



***“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO JUNTO
CON ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN EN LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y
OTRAS ALTERACIONES METABÓLICAS EN RATÓN”***

Maria Catalina Hernández Rodas

Tesis para optar al título de Magister en Nutrición y Alimentos.
Mención Nutrición Humana

Director de Tesis
Profesor. Dr. Rodrigo Valenzuela Báez
Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Universidad de Chile
Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA)
Doctor Fernando Monckeberg Barros.
Santiago de Chile
2015

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
1. MARCO TEORICO	9
1.1. Enfermedad por hígado graso no alcohólico	9
1.2. Patogénesis de la EHGNA	10
1.3. Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3	12
1.3.1. Regulación del metabolismo celular por los AGPICL n-3	14
1.3.2. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación a la insulinoresistencia y alteraciones metabólicas	15
1.3.3. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación al estrés oxidativo	17
1.3.4. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación a la inflamación	18
1.3.5. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación a la EHGNA	19
1.4. Aceite de oliva extra virgen	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1. Hipótesis	23
2.2. Objetivos	23
2.2.1. Objetivo general	23
2.2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y METODOS	24
3.1. Diseño de investigación	24
3.2. Definición de variables	24
3.3. Definición del tamaño muestral	25
3.4. Protocolo de intervención	25
3.5. Descripción de los métodos	31
3.5.1. Evaluación de la esteatosis hepática	31
3.5.2. Evaluación del estrés oxidativo y capacidad antioxidante	32
3.5.3. Evaluación de la inflamación	34
3.5.4. Evaluación de alteraciones metabólicas e insulinoresistencia	35
3.6. Análisis estadístico	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Efecto de las intervenciones en características antropométricas y de ingesta en los grupos experimentales	37
4.2. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros de esteatosis hepática	37
4.3. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros de estrés oxidativo	46
4.4. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros de inflamación	51
4.5. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros metabólicos	52
4.6. Correlación entre variables antropométricas y citoquinas inflamatorias	54
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	56
AGRADECIMIENTOS	67
REFERENCIAS	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Plan de trabajo para mediciones según tipo de muestra	26
Tabla 2. Grupos experimentales según tratamiento	26
Tabla 3. Aporte nutricional y composición de la dieta control	28
Tabla 4. Aporte nutricional y composición de la dieta alta en grasa	28
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos totales de la dieta control y de la dieta alta en grasa.	29
Tabla 6. Perfil de ácidos grasos totales del DHA y del AOEV	30
Tabla 7. Caracterización de antioxidantes en el AOEV	30
Tabla 8. Características generales en los grupos experimentales	38
Tabla 9. Perfil de ácidos grasos hepáticos totales más relevantes en los diferentes grupos experimentales	44
Tabla 10. Parámetros metabólicos por grupo experimental	53

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Interacciones metabólicas y moleculares en la patogenia de EHGNA, considerada con una enfermedad multifactorial	11
Figura 2.	Rutas y mecanismos moleculares de la citoprotección de los AGPICL n-3 en relación a EHGNA	16
Figura 3.	Ensayo para la determinación cuantitativa de los niveles de glutatión y de disulfuro de glutatión usando el método de reciclaje enzimática	33
Figura 4.	Microscopía de cortes de hígado de ratones en tratamiento con dieta control (DC) (A), DC+DHA (B), DC +AOEV (C), DC+DHA+AOEV (D)	39
Figura 5.	Microscopía de cortes de hígado de ratones en tratamiento con dieta alta en grasa (DAG) (E), DAG+DHA (F), DAG +AOEV (G), DAG+DHA+AOEV (H)	40
Figura 6.	Contenido total de grasa hepática (A) y contenido total de triacilglicéridos (TAG) hepáticos (B) en los grupos experimentales	41
Figura 7.	Niveles séricos de ácidos grasos libres (AGL) en los grupos experimentales	42
Figura 8.	Capacidad antioxidante sérica expresada en términos de equivalentes Trolox	47
Figura 9.	Niveles hepáticos de glutatión total (expresados como equivalentes de glutatión total= GSH + 2GSSG) (A), glutatión reducido (GSH) (B), glutatión oxidado (GSSG) (C) y razón GSH/GSSG (D) en los grupos experimentales	48
Figura 10.	Niveles hepáticos de carbonilos proteicos en los grupos experimentales	49
Figura 11.	Niveles séricos de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) y niveles hepáticos de TBARS (B) expresados en términos de malondialdehido (MDA) en los grupos experimentales	50
Figura 12.	Niveles hepáticos de 8-isoprostanos en los grupos experimentales	51
Figura 13.	Niveles séricos de TNF- α (A) e IL-6 (B) en los grupos experimentales	52
Figura 14.	Correlación entre peso corporal y peso del tejido adiposo (A), peso del tejido adiposo y niveles plasmáticos de TNF- α (B) y entre peso del tejido adiposo y niveles plasmáticos de IL-6 luego de 12 semanas de tratamiento (C)	55
Figura 15	Efectos de la alimentación con una DAG por un periodo de 12 semanas y protección otorgada por los diferentes tipos de tratamientos	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AAL	Ácido α -linolénico (C18:3 n-3, AAL)
AG	Ácidos grasos
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga (AGCL C ₁₈₋₂₂)
AGL	Ácidos grasos libres
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGPI n-3	Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3
AGPICL	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
AGPICL n-3	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-3
AGPICL n-6	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-6
AGS	Ácidos grasos saturados
AL	Ácido linoleico (C18:2 n-6, AL)
AOEV	Aceite de oliva extra virgen
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
ARA	Ácido araquidónico (C20:4 n-6, ARA)
C-HDL	Colesterol HDL
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos
C-LDL	Colesterol LDL
COX	Ciclooxigenasa
CT	Colesterol total
DAG	Dieta alta en grasa
DC	Dieta control
DHA	Ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA)
DMC	Dieta deficiente en metionina y colina
EHGNA	Enfermedad por hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
EMAG	Esteres metílicos de ácidos grasos
EO	Estrés oxidativo
EPA	Ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA)
GLUT-4	Transportadores de glucosa tipo 4
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
IFN-γ	Interferón gamma
IKK	Enzima quinasa ikB
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IR	Insulinorresistencia
LOX	Lipooxigenasa
MDA	Malondialdehído
NF-$\kappa\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

PGE1	Prostaglandina E1
PMN	Polimorfonucleares
PPARs	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PPAR-α	Receptor activado por proliferadores peroxisomales-alfa
PPAR-γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales-gamma
PPAR-δ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales-delta
SREBP-1c	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides - 1c
SSN	Solución salina normal
TAG	Triacilglicéridos
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
V-LDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

Antecedentes: La Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la causa más común de enfermedad hepática. Actualmente no existe ninguna terapia farmacológica validada para EHGNA, si bien las intervenciones en estilo de vida son la primera línea terapéutica, bajas tasas de adherencia a este tratamiento han sido reportadas. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICL n-3) poseen efectos hepatoprotectores, sin embargo, estos son altamente susceptibles a la lipoperoxidación, así altas dosis han sido asociadas con estrés oxidativo (EO) y progresión de la enfermedad. Por lo tanto es razonable plantear la adición de un antioxidante como una estrategia para potenciar el efecto de los AGPICL n-3 en la EHGNA. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la suplementación combinada de ácido docosahexaenoico (DHA) con aceite de oliva extra virgen (AOEV) en la esteatosis hepática, EO, inflamación, alteraciones metabólicas y resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasa (DAG) en ratón. **Metodología:** Ratones C57BL/6J (n=11 por grupo) fueron alimentados por 12 semanas con dieta control (10% grasa) o DAG (60% grasa) y suplementados vía oral con solución salina (50mg/kg/día), DHA (50mg/kg/día), AOEV (50mg/kg/día) o DHA+AOEV (DHA 50mg/kg/día + AOEV 50mg/kg/día), conformando 8 grupos experimentales. Luego de la intervención se determinó el perfil de ácidos grasos totales en hígado por cromatografía gas-liquida y parámetros de esteatosis hepática, EO, inflamación y estado metabólico en muestras de suero y tejido hepático mediante análisis histológico, kits colorimétricos y fluorimétricos, enzimoimmunoanálisis, metodología de reciclaje enzimático y métodos espectrofotométricos. **Resultados:** La alimentación con DAG por 12 semanas indujo un cuadro de esteatosis hepática, EO, pérdida en la capacidad antioxidante, inflamación sistémica y alteraciones metabólicas. Al respecto, la suplementación conjunta de DHA con AOEV generó una mayor protección que la suplementación aislada de DHA o de AOEV frente a la DAG en *i*) reducción de la esteatosis hepática; *ii*) menor lipoperoxidación en hígado; *iii*) menor respuesta pro-inflamatoria y *iv*) menor resistencia a la insulina, e indujo una normalización en el contenido de grasa hepática, TAG hepáticos y niveles séricos de IL-6 con relación al grupo control. **Conclusión:** La suplementación conjunta de DHA con AOEV ejerció una protección frente a la injuria ocasionada por la DAG, por lo cual podría ser considerada como una potencial línea terapéutica para el manejo de la EHGNA y prevención en la progresión de la esteatosis no alcohólica en ratón.

