causes Obesity in Young Mice. *Diabetes.* 2006;55:971–7.
49. Fonseka TM, Müller DJ, Kennedy SH. Inflammatory Cytokines and Antipsychotic-Induced Weight Gain: Review and Clinical Implications. *Mol. neuropsychiatry.* 2016 2(1):1–14.
50. Videla L, Pettinelli P. Misregulation of PPAR Functioning and Its Pathogenic Consequences Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Human Obesity. *PPAR Res.* 2012;2012:1–14.
51. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Crit. Rev.* 2002;109(9):1125–1131.
52. Dossi CG, Tapia GS, Espinosa A, Videla L, D’Espessailles A. Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR- α and SREBP-1c. *J. Nutr. Biochem.* 2014;25(9):977–984.
53. Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, et al. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic. Biol. Med. Elsevier;* 2013;67(2014):396–407.
54. Assy N. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2009;15(15):1809–1815.

55. Soni NK, Nookaew I, Sandberg A-S, Gabrielsson BG. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis. Lipids in Health and Disease*. 2015;14(74):1–13.
56. Yin Y, Sun G, Li E, Kiselyov K, Sun D. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing Res*. 2016;16:1–12.
57. Begum G, Harvey L, Dixon E, Sun D. ER stress and effects of DHA as an ER stress inhibitor. *Transl. Stroke Res*. 2014;4(6):1–13.
58. Bozaykut P, Sahin A, Karademir B, Ozer NK. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis. *Mech. Ageing Dev*. 2016;157:17–29.
59. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387–1395.
60. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by Reactive Oxygen Species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1493-1505.
61. Videla L a, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli P, Haim D, Santibañez C, et al. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity*. 2009;17(5):973–979.
62. Qu Q, Xuan W, Fan G-H. Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. *Cell Biol. Int*. 2015;39(1):3–22.
63. Martínez-fernández L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martínez JA, Moreno-aliaga MJ. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121:24–41.
64. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013;63(1):149–64.

65. Urpi-sarda M, Casas R, Chiva-blanch G, Sau E, Andres-lacueva C, Llorach R, et al. The Mediterranean Diet Pattern and Its Main Components Are Associated with Lower Plasma Concentrations of Tumor Necrosis Factor Receptor 60 in Patients at High Risk for Cardiovascular Disease. *J. Nutr.* 2012;142(6):1019–1025.
66. Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today.* 2014;19(4):373–378.
67. Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol Is the Major Anti-Inflammatory Compound in Aqueous Olive Extracts and Impairs Cytokine and Chemokine Production in Macrophages. *Planta Med.* 2011;77(17):1890–1897.
68. Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J. Transl. Med.* 2014;12(219):1–9.
69. Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X, et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J. Nutr. Biochem.* 2010;21(11):1089–1098.
70. Dinkova-kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *PNAS.* 2002;99(18):11908–11913.
71. Bouillaud F. UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(5):377–383.

72. Tsuduki T, Honma T, Nakagawa K, Ikeda I, Miyazawa T. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition*. 2011;27(3):334–337.
73. McAnulty SR, Nieman DC, Fox-Rabinovich M, Duran V, McAnulty LS, Henson D a, et al. Effect of n-3 fatty acids and antioxidants on oxidative stress after exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2010;42(9):1704–1711.
74. Zhang M, Wang S, Mao L, Leak RK, Shi Y, Zhang W, et al. Omega-3 fatty acids protect the brain against ischemic injury by activating Nrf2 and upregulating heme oxygenase 1. *J. Neurosci.* 2014;34(5):1903–1915.
75. Lee YY, Crauste C, Wang H, Leung HH, Vercauteren J, Galano JM, et al. Extra Virgin Olive Oil Reduced Polyunsaturated Fatty Acid and Cholesterol Oxidation in Rodent Liver: Is This Accounted for Hydroxytyrosol-Fatty Acid Conjugation? *Chem. Res. Toxicol.* 2016:A–J.
76. Begum G, Kintner D, Liu Y, Cramer S, Sun D. DHA inhibits ER Ca^{2+} release and ER stress in astrocytes following in vitro ischemia. *J. Neurochem.* 2013;120(4):622–630.
77. Song JH, Miyazawa T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis*. 2001;155:9–18.
78. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;83:1467–1476.
79. Emken E a., Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994;1213(3):277–288.
80. Bjerve KS, Mostad IL, Thoresen L. Alpha-linolenic acid deficiency in patients on long-term gastric-tube feeding: Estimation of linolenic acid and long-chain unsaturated n-3 fatty acid requirement in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987;45:66–77.

81. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6 / Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016;8(128):1–17.

82. Buckley JD, Howe PRC. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obes. Rev.* 2009;10(6):648–59.

11. Anexos

Anexo n°1: Mediciones según tipo de muestra.

| | Medición | Cantidad de muestra |
|---------------|-----------------------------|---------------------|
| Suero | Capacidad antioxidante | 10µl |
| | TNF- α | 100µl |
| | IL-6 | |
| | IL-1 β | |
| | Transaminasas | 50µl |
| Hígado | Histología | 150mg |
| | Grasa hepática total | 200mg |
| | TG hepáticos | |
| | Perfil AG hepáticos totales | |
| | SOD | |
| | Glutación | 50mg |
| | F8-isoprostanos | 100mg |
| | TBARs | 25mg |
| | Proteínas carboniladas | 100mg |

Anexo n°2: Aporte nutricional y composición de la dieta control y la dieta alta en grasa.

| Macronutrientes | Dieta Control (DC) | | Dieta Alta en Grasa (DAG) | |
|----------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| | % g totales | % kcal totales | % g totales | % kcal totales |
| Proteínas | 19.2 | 20 | 26.2 | 20 |
| Hidratos de Carbono | 67.3 | 70 | 26.3 | 20 |
| Lípidos | 4.3 | 10 | 34.9 | 60 |
| Total | | 100 | | 100 |
| Kcal/g | 3.85 | | 5.24 | |
| Ingredientes | g | kcal | g | kcal |
| Caseína | 200 | 800 | 200 | 800 |
| L – Cistina | 3 | 12 | 3 | 12 |
| Maicena | 315 | 1260 | 0 | 0 |
| Maltodextrina | 35 | 140 | 125 | 500 |
| Sacarosa | 350 | 1400 | 68.8 | 275.2 |
| 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 |
| Tartacina | 0.05 | 0 | 0.05 | 0 |
| Total | 1055.05 | 4057 | 773.85 | 4057 |

Anexo n°3: Perfil de ácidos grasos totales de la dieta control y la dieta alta en grasa.

| Perfil de Ácidos Grasos | | | | |
|---|----------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | Dieta Control | | Dieta Alta en Grasa | |
| | % EMAG | g/100g de dieta | % EMAG | g/100g de dieta |
| Ácidos Grasos Saturados | | | | |
| C10:0 Ácido Decanoico | 0.000 | 0.000 | 0.077 | 0.024 |
| C12:0 Ácido dodecanoico | 0.159 | 0.006 | 0.100 | 0.031 |
| C14:0 Ácido Tetradecanoico | 0.896 | 0.035 | 1.221 | 0.376 |
| C16:0 Ácido Palmítico | 16.429 | 0.635 | 21.005 | 6.471 |
| C18:0 Ácido Estearico | 8.193 | 0.317 | 11.915 | 3.671 |
| C20:0 Ácido Eicosanoico | 0.299 | 0.012 | 0.216 | 0.067 |
| C22:0 Ácido Docosanoico | 0.256 | 0.010 | 0.050 | 0.015 |
| C24:0 Ácido Tetracosanoico | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Total Ac. Grasos Saturados | 26.232 | 1.014 | 34.584 | 10.654 |
| Ácidos Grasos Monoinsaturados | | | | |
| C14:1 Ácido Tetradecenico | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C16:1 Ácido Palmitoléico | 0.789 | 0.031 | 1.471 | 0.453 |
| C18:1 Ácido Oléico | 29.616 | 1.145 | 36.476 | 11.238 |
| C20:1 n9 Ácido Eicosaenoico | 0.405 | 0.016 | 0.598 | 0.184 |
| C22:1 n9 Ácido Erúico | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C24:1 Ácido Tetracosanoico | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Total Ac. Grasos Monoinsaturados | 30.810 | 1.191 | 38.545 | 11.875 |
| Ácidos Grasos Poliinsaturados | | | | |
| C18:2 n-6 Ácido Linoléico | 38.172 | 1.476 | 28.830 | 7.341 |
| C18:3 n-6 Ácido γ – Linolénico | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C18:3 n-3 Ácido α – Linolénico | 4.331 | 0.167 | 1.761 | 0.543 |
| C20:2 n-6 Ácido Eicosadienoico | 0.341 | 0.013 | 0.698 | 0.215 |