ABSTRACT

Background: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of liver disease. There is currently no drug therapy validated for NAFLD. Even though lifestyle interventions are the first-line therapy, low rates of adherence to this treatment have been reported. The n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFA) have hepatoprotective effects. However, they are highly susceptible to lipid peroxidation and high doses have been associated with oxidative stress (OS) and disease progression. The addition of an antioxidant as a strategy to promote the beneficial effects of n-3 LCPUFA on NAFLD seems to be a reasonable approach. **Objective:** To evaluate the effect of combined supplementation of docosahexaenoic acid (DHA) with extra virgin olive oil (EVOO) in hepatic steatosis, OS, inflammation, metabolic disorders and insulin resistance induced by high fat diet (HFD) in mouse. **Methods:** C57BL/6J mice (n=11 per group) were fed for 12 weeks with a control diet (CD) (10% fat) or HFD (60% fat) and orally supplemented with saline (50mg/kg/day), DHA (50mg/kg/day), EVOO (50mg/kg/day) or EVOO + DHA (DHA 50mg/kg/day + EVOO 50mg/kg/day), thus eight experimental groups were established. After the intervention, the fatty acid profile in liver was determined by gas-liquid chromatography and parameters of hepatic steatosis, OS, inflammation and metabolic state in serum and liver tissue samples were measured by histological analysis, colorimetric and fluorometric kits, enzyme immunoassay, recycling enzymatic methodology and spectrophotometric methods. **Results:** HFD feeding for 12 weeks induced hepatic steatosis, OS and lost in the antioxidant capacity, systemic inflammation and metabolic disorders. Regarding supplementation with DHA plus EVOO resulted in greater protection than supplementation with only DHA or EVOO against HFD on *i*) reduction of hepatic steatosis; *ii*) reduced hepatic lipid-peroxidation; *iii*) low pro-inflammatory response and *iv*) lower insulin resistance, and it lead to the normalization of hepatic fat content, hepatic TAG and serum IL-6 in relation to the control group. **Conclusion:** Supplementation with DHA plus EVOO provided protection against injury caused by HFD; this way, it could be considered as a potential therapeutic line for handling NAFLD and prevention in the progression of nonalcoholic steatosis in mice.

1. MARCO TEORICO

1.1. Enfermedad por Hígado Graso No Alcohólico

El término esteatosis hepática corresponde a la acumulación intracelular de lípidos y la subsecuente formación de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos, la cual está asociada a un incremento del tamaño del hígado (hepatomegalia). Cuando la esteatosis está fuertemente acompañada por inflamación, la condición se denomina esteatohepatitis. Ambas condiciones patológicas se agrupan bajo el término de enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) si el alcohol puede ser excluido como una causa primaria. Así, la EHGNA se refiere tanto a la esteatosis como a la progresión de su estado (es decir esteatohepatitis y cirrosis asociada al hígado graso)¹. Así es como, la EHGNA se define como la acumulación de lípidos en forma de triacilglicéridos (TAG) dentro de los hepatocitos excediendo el 5% del peso del hígado en ausencia de una ingesta excesiva de alcohol (convencionalmente definida como una ingesta de alcohol de 20 g/día) y sin otras causas de enfermedad del hígado².

La esteatosis hepática es generalmente considerada como una forma benigna de la EHGNA que tiene favorables resultados; sin embargo, el 10% de los individuos diagnosticados con esteatosis hepática podrían progresar a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y el 30% de los sujetos con EHNA podrían desarrollar fibrosis y cirrosis hepática. Actualmente hay una falta de información concluyente para clarificar los eventos moleculares y mecanismos subyacentes responsables de esta progresión y más importante para diferenciar la gravedad, interindividualidad y sensibilidad de la EHGNA³.

La prevalencia de la EHGNA 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. En los niños la prevalencia es del 3-10%, con un aumento del 40-70% en niños obesos. Además, la EHGNA es la causa más común de enfermedad hepática en todo el mundo, haciendo de esta un problema de salud pública mayor y una carga económica⁴.

El hígado graso resulta principalmente del exceso en la ingesta de calorías y la falta de actividad física, lo que significa que el enfoque de primera línea en la prevención y el tratamiento de la EHGNA es la corrección de estilos de vida no saludables. Cuando tal intervención resulta ser ineficiente o insuficiente la terapia farmacológica comienza a ser la segunda línea estratégica⁵. No obstante, en la actualidad, no existen tratamientos farmacológicos validados para la EHGNA; excepto para el manejo de la obesidad y anormalidades metabólicas asociadas, a través de modificaciones en estilos de vida, y por

desgracia, la pérdida de peso tiene una tasa de éxito pobre a largo plazo^{6,7}. Por consiguiente, la atención se ha dirigido hacia el desarrollo y validación de nuevas terapias dietarias para la prevención de la esteatosis hepática y su progresión a EHNA⁸; donde el desafío para el desarrollo de la terapia para la EHNA es en gran medida la complejidad de la enfermedad, que está estrechamente relacionada con obesidad visceral, dislipidemia, insulinoresistencia (IR) e hiperglicemia⁹. Tratamientos efectivos son necesarios con el fin de prevenir la enfermedad hepática crónica avanzada relacionada con IR y dislipidemia¹⁰, considerando que la enfermedad por hígado graso es una condición potencialmente reversible que puede llevar a la enfermedad hepática terminal¹¹. Si bien la fisiopatología de la EHNA todavía no está completamente entendida, y los tratamientos disponibles no son totalmente satisfactorios; terapias que limiten la injuria hepática y la ocurrencia relacionada de inflamación y fibrosis son particularmente atractivas para esta condición¹².

1.2. Patogénesis de la EHGNA

La patogénesis de la EHGNA no está completamente precisada. El mecanismo sugerido que subyace el hígado graso es la “hipótesis de dos golpes”¹³. El primer golpe es la acumulación de grasa en el hígado, que perjudica el metabolismo de los ácidos grasos (AG) incluyendo la lipogénesis de *novo*, β -oxidación, exportación de TAG y una alteración del ensamblaje de lipoproteínas de muy baja densidad (V-LDL). El segundo golpe sería una consecuencia de eventos pro-oxidativos y hepatotóxicos. Además, el síndrome metabólico, diabetes, obesidad y adiposidad central están fuertemente correlacionados con la EHGNA, siendo la IR, inflamación y estrés oxidativo (EO) los principales factores involucrados en la progresión de la enfermedad¹³. La EHGNA está fuertemente asociada con obesidad e IR y es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico¹⁴. Actualmente se considera una enfermedad multifactorial que implica una compleja interacción de la genética, la dieta y los estilos de vida, donde todos se combinan para formar el fenotipo EHGNA¹⁵. **(Figura 1).**

La malnutrición por exceso puede imponer una sobrecarga de AG en el hígado (especialmente saturados), que a su vez está asociada con mayores tasas de oxidación mitocondrial de AG y especies reactivas del oxígeno, favoreciendo el desarrollo del EO en el hígado. Al respecto, pacientes obesos con EHGNA muestran un aumento en parámetros de EO comparado con controles en *i*) reducción del potencial antioxidante; *ii*) elevada actividad de radicales libres; *iii*) incremento en los niveles del radical superóxido (O₂-) dependiente de células Kupffer y respuesta de peroxidación lipídica; y *iv*) disminución concomitante en la capacidad antioxidante del plasma¹⁶. **(Figura 1)**

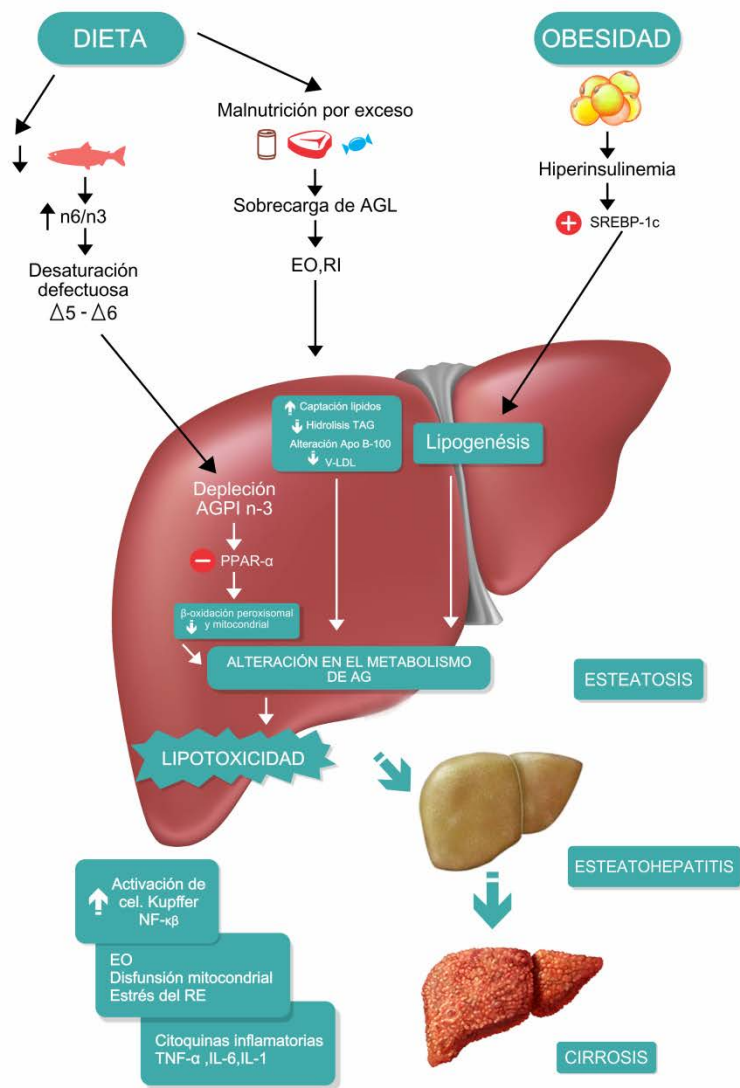


Figura 1. Interacciones metabólicas y moleculares en la patogénesis de EHGNA, considerada como una enfermedad multifactorial.

Fuente: Elaboración propia a partir de la recopilación de evidencia científica plasmada en el marco teórico.

Aunque las anomalías metabólicas preexistentes pueden ser multifactoriales y/o polimorfo-genéticas, la EHGNA está frecuentemente asociada con alteración del metabolismo de AG en pacientes obesos. Alteraciones en el metabolismo de lípidos dan lugar a la esteatosis hepática debido a un incremento en la lipogénesis, a una β -oxidación mitocondrial o peroxisomal defectuosa, y/o a una baja capacidad del hígado para exportar lípidos. En el último caso, la acumulación de lípidos en el hígado afecta el metabolismo de la apolipoproteína B-100 (apoB-100), la principal proteína estructural de V-LDL. Además,

el ensamblaje y secreción de V-LDL está influenciado por diferentes factores incluyendo la proteína de unión de ácidos grasos en el hígado (LFABP); una proteína citosólica que se une a ácidos grasos de cadena larga (AGCL) con alta afinidad y está regulada por AGCL, incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL)¹⁷. **(Figura 1)**

A nivel dietario, los pacientes con EHGNA presentan una muy baja ingesta de pescado (menos de 1 kg/año) y una elevada ingesta de bebidas azucaradas y carnes rojas comparados con la población general, existiendo una asociación positiva entre estas variables y un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico y EHGNA¹⁸. La recomendación en la proporción AG de la serie n-3/AG de la serie n-6 debería ser de 1:1 a 1:4, lo cual es un tema crucial y se ha visto que pacientes con esteatosis hepática muestran un alto consumo de AG de la serie n-6 y una proporción anormal de n-3:n-6. Estudios realizados en seres humanos han revelado que la disminución en la biodisponibilidad de AG de la serie n-3 intensifica la síntesis de AG y la acumulación de lípidos en los hepatocitos¹⁹. El agotamiento de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga derivados de la serie n-3 (AGPICL n-3) en pacientes obesos mórbidos con esteatosis o EHGNA es evidenciada por disminución del 50% en los niveles del ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y del ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA), exhibiendo un agotamiento de AGPICL n-3, aumento en la peroxidación lipídica del hígado y potencial antioxidante reducido²⁰. La reducción de los AGPICL n-3 en el hígado podría ser causado por distintos mecanismos, a saber, *i*) mayor peroxidación hepática de AGPICL n-3 en vista de la mejoría alcanzada en la generación de especies reactivas del oxígeno y su alta susceptibilidad al ataque por radicales libres; *ii*) la desaturación defectuosa (reducción en la capacidad de incorporar dobles enlaces carbono-carbono) del ácido α -linolénico (C18:3 n-3, AAL), como lo sugiere la importante disminución en la proporción producto/precursor (EPA+DHA)/AAL y ácido araquidónico (C20:4 n-6, ARA)/ácido linoleico (C18:2 n-6, AL) apuntando a la deficiencia en la desaturasa Δ -5 y Δ -6 y *iii*) desequilibrio dietario asociado con obesidad¹⁶. **(Figura 1)**

Así, la reducción en la biodisponibilidad intracelular de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y la composición alterada de lípidos en bicapas de fosfolípidos de hígados esteatósicos se ha propuesto que contribuye a la exacerbación de la esteatosis al mejorar el metabolismo lipídico lipogénico y la producción de moléculas inflamatorias¹. **(Figura 1)**

1.3. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-3

Los ácidos grasos de la serie n-3 son AGPICL (EPA+DHA) que se sintetiza en bajas cantidades *in vivo*²¹, y por lo tanto deben obtenerse de fuentes exógenas (alimentos)²². En

la dieta, grandes cantidades son encontradas naturalmente en el aceite de pescado, algas marinas, algunas semillas y frutos secos. Ellos derivan del AAL y principalmente se encuentran como EPA y DHA que son ambos antiinflamatorios. Estos son luego convertidos a metabolitos activos, en particular, moléculas conocidas como resolvinas y protectinas. El otro grupo de AGPI, los ácidos grasos de la serie n-6, se encuentran predominantemente en granos. Ellos derivan del AL y su principal metabolito; el ARA es pro-inflamatorio y protrombótico²¹.

AAL es el ácido graso poliinsaturado de la serie n-3 más común en la dieta. El organismo humano y otros mamíferos usan AAL principalmente como una fuente de energía y carbono, pero este también es precursor de todos los AGPICL n-3, incluyendo el EPA y DHA. La conversión de ALA a EPA y DHA depende de las enzimas desaturasas Δ -5 (Fads-1) y Δ -6 (Fads-2) y de las elongasas Elovl-2 y Elovl-5, como también de la β -oxidación peroxisomal²³. Una deficiencia de AG esenciales es relativamente rara, pero una ingesta insuficiente de AGPI n-3 y baja conversión de C18 a AGPICL n-3 es común, ya que el consumo de AL ha aumentado en el mundo industrializado, mientras que la ingesta de AAL ha disminuido. AL y AAL compiten como sustratos para la transformación enzimática a AGPICL, así una mayor ingesta de AL reduce la formación de AGPICL n-3. Además, solo una fracción de AAL es convertida a EPA, incluso menos a DHA. Por lo tanto, una ingesta insuficiente y/o transformación de AAL contribuye a un pobre estado de AGCL n-3 en muchos adultos²⁴. Ya que la síntesis de *novo* de AGPICL n-3, incluyendo el EPA, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6, DPA) y DHA es ineficiente en humanos; especialmente para DHA, estos AGPICL n-3 por lo tanto deben ser obtenidos de fuentes dietarias, principalmente de pescados grasos (atún, jurel y salmón) y mariscos. También, cantidades moderadas de AGPICL n-3 se encuentran en alimentos comercialmente disponibles que han sido enriquecidos con AGPICL n-3, incluyendo marcas seleccionadas de pan, cereal, leche, yogurt y huevos²⁵.