| | | | | | |
|---|-------------------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| C20:3 n-6 | Ácido Di-homo- γ -Linolénico | 0.000 | 0.000 | 0.091 | 0.028 |
| C20:3 n-3 | Ácido 11, 14, 17 Eicosatrienónico | 0.000 | 0.000 | 0.125 | 0.038 |
| C20:4 n-6 | Ácido Eicosatetraenónico | 0.113 | 0.004 | 0.216 | 0.067 |
| C20:5 n-3 | Ácido Eicosapentaenónico (EPA) | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| C22:5 n-3 | Ácido Dososapentaenónico | 0.000 | 0.000 | 0.066 | 0.020 |
| C22:6 n-3 | Ácido Docosaheptaenónico (DHA) | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Total Ac. Grasos Poliinsaturados | | 42.957 | 1.661 | 26.788 | 8.253 |

Anexo n°4: Perfil ácidos grasos totales del DHA.

| Perfil de ácidos grasos | | |
|---|---------------|---------------|
| | % EMAG | g/100g |
| Ácidos Grasos Saturados | | |
| C10:0 Ácido Decanóico | 0.000 | 0.000 |
| C12:0 Ácido dodecanóico | 0.000 | 0.000 |
| C14:0 Ácido Tetradecanóico | 0.241 | 0.198 |
| C16:0 Ácido Palmítico | 0.272 | 0.222 |
| C18:0 Ácido Esteárico | 5.422 | 4.442 |
| C20:0 Ácido Eicosanóico | 0.450 | 0.369 |
| C22:0 Ácido Docosanóico | 0.220 | 0.180 |
| C24:0 Ácido Tetracosanóico | 0.000 | 0.000 |
| Total Ac. Grasos Saturados | 6.606 | 5.412 |
| Ácidos Grasos Monoinsaturados | | |
| C14:1 Ácido Tetradecenóico | 0.000 | 0.000 |
| C16:1 Ácido Palmitoléico | 1.049 | 0.693 |
| C18:1 Ácido Oléico | 1.403 | 0.927 |
| C20:1 n9 Ácido Eicosaenóico | 1.829 | 1.209 |
| C22:1 n9 Ácido Erúcico | 1.076 | 0.711 |
| C24:1 Ácido Tetracosaeenóico | 3.476 | 2.298 |
| Total Ac. Grasos Monoinsaturados | 8.833 | 5.838 |
| Ácidos Grasos Poliinsaturados | | |
| C18:2 n-6 Ácido Linoléico | 0.150 | 0.099 |
| C18:3 n-6 Ácido γ – Linolénico | 0.000 | 0.000 |
| C18:3 n-3 Ácido α – Linolénico | 0.156 | 0.103 |
| C20:2 n-6 Ácido Eicosadienóico | 0.258 | 0.171 |
| C20:3 n-6 Ácido Di-homo- γ -Linolénico | 0.145 | 0.096 |
| C20:3 n-3 Ácido 11, 14, 17 Eicosatrienóico | 0.264 | 0.174 |



UNIVERSIDAD DE CHILE

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

Doctor Fernando Monckeberg Barros

| | | |
|---|---------------|---------------|
| C20:4 n-6 Ácido Eicosatetraenóico | 0.710 | 0.469 |
| C20:5 n-3 Ácido Eicosapentaenóico (EPA) | 16.116 | 10.651 |
| C22:5 n-3 Ácido Docosapentaenóico | 10.039 | 6.635 |
| C22:6 n-3 Ácido Docosahexaenóico (DHA) | 58.215 | 38.476 |
| Total Ac. Grasos Poliinsaturados | 86.053 | 56.875 |

Anexo n°5: Características generales de los grupos experimentales.