Una creciente evidencia ha demostrado la importancia de los AGPI en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos como la respuesta inflamatoria, el desarrollo y la integridad funcional del sistema nervioso e inmunidad. Además, investigaciones durante los últimos 10 años han revelado un posible rol de los AGPI en la modulación del metabolismo energético. Alteraciones en la biodisponibilidad de AGPI han sido asociadas con patologías incluyendo enfermedad cardiovascular, obesidad, diabetes tipo II, síndrome metabólico y EHGNA, así como con el componente de respuesta inflamatoria de estas patologías. De interés particular biológico son tres AGPICL específicos, a saber ARA; un ácido graso de la serie n-6 fundamental, y los ácidos grasos de la serie n-3; EPA y DHA, en donde es sabido que una baja ingesta de precursores esenciales pueden inhibir la síntesis de AGPICL, generando una deficiencia que favorece la progresión de EHGNA²⁶.

1.3.1. Regulación del metabolismo celular por los AGPICL n-3

La regulación del metabolismo celular lipídico por factores dietarios puede ocurrir a dos niveles, a saber, *i*) modulación de la transducción de señal a través de la manipulación de la composición de los AG de las membranas, y *ii*) modificación de la transcripción génica¹⁷; donde los ácidos grasos de cadena larga (C₁₈₋₂₂) regulan el metabolismo energético al actuar como ligando de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs). El Receptor activado por proliferadores peroxisomales-alfa (PPAR- α) expresado principalmente en el hígado, es esencial para la adaptación metabólica al ayuno por la inducción de genes para la β -oxidación y la cetogénesis y por regulación a la baja del gasto energético a través del factor 21 de crecimiento de fibroblastos (FGF21)²⁷. El receptor activado por proliferadores peroxisomales-delta (PPAR- δ) es altamente expresado en el músculo esquelético e induce genes para la oxidación de AGCL durante el ayuno y ejercicios de resistencia. PPAR- δ también regula el metabolismo de la glucosa y la biogénesis mitocondrial por inducción de dos componentes transcripcionales que son blancos de la señalización de insulina; FOXO y PGC1- α . El receptor activado por proliferadores peroxisomales-gamma (PPAR- γ) es un regulador transcripcional relevante en la adipogénesis y desempeña un papel importante en el proceso de almacenamiento de lípidos. Así PPAR- α y PPAR- γ tienen funciones opuestas en la regulación del metabolismo de las grasas; PPAR- α promueve la utilización, mientras que la activación de PPAR- γ promueve el almacenamiento. De hecho, se ha sugerido que el papel de PPAR- γ en la activación de genes lipogénicos puede contribuir al desarrollo de esteatosis, ya que un aumento en la expresión de PPAR- γ se ha encontrado en hígados esteatóticos. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de PPAR- γ puede prevenir la progresión de la esteatosis hepática en modelos de ratón y el tratamiento con rosiglitazona y pioglitazona (agonistas de PPAR- γ) se ha demostrado que tienen efectos similares. Los efectos protectores de PPAR- γ podrían ser por un aumento de la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, lo que conduce a la disminución en la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) en el hígado²⁸. Conjuntamente, la adiponectina, otro blanco importante de PPAR- γ puede actuar como un espaciador entre los adipocitos para mantener su actividad metabólica y sensibilidad a la insulina²⁹ y contribuye a la regulación en la expresión de PPAR- α , lo que conduce a una mayor oxidación de los AG hepáticos. De igual forma, la activación de PPAR- γ en el tejido adiposo se ha propuesto que aumenta el número de adipocitos y promueve la relocalización y el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo, protegiendo a los tejidos periféricos de la lipotoxicidad, y la expresión de PPAR- γ se ha demostrado que tiene efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos en células estrelladas, macrófagos y células epiteliales²⁸.

Los AGPICL n-3 son importantes biomoléculas en la regulación del metabolismo lipídico hepático lo cual logran a través de una regulación a la baja en la expresión y el procesamiento del factor de transcripción proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c (SREBP-1c) llevando a deprimir la capacidad lipogénica y glucogénica y una regulación hacia el alza del PPAR- α favoreciendo la oxidación de AG³⁰. Además de los resultados prolipogénicos subyacentes a la regulación a la baja de PPAR- α bajo condiciones de agotamiento de los AGPICL n-3, estos cambios pueden tener implicaciones proinflamatorias en pacientes con EHGNA que presentan una activación sustancial de los factores de transcripción hepáticos; factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y proteína activadora 1 (AP-1) activando la inflamación¹⁶.

De este modo, la evidencia plantea que la malnutrición por exceso desencadena el EO en el hígado debido a una mayor disponibilidad y lipoperoxidación, con el desarrollo de hiperinsulinemia e IR, y la depleción de AGPICL n-3, con mejoramiento en la razón de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-6 (AGPICL n-6)/AGPICL n-3 favoreciendo un estado proinflamatorio³¹. Estos cambios pueden llevar a esteatosis hepática por diferentes mecanismos conocidos, a saber, *i*) lipólisis periférica dependiente de IR y flujo de AG al hígado y *ii*) cambios en la capacidad de unión al ADN de SREBP-1c y PPAR- α inducido por el agotamiento de los AGPICL n-3 favoreciendo la lipogénesis sobre la oxidación de AG¹⁶ (**Figura 1**).

1.3.2. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación a la insulinoresistencia y alteraciones metabólicas

La IR es una característica importante en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y un número de desórdenes metabólicos asociados incluyendo la EHGNA, lipoatrofia y enfermedad cardiovascular. IR y EHGNA pueden ser encontrados independientemente, pero a menudo ellos ocurren simultáneamente³². Al respecto, en modelos animales una dieta pobre en AGPI n-3 induce esteatosis e IR, lo que está asociado con una disminución en la oxidación de AG y regulación al alza de la lipogénesis, como también activación de SREBP-1c³³.

La insulina y la glucosa estimulan la lipogénesis mediante la activación de los factores de transcripción SREBP-1c y proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos (ChREBP) induciéndose la síntesis de AG y desaturación. AGPICL n-3 inhiben tanto la expresión como la translocación nuclear de SREBP-1 y ChREBP, de este modo suprimen la lipogénesis³⁴. Los niveles de SREBP-1 son elevados en respuesta a altas concentraciones

de insulina y glucosa aumentando la producción de sus precursores. SREBP-1c maduro es transportado al núcleo donde por unión a elementos regulatorios de esteroles en las áreas promotoras de genes que estimulan el incremento en la lipogénesis de *novo* y en la glicólisis. Una sobreexpresión de SREBP-1c favorece la acumulación de TAG en el hígado. Los AG de la serie n-3 reducen la cantidad maduro de SREBP-1c disponible en el núcleo y de este modo inhiben los efectos prolipogénicos de la insulina. Asimismo, otro potencial mecanismo de los AG de la serie n-3 es la inhibición de la glicólisis mediante la supresión de ChREBP a través de la inhibición de la L-piruvato quinasa²¹. **(Figura 2)**

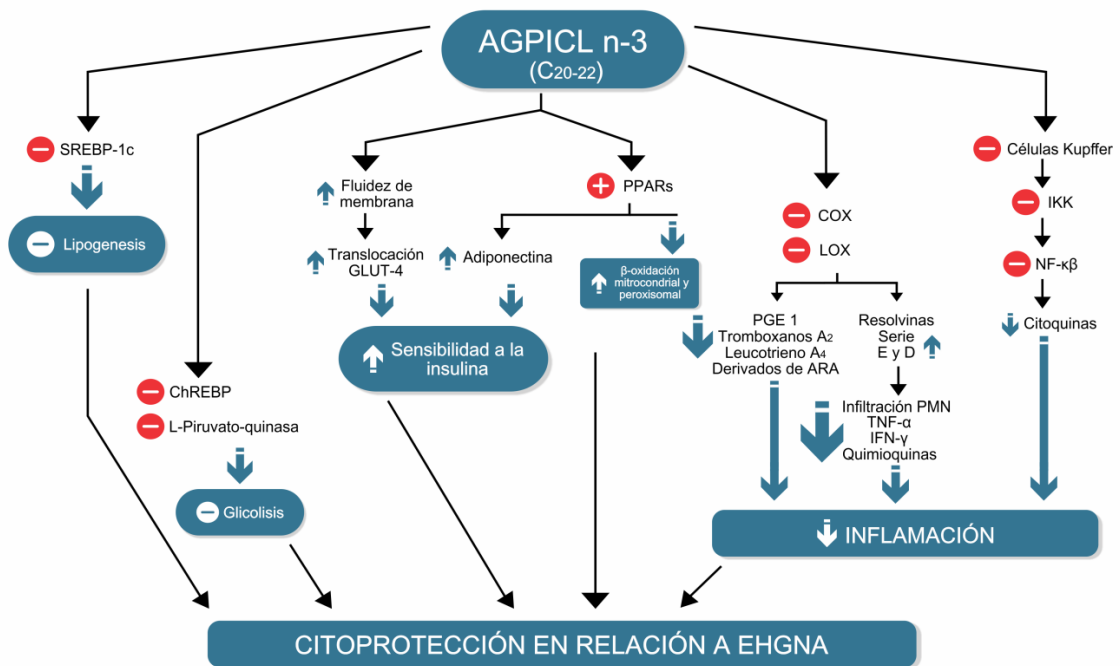


Figura 2. Rutas y mecanismos moleculares de la citoprotección de los AGPICL n-3 en relación a EHGNA.

Fuente: Elaboración propia a partir de la recopilación de evidencia científica plasmada en el marco teórico

De igual modo, a través de mecanismos genómicos y no genómicos, los AGPICL anulan los efectos de la obesidad y la IR en un nivel hepático y no hepático. Por mecanismos no genómicos, los AGPICL aumentan la fluidez de membranas biológicas, en donde una adecuada fluidez de membrana no solo favorece el transporte de membrana de sustancias, sino que también modula la actividad de enzimas transmembrana y mejora la funcionalidad de receptores de superficie celular que son más capaces de unirse a ligandos y son más eficientes en la transducción de señales. Ha sido propuesto que una modulación dependiente de AGPICL de la fluidez de la membrana previene la resistencia a la insulina

por diferentes vías, incluyendo una fluidez dependiente del aumento del número de receptores de insulina en la membrana celular y la promoción de la translocación dependiente de insulina de los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT-4) a la superficie de membrana²⁶. (Figura 2)

Previos estudios experimentales han demostrado que dietas enriquecidas con AGPICL n-3 incrementan la sensibilidad a insulina, reducen el contenido de TAG hepáticos y mejoran la esteatosis hepática en roedores³⁵. En humanos, se ha soportado que la suplementación con aceite de pescado atenúa la lipogénesis de *novo* en ayuno e hipertrigliceridemia en adultos sanos sobrealimentados con fructosa y cambia la utilización de sustratos en todo el cuerpo de glucosa a AG en adultos diabéticos. Desde una perspectiva mecanicista, la administración de AGPICL n-3 produce efectos que son divergentes vía a vía su impacto en la sensibilidad a la insulina, por una parte los AGPICL n-3 atenúan la inflamación y la síntesis del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), inhiben la enzima quinasa ikB (IKK), mejoran PPAR- γ , reducen el contenido lipídico en músculo e hígado e incrementan la concentración de adiponectina; estas acciones generalmente atenúan la resistencia a la insulina²⁴.

1.3.3. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación al estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) causado por la acumulación de TAG hepáticos y la IR son los mayores contribuyentes en la patogénesis de la EHGNA. Además, el EO y la disfunción mitocondrial están asociados con el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno y citoquinas proinflamatorias relacionadas con la EHGNA. Estudios recientes en humanos han descrito una fuerte asociación entre la severidad de esteatohepatitis y el grado de EO. El incremento en la actividad prooxidante asociado con EO lleva a un aumento en el estado de peroxidación lipídica hepática. La Peroxidación lipídica puede también causar disfunción inmunológica, que podría llevar a desarrollo de fibrogénesis hepática, lo cual podría potencialmente llevar a un incremento en la liberación de 4-hidroxi-20-nonenal (HNE) que puede unir proteínas hepatocitarias formando nuevos antígenos y así provocando una perjudicial respuesta inmunológica. Además, el EO asociado con EHGNA ha sido también demostrado que incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias, en donde esta hepatotoxicidad puede indirectamente activar factores de transcripción tales como NF- κ B. Conjuntamente, el incremento en la peroxidación lipídica asociado con EHGNA, puede contribuir a la disminución de AGPICL, ya que ellos son particularmente susceptibles a la peroxidación lipídica. Así, el EO dependiente de la peroxidación lipídica puede representar un mecanismo alternativo para la depleción de AGPI n-3 en el hígado de pacientes con EHGNA³⁶.

1.3.4. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación a la inflamación

Se ha establecido que los AGPI n-3 ejercen actividades antiinflamatorias asociadas con activación de PPAR- α y también por inhibición competitiva directa de la lipooxigenasa (LOX) y ciclooxigenasa (COX) invocando esta última como una vía potencial proinflamatoria en la esteatohepatitis. Comparados con los metabolitos de AGPICL n-6 como los leucotrienos, que son inequívocamente proinflamatorios, los metabolitos derivados de AGPI n-3 son generalmente antiinflamatorios³⁷. El aceite de pescado es terapéutico en enfermedades con un componente prominentemente inflamatorio en virtud de las propiedades antiinflamatorias pleiotrópicas de los AGPICL n-3. Por ejemplo, un incremento en la ingesta de EPA reduce la incorporación de ARA en las membranas, resultando en síntesis de prostaglandinas y leucotrienos que son generalmente menos proinflamatorios que sus contrapartes derivadas de ARA (ej. PGE3 vs PGE2 y LTB5 vs LTB4). En adición, los AGPI n-3 regulan a la baja la expresión dependiente de NF- κ B de enzimas proinflamatorias, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (ej. COX-2, iNOS, TNF- α , IL-8 e ICAM-1) por el antagonismo de los Receptor Toll-like 4, atenuando la señalización de IKK (el activador de NF- κ B) y transrepresión de genes reguladores de NF- κ B. El último efecto es mediado a través de la activación de PPAR- α/γ , que son también expresados en células inflamatorias. Finalmente, NF- κ B es inhibido por ciertas formas de adiponectina, expresión que es incrementada por el consumo de aceite de pescado²⁴ (**Figura 2**).

Las resolvinas son una nueva familia de mediadores antiinflamatorios y proresolución generados de DHA y EPA. Estos nuevos lípidos bioactivos fueron llamados resolvinas y clasificados ya fuera como resolvinas de la serie E si su biosíntesis es iniciada de EPA, o como resolvinas de la serie D si estos son generados de DHA. A diferencia de sus precursores EPA y DHA, las resolvinas ejercen acciones biológicas a un rango nanomolar. Resolvinas E1, disminuyen la infiltración de polimorfonucleares (PMN) y migración de células T, reduce la secreción de TNF α e interferón gamma (IFN- γ), inhibe la formación de quimioquinas y el bloque interleucina 1 (IL-1) inducido por activación de NF- κ B. Resolvinas E1 también estimulan la fagocitosis de macrófagos de PMN apoptóticos y este es un potente modulador de moléculas de adhesión que expresan leucocitos proinflamatorios³⁸ (**Figura 2**).