| | Grupos Experimentales | | | | | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | DC (a) | DC + HT (b) | DC + DHA (c) | DC + HT + DHA (d) | DAG (e) | DAG + HT (f) | DAG + DHA (g) | DAG + HT + DHA (h) |
| Peso inicial (g) | 14,7 ± 0,98 | 14,4 ± 0,99 | 14,3 ± 1,00 | 14,3 ± 1,00 | 14,5 ± 0,79 | 14,5 ± 0,97 | 14,1 ± 0,85 | 14,1 ± 0,83 |
| Peso final (g) | 26,7 ± 3,38 ^(e,h) | 28,8 ± 1,76 ^(f) | 26,8 ± 1,79 ^(g) | 27,8 ± 2,40 ^(h) | 34,2 ± 4,36 ^(a) | 35,5 ± 3,81 ^(b) | 35,9 ± 5,82 ^(c) | 33,5 ± 5,42 ^(a,d) |
| Ganancia de peso total (g) | 11,9 ± 3,59 ^(e,h) | 14,4 ± 1,87 ^(f) | 12,7 ± 1,50 ^(g) | 13,5 ± 3,10 ^(h) | 19,6 ± 4,58 ^(a) | 20,9 ± 3,33 ^(b) | 21,8 ± 6,34 ^(c) | 19,4 ± 5,30 ^(a,d) |
| Peso hígado (g) | 1,2 ± 0,22 ^(h) | 1,2 ± 0,14 | 1,1 ± 0,06 | 1,0 ± 0,25 | 1,1 ± 0,10 | 1,2 ± 0,16 ^(h) | 1,1 ± 0,22 | 0,9 ± 0,21 ^(a,f) |
| Peso tejido adiposo (g) | 1,4 ± 0,81 ^(e,h) | 1,4 ± 0,81 ^(f) | 1,1 ± 0,32 ^(g) | 1,2 ± 0,37 ^(h) | 3,4 ± 1,61 ^(a) | 4,6 ± 1,65 ^(b) | 3,7 ± 1,34 ^(c) | 3,8 ± 1,90 ^(a,d) |
| Relación peso hígado/ peso final | 0,05 ± 0,01 ^(e,h) | 0,04 ± 0,006 ^(f) | 0,04 ± 0,005 ^(g) | 0,04 ± 0,007 ^(h) | 0,03 ± 0,005 ^(a) | 0,03 ± 0,002 ^(b) | 0,03 ± 0,004 ^(c) | 0,03 ± 0,003 ^(a,d) |
| Relación peso tejido adiposo/ peso final | 0,05 ± 0,01 ^(e,h) | 0,05 ± 0,01 ^(f) | 0,04 ± 0,01 ^(g) | 0,05 ± 0,01 ^(h) | 0,1 ± 0,04 ^(a,f) | 0,1 ± 0,03 ^(b,e,g) | 0,1 ± 0,02 ^(c,f) | 0,1 ± 0,06 ^(a,d) |

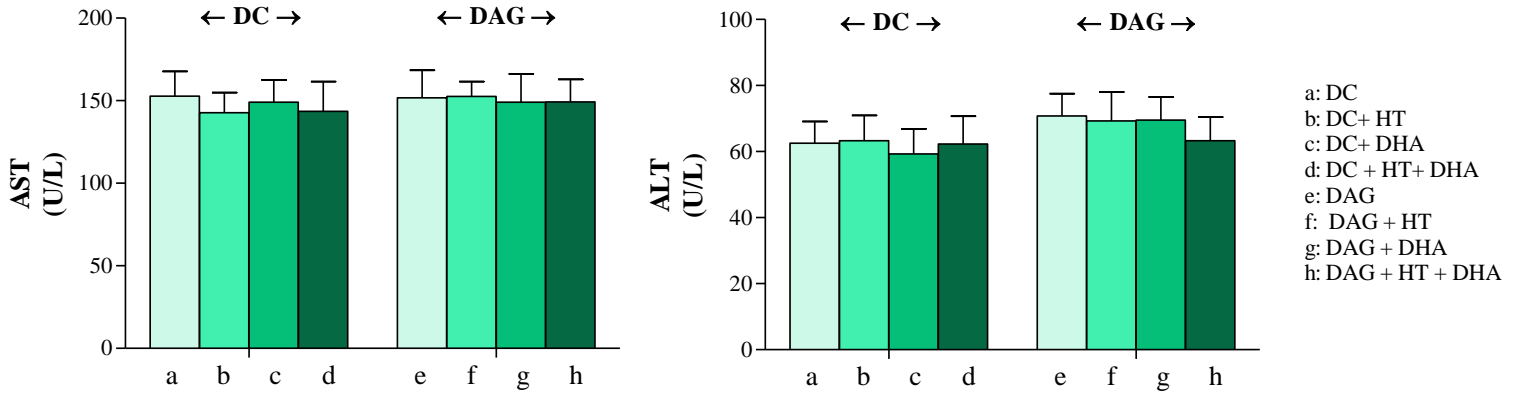
Los valores se presentan como promedio ± D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs DAG; DC + HT vs DAG + HT; DC + DHA vs DAG + DHA; DC + HT + DHA vs DAG + HT + DHA) y DC vs DAG + HT + DHA. Simbología ^a: p<0.05 con DC; ^b: p<0.05 con DC + HT; ^c: p<0.05 con DC + DHA; ^d: p<0.05 con DC + HT + DHA; ^e: p<0.05 con DAG; ^f: p<0.05 con DAG + HT; ^g: p<0.05 con DAG + DHA; ^h: p<0.05 con DAG + HT + DHA.