Estudios en modelos experimentales de injuria hepática han elucidado un rol protector del DHA y lípidos mediadores derivados de DHA contra la inflamación hepática. De hecho, la alimentación con una dieta enriquecida con DHA mejoró la injuria hepática necroinflamatoria inducida por hepatotoxicidad en ratones³⁹. Las acciones hepatoprotectoras del DHA fueron asociadas con una disminución en la formación hepática

de prostaglandina E2 (PGE2) y un concomitante aumentó en la generación de mediadores de lípidos protectores derivados del DHA. De igual forma, el rol benéfico de estas señales de lípidos derivados de DHA fue fuertemente soportado por experimentos *in vitro* que demostraron una atenuación en el daño al ADN y en el EO en hepatocitos. De mayor importancia, los autacoides derivados de DHA han sido demostrados por reducir la liberación de TNF- α en macrófagos, reconocido como el efector celular predominantemente involucrado en la cascada inflamatoria llevando a daño hepatocitario³⁸.

1.3.5. Efectos citoprotectores de los AGPICL n-3 con relación a EHGNA

Aunque la EHGNA es actualmente la forma más común de enfermedad crónica hepática, no hay un agente farmacológico aprobado para su tratamiento. Por lo tanto, agonistas PPARs sintéticos representan una atractiva droga blanco para el manejo de EHGNA⁴⁰. Al respecto, los AGPICL presentes en el aceite de pescado y derivados de AAL, están involucrados en la biosíntesis de eicosanoides e interactúan con algunas proteínas receptores nucleares, de este modo influyen la transcripción de genes regulatorios. Actualmente, ellos son considerados ligandos naturales de receptores PPARs; un grupo de receptores nucleares que modulan el metabolismo de lípidos en hepatocitos. Bajos niveles de AGPICL n-3 generan un consecuente incremento en la razón de AG de la serie n-6/n-3 y deterioro en la actividad de PPAR- α en el hígado. Este fenómeno está asociado con un aumento en la captación hepática de AGL circulantes, una disminución de ω -oxidación microsomal en hepatocitos, β -oxidación peroxisomal y mitocondrial, una disminución en la síntesis de proteínas transportadoras de ácidos grasos (llamadas lipoproteínas de muy baja densidad) y una regulación al alza de factores de transcripción lipogénicos (SREBP-1c y factor nuclear Y). Ácidos grasos poliinsaturados incluyendo el DHA y EPA afectan positivamente el curso de la EHGNA y el consumo de aceite de pescado ha sido asociado con disminución en la lipogénesis de *novo*, aumento en la captación de glucosa en tejidos grasos y reducción de la grasa visceral. Además, la ingesta de AGPICL n-3 inhibe la activación de las células Kupffer y síntesis de citoquinas proinflamatorias⁴¹. **(Figura 2)**.

En modelos animales de obesidad, el EPA y DHA han sido capaces de prevenir y revertir la enfermedad hepática. Previos estudios experimentales han demostrado que dietas enriquecidas con AGPICL n-3 incrementan la sensibilidad a insulina en ratas, reducen el contenido de TAG hepáticos y mejoran la esteatosis hepática en roedores³⁵. En humanos, obesidad y EHGNA están negativamente asociadas con el contenido de AGPICL n-3 de membranas celulares, lo que se ha relacionado con la alteración del metabolismo lipídico. Por otra parte, la suplementación con AGPICL n-3 ha demostrado que mejora biomarcadores serológicos de EHGNA y mediciones radiológicas de esteatosis hepática en

diferentes ensayos clínicos, incluyendo estudios en población infantil que han encontrado una marcada reducción en el grado de esteatosis hepática por ultrasonido en sujetos que recibieron suplementos de DHA⁴². Además, estudios epidemiológicos en humanos y experimentales en animales y cultivos celulares muestran que los AG n-3 especialmente AAL, EPA y DHA reducen el factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares⁴³; en donde EPA y DHA, más que AAL, han sido el foco de la investigación en los ácidos grasos n-3, probablemente debido a la relativa conversión ineficiente de AAL a EPA y DHA en roedores y humanos⁴⁴. Al respecto, el estudio de Depner *et al.*⁴⁵ validó la hipótesis de que el DHA dietario es más efectivo que el EPA en prevenir la inducción de marcadores asociados con la EHGNA en modelo animal, demostrando que el DHA fue mejor que el EPA en atenuar la inflamación, EO, fibrosis y daño hepático, proponiendo así que el DHA puede ser un suplemento dietario más atractivo que el EPA para la prevención y potencial tratamiento de la EHGNA en humanos obesos⁴⁵.

No obstante, a pesar de los efectos hepatoprotectores atribuidos a los AGPICL n-3, es conocido que el EPA y el DHA son AG que son oxidados fácilmente en comparación con el AL y el ácido oleico (C18:1 n-9) *in vitro*. De hecho, todos los AGPI son altamente susceptibles al daño oxidativo cuando son expuestos al aire o *in vivo*, y los lipoperóxidos resultantes y sus metabolitos son directamente proinflamatorios. Así, altos niveles de EO han sido asociados con un elevado consumo de aceite de pescado, llevando a depleción en tejidos de enzimas antioxidantes, lo cual exacerba el daño hepático en enfermedad hepática inducida por alcohol³⁷. Además, en vista de que los efectos de los AGPICL n-3 sobre el envejecimiento y la vida útil no están claros en comparación con los AGPI de la serie n-6 contenidos en el aceite de girasol y aceite de soya, datos sobre la seguridad en la ingesta a largo plazo del EPA y del DHA son importantes para el uso correcto de estos como suplementos⁴⁶. Al respecto, el trabajo de Larter *et al.*³⁷ en ratones alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina (DMC) como modelo para inducir esteatosis hepática, reportó que si bien la suplementación con AGPICL n-3 a partir de aceite de pescado provocó una mayor activación de PPAR- α y supresión de la lipogénesis, también indujo una marcada acumulación de lipoperóxidos hepáticos en comparación con la dieta enriquecida con aceite de oliva, así niveles muy altos de peróxidos de lípidos hepáticos pueden haber suprimido la protección otorgada por la activación del PPAR- α y esto podría ser responsable de la lesión hepatocelular lipotóxica y reclutamiento inflamatorio³⁷. De igual forma, el estudio realizado por Tsuduki *et al.*⁴⁶ que investigó el efecto del aceite de pescado en la esperanza de vida y en la composición lipídica y EO en plasma e hígado de ratones, encontró que una suplementación prolongada (28 semanas) con aceite de pescado provocó una hiper peroxidación de fosfolípidos de membranas y una pérdida en la defensa antioxidante debido a una reducción en los niveles de tocoferol, sugiriendo así que la adición de un antioxidante se requiere para lograr un efecto positivo general del aceite de

pescado, porque los componentes del aceite (EPA y DHA) son oxidados y pueden acortar la esperanza de vida, basado en la observación de un aumento en el EO y promoción del envejecimiento en ratones ⁴⁶.

1.4. Aceite de oliva extra virgen

El aceite de oliva extra virgen (AOEV) es obtenido de los frutos del árbol de olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos bajo condiciones que no ocasionen la alteración del aceite. El AOEV ha demostrado tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios, inmunomoduladores, anti-proliferativos y antiapoptóticos⁴⁷. Aunque estos efectos protectores de la salud tradicionalmente se han atribuido a su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados (AGM), una amplia gama de evidencia indica que muchos de los efectos benéficos de la ingesta de AOEV son debidos a la presencia de componentes altamente bioactivos⁴⁸. Entre estos, los compuestos fenólicos como el hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína han mostrado efectos antiinflamatorios y antioxidantes ⁴⁹. Los polifenoles del aceite de oliva también han sido asociados con efectos neuroprotectores, antienvjecimiento y anti aterogénicos y con la regulación de importantes vías de señalización celular. Por otra parte, debido a su capacidad para modular la muerte celular, los polifenoles de la oliva han sido propuestos como agentes anti cáncer, quimiopreventivos y terapéuticos⁵⁰. Además, compuestos fenólicos del AOEV han demostrado ser altamente biodisponibles, el hidroxitirosol y tirosol son absorbidos luego de la ingestión en una naturaleza dosis-dependiente y ha sido sugerido que los antioxidantes presentes en el aceite de oliva pueden evitar la ruptura de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal antes de la absorción⁵¹.