Anexo n°6: Ingesta de los grupos experimentales.

| | Grupos Experimentales | | | | | | | |
|--|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | DC (a) | DC + HT (b) | DC + DHA (c) | DC + HT + DHA (d) | DAG (e) | DAG + HT (f) | DAG + DHA (g) | DAG + HT + DHA (h) |
| Ingesta dietaria (g/día) | 9,1 ± 2,33 ^(e,h) | 6,2 ± 1,26 | 6,1 ± 1,49 | 6,1 ± 1,69 | 4,6 ± 1,31 ^(a) | 5,5 ± 1,41 | 5,8 ± 1,65 | 6,0 ± 1,66 ^(a,h) |
| Ingesta energética (kcal/día) | 34,9 ± 8,93 ^(e) | 23,8 ± 4,88 | 23,3 ± 5,92 ^(g) | 23,4 ± 6,47 ^(h) | 23,9 ± 6,96 ^(a,h) | 28,5 ± 7,45 | 30,6 ± 8,71 ^(c) | 31,8 ± 8,79 ^(d,e) |
| Ingesta de proteínas (g/día) | 1,7 ± 0,45 ^(e) | 1,2 ± 0,24 | 1,2 ± 0,29 ^(g) | 1,2 ± 0,32 ^(h) | 1,2 ± 0,37 ^(a,h) | 1,4 ± 0,37 | 1,5 ± 0,43 ^(c) | 1,6 ± 0,43 ^(d,e) |
| Ingesta de lípidos (g/día) | 0,4 ± 0,10 ^(e,h) | 0,3 ± 0,05 ^(f) | 0,3 ± 0,06 ^(g) | 0,3 ± 0,07 ^(h) | 1,6 ± 0,46 ^(a,g,h) | 1,9 ± 0,49 ^(b) | 2,0 ± 0,58 ^(c,e) | 2,1 ± 0,58 ^(a, d,e) |
| Ingesta de CHO (g/día) | 6,1 ± 1,57 ^(e,h) | 4,2 ± 0,85 ^(f) | 4,1 ± 1,01 ^(g) | 4,1 ± 1,14 ^(h) | 1,2 ± 0,34 ^(a) | 1,4 ± 0,37 ^(b) | 1,5 ± 0,43 ^(c) | 1,6 ± 0,44 ^(a,d) |

Los valores se presentan como promedio ± D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs DAG; DC + HT vs DAG + HT; DC + DHA vs DAG + DHA; DC + HT + DHA vs DAG + HT + DHA) y DC vs DAG + HT + DHA. Simbología ^a: $p < 0.05$ con DC; ^b: $p < 0.05$ con DC + HT; ^c: $p < 0.05$ con DC + DHA; ^d: $p < 0.05$ con DC + HT + DHA; ^e: $p < 0.05$ con DAG; ^f: $p < 0.05$ con DAG + HT; ^g: $p < 0.05$ con DAG + DHA; ^h: $p < 0.05$ con DAG + HT.

Anexo n°7



Niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). Los valores se presentan como promedio \pm D.E (n=7-8 por grupo experimental). Análisis estadístico: i) Test Anova two way seguido del test de Bonferroni ii) t student para comparar los grupos DC y DAG + HT + DHA.