La evidencia experimental obtenida de estudios en humanos y animales (tanto *in vitro* como *in vivo*) demuestra que los compuestos fenólicos del aceite de oliva tienen actividades biológicas que pueden ser importantes en la reducción del riesgo y la severidad de ciertas enfermedades crónicas⁵¹. Entre las actividades biológicas ejercidas por los compuestos fenólicos del aceite de oliva se encuentran *i*) a nivel de las lipoproteínas del plasma: disminución en el colesterol LDL, TAG, colesterol total plasmático y aumento en el colesterol HDL *ii*) a nivel de marcadores de función plaquetaria: disminución en la actividad plaquetaria, agregación plaquetaria y expresión de moléculas de adhesión endotelial; *iii*) a nivel de marcadores de inflamación: disminución en tromboxano B2 (TXB2), leucotrieno B4 (LTB4), liberación de ARA y actividad de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2); *iv*) a nivel de marcadores de oxidación: disminución en la oxidación del colesterol LDL y oxidación del ADN, disminución en formación de F-2 isoprostanos y en el glutatión oxidado (GSSG), aumento en glutatión reducido (GSH) y

glutación peroxidasa (GSH-PX), disminución en formación de especies reactivas del oxígeno y aumento de la capacidad antioxidante del plasma; v) a nivel de marcadores de función celular: disminución en la proliferación celular desregulada y en la supresión de la muerte celular y; vi) disminución en la actividad microbiana⁵¹.

Por consiguiente, considerando a la EHGNA como un desorden metabólico complejo que puede tener un gran impacto en la función hepática y sus consecuentes alteraciones sistémicas, y dada la evidencia epidemiológica que reporta que en el mundo su prevalencia entre las enfermedades del hígado y en la población general está aumentando en los últimos años junto con sus condiciones asociadas (obesidad, RI, síndrome metabólico y diabetes), donde su difusión parece ser una pandemia debido a la propagación del estilo de vida occidental⁵²; se considera una prioridad en salud pública la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EHGNA, así como la investigación enfocada a comprender los posibles mecanismos involucrados en esta. De este modo, basados en la evidencia científica que ha reportado los efectos hepatoprotectores del DHA frente a la patogenia de la EHGNA y las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias atribuidas al AOEV, se propone estudiar el efecto de un protocolo combinado de DHA con AOEV en el modelo animal por medio de la esteatosis hepática de origen nutricional inducida a través de la alimentación con una dieta alta en grasa.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

“La suplementación oral combinada de ácido docosahexaenoico (DHA) con aceite de oliva extra virgen (AOEV) reduce la esteatosis hepática, estrés oxidativo, inflamación, alteraciones metabólicas y resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasa en ratón”.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación oral combinada de DHA con AOEV en la esteatosis hepática, estrés oxidativo, inflamación, alteraciones metabólicas y resistencia a la insulina inducida por dieta alta en grasa en ratón.

2.2.2. Objetivos específicos

2.2.2.1. Evaluar el efecto de la suplementación oral combinada de DHA con AOEV en la esteatosis hepática valorada a través de análisis histológico, cuantificación de grasa hepática total, triacilglicéridos en hígado, ácidos grasos libres en suero y determinación del perfil de ácidos grasos hepáticos totales.

2.2.2.2. Evaluar el efecto de la suplementación oral combinada de DHA con AOEV en el estrés oxidativo medido por capacidad antioxidante sérica, cambios en los niveles hepáticos de glutatión total, glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y en la razón GSH/GSSG, y determinación de proteínas oxidadas, sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en suero e hígado y 8-isoprostanos en hígado.

2.2.2.3. Evaluar el efecto de la suplementación oral combinada del DHA con AOEV en la inflamación mediante la determinación de los niveles circulantes del factor de necrosis tumoral-alfa e interleucina-6.

2.2.2.4. Evaluar el efecto de la suplementación oral combinada del DHA con AOEV en alteraciones metabólicas medidas a través de los parámetros de glicemia, insulinemia, modelo de evaluación homeostática de resistencia a la insulina (índice HOMA-IR), niveles de triacilglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL sérico.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Diseño de investigación

El diseño corresponde a un estudio experimental, randomizado, controlado, prospectivo, en modelo animal

3.2. Definición de variables

Variable independiente: tratamiento (tipo de intervención)

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)

Variables descriptivas:

- Peso corporal inicial (g)
- Peso corporal final (g)
- Ganancia total de peso (g)
- Peso del hígado (g)
- Peso del tejido adiposo (g)
- Ingesta dietaria (g/día)
- Ingesta energética (Kcal/día)

Variables dependientes

- Histología de muestras de hígado (cualitativa y cuantitativa)
- Grasa total en hígado (g de grasa/100 g de hígado)
- Triacilglicéridos (TAG) hepáticos (mg/g de hígado)
- Niveles séricos de ácidos grasos libres (AGL) (μM)
- Perfil de ácidos grasos hepáticos totales (% de esteres metílicos de ácidos grasos (% EMAG))
- Capacidad antioxidante sérica (mM equivalentes Trolox)
- Glutación total en hígado expresado en equivalentes de glutación total ($\mu\text{mol/g}$ de hígado)
- 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
- Carbonilos proteicos (mmol/mg de proteína)
- Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) séricos (malondialdehído (MDA) μM)

- TBARs en hígado (μM de MDA/mg de hígado)
- 8-isoprostanos en hígado (pg/mg de hígado)
- Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) sérico (pg/ml)
- Interleucina-6 (IL-6) sérica (pg/ml)
- Glicemia sérica (mg/dL)
- Insulinemia sérica ($\mu\text{U/mL}$)
- Índice HOMA-IR
- TAG séricos (mg/dL)
- Colesterol total sérico (mg/dL)
- Colesterol LDL sérico (mg/dL)
- Colesterol HDL sérico (mg/dL)

3.3. Definición del tamaño muestral

Para determinar el número de animales se utilizó como variable crítica el cambio en el contenido lipídico hepático total (reducción del 50%). El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando el *software* estadístico G-Power 3.1, considerando el modelo experimental y tipo de intervención, un tamaño del efecto del 50%, significancia estadística de $p < 0.05$ y un poder del 90%, lo que indicó un tamaño muestral de 11 animales por grupo experimental, con un número total de 88 animales.


Este tamaño muestral consideró las normas internacionales de bioética para el trabajo con animales y corresponde al número de animales necesarios para obtener resultados válidos. El protocolo fue evaluado y aprobado por el comité de Bioética para la investigación en animales de la Universidad de Chile. Protocolo - CBA # 0580 FMUCH.

De cada animal se obtuvieron muestras de sangre e hígado suficientes para cumplir con los objetivos propuestos en el proyecto. Siendo importante señalar que el esquema de trabajo presentado (**Tabla 1**) permitió utilizar un mismo animal para estudios sanguíneos y hepáticos, con lo cual se logró un mayor aprovechamiento y una disminución significativa en el número de animales experimentales.

3.4. Protocolo de intervención


Ratones macho de la cepa C57BL/6J de 21 días de edad después del destete y con un peso inicial de entre 12 y 15 gramos fueron obtenidos desde el bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. 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.

	MEDICION	CANTIDAD DE MUESTRA	
SUERO	AGL	10 µl	
	Capacidad antioxidante	1 µl (Dilución 1:10)	
	TBARs	100 µl	
	TNF-α	4 µl (Dilución 1:25)	
	IL-6	40 µl (Dilución 1:2)	
	Glicemia	5 µl	
	Insulinemia	25 µl	
	TAG	5 µl	
	Colesterol Total	5 µl	
	Colesterol LDL	7 µl	
	Colesterol HDL	7 µl	
	HÍGADO	Histología	150 mg
		Grasa total, TAG, 8-isoprostanos	100 mg
Perfil de ácidos grasos totales		250 mg	
TBARs		50 mg	
Proteínas oxidadas		100 mg	
Glutación total		50 mg	
GSH		50 mg	

Tabla 1. Plan de trabajo para mediciones según tipo de muestra 

Luego de una semana de aclimatación en el bioterio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, los ratones fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los ocho grupos experimentales (**Tabla 2**) y tuvieron acceso libre a dieta y agua, con control de la temperatura ambiente y de los ciclos de luz-oscuridad (12 horas cada uno) por un periodo de 12 semanas. Durante este periodo los ratones recibieron la suplementación dietaria (vía oral) según grupo experimental y los grupos control recibieron en cantidades isovolumétricas solución salina normal (SSN) según el grupo experimental al que fueron asignados.

GRUPO EXPERIMENTAL	TRATAMIENTO
Grupo 1	Dieta control (DC) + SSN (50 mg/kg/día)
Grupo 2	DC + DHA (50 mg/kg/día)
Grupo 3	DC + AOEV (50 mg/kg/día)
Grupo 4	DC + DHA (50 mg/kg/día) + AOEV (50 mg/kg/día)
Grupo 5	Dieta alta en grasa (DAG) + SSN (50 mg/kg/día)
Grupo 6	DAG + DHA (50 mg/kg/día)
Grupo 7	DAG + AOEV (50 mg/kg/día)
Grupo 8	DAG + DHA (50 mg/kg/día) + AOEV (50 mg/kg/día)

Tabla 2. Grupos experimentales según tratamiento 

Semanalmente se evaluó y registró la ingesta dietaria. Al cumplir las 12 semanas de intervención los animales fueron puestos en ayuno (6 a 8 horas) y posteriormente se aplicó sedación por inhalación con Isoflurano (liquido anestésico por inhalación. Reg ISP. N° F-10.142/11. Baxter). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardiaca, de las

cuales se separó el suero mediante centrifugación a 600 g por 10 minutos, y fueron almacenadas a -80°C para luego ser utilizadas en las respectivas determinaciones. Simultáneamente, los hígados fueron extraídos y pesados. Una vez se registró su peso, se les extrajo una muestra de tejido hepático para su análisis histológico y el resto del tejido fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado -80°C hasta su utilización en las respectivas determinaciones.

Las mediciones fueron desarrolladas en el laboratorio de Bioquímica Nutricional del Departamento de Nutrición, el laboratorio de Medicina Molecular del Departamento de Tecnología Médica y en el laboratorio de Estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

▪ **Tiempo de intervención**

Con el fin de inducir las alteraciones metabólicas, EO, inflamación y primordialmente la esteatosis hepática por la dieta alta en grasa (DAG) y evaluar los efectos de la suplementación dietaria, se determinó un periodo de intervención de 12 semanas basados en resultados de estudios previos realizados en el laboratorio en los cuales se encontró que un plazo de 12 semanas fue suficiente para generar injuria hepática por la intervención con una DAG certificada (Research Diet INC, rodent diet whit 60% Kcal% fat, product data D12492. USA)⁵³⁻⁵⁵.

▪ **Dieta y suplementación**

Las dietas que fueron utilizadas se encuentran certificadas (Research Diet INC) y por ende son dietas estandarizadas en aporte de micro y macronutrientes, lo que hace que el aporte de nutrientes sea suficiente para los ratones.

Dieta control (DC)

La DC (Research Diet INC, rodent diet with 10% Kcal% fat, product data D12492. USA) aporta el 10% de las calorías a partir de la grasa. En la **Tabla 3** se presenta la composición nutricional de la DC según indicaciones del fabricante.

Dieta alta en grasa (DAG)


La DAG (Research Diet INC, rodent diet whit 60% Kcal% fat, product data D12492. USA) aporta el 60% de las calorías a partir de la grasa, es suficiente en proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, en donde el único cambio es el reemplazo de carbohidratos por grasa, lo cual se considera el modelo más recomendado para inducir enfermedad por hígado graso no alcohólico (esteatosis hepática) de origen nutricional. Además, esta dieta se encuentra certificada como un modelo para inducir EHGNA de

origen nutricional. En la **Tabla 4** se presenta la composición nutricional de la DAG según indicaciones del fabricante.

Dieta control (DC)		
Macronutrientes	% g totales	% kcal totales
Proteínas	19,2	20
Hidratos de carbono	67,3	70
Lípidos	4,3	10
Total		100
Kcal/g	3,85	
Ingredientes	g	Kcal
Caseína	200	800
L-Cistina	3	12
Maicena	315	1260
Maltodextrina	35	140
Sacarosa	350	1400
Celulosa	50	0
Aceite de soja	25	225
Manteca de cerdo	20	180
Mezcla de minerales	10	0
Fosfato Dicálcico	13	0
Carbonato de Calcio	5,5	0
Citrato de Potasio	16,5	0
Mezcla de Vitaminas	10	40
Bitartrato de Colina	2	0
Tartracina	0,05	0
Total	1055,05	4057

Tabla 3. Aporte nutricional y composición de la dieta control 

Dieta alta en grasa (DAG)		
Macronutrientes	% g totales	% kcal totales
Proteínas	26,2	20
Hidratos de carbono	26,3	20
Lípidos	34,9	60
Total		100
Kcal/g	5,24	
Ingredientes	g	Kcal
Caseína	200	800
L-Cistina	3	12
Maicena	0	0
Maltodextrina	125	500
Sacarosa	68,8	275,2
Celulosa	50	0
Aceite de soja	25	225
Manteca de cerdo	245	2205
Mezcla de minerales	10	0
Fosfato Dicálcico	13	0
Carbonato de Calcio	5,5	0
Citrato de Potasio	16,5	0
Mezcla de Vitaminas	10	40
Bitartrato de Colina	2	0
Colorante Azul	0,05	0
Total	773,85	4057

Tabla 4. Aporte nutricional y composición de la dieta alta en grasa 


Perfil de ácidos grasos totales de las dietas

Tanto para la DC como la para DAG se determinó el perfil de AG totales mediante cromatografía de gas-liquida (**Tabla 5**). Es importante aclarar que estas dietas son libres de EPA y de DHA.

Ácido docosahexaenoico (DHA)

El DHA fue aportado como aceite de microalgas. El producto usado (Life- DHA Martek, USA) es rico en DHA y la dosis de administración oral fue de 50 mg/kg/día. Se definió una dosis de DHA inferior a la reportada en estudios preliminares^{55,56}, fundamentado en la evidencia de que altos niveles de EO han sido asociados con el consumo de grandes cantidades de aceite de pescado, llevando a depleción en tejidos de enzimas antioxidantes lo cual exacerba el daño hepático³⁷, dado que EPA y DHA son oxidados fácilmente en comparación con el AL y el ácido oleico. De este modo, se logró estudiar el efecto de una dosis menor de DHA en conjunto con un antioxidante, en este caso AOEV, buscando así potenciar los efectos benéficos de ambos componentes en la EHGNA.

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 Tetradecenoico	0.000	0.000	0.000	0.000
C16:1 Ácido Palmitoleico	0.789	0.031	1.471	0.453
C18:1 Ácido Oleico	29.616	1.145	36.476	11.238
C20:1n9 Ácido Eicosaenoico	0.405	0.016	0.598	0.184
C22:1n9 Ácido Erucico	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				
C18:2n6 Ácido Linoleico	38.172	1.476	23.830	7.341
C18:3n6 Ácido γ -Linolenico	0.000	0.000	0.000	0.000
C18:3n3 Ácido α -Linolenico	4.331	0.167	1.761	0.543
C20:2n6 Ácido Eicosadienoico	0.341	0.013	0.698	0.215
C20:3n6 Ácido Di-homo- γ -Linolenico	0.000	0.000	0.091	0.028
C20:3n3 Ácido 11,14,17 Eicosatrienoico	0.000	0.000	0.125	0.038
C20:4n6 Ácido Eicosatetraenoico	0.113	0.004	0.216	0.067
C20:5n3 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	0.000	0.000	0.000	0.000
C22:5n3 Ácido Docosapentaenoico	0.000	0.000	0.066	0.020
C22:6n3 Ácido Docosahexaenoico (DHA)	0.000	0.000	0.000	0.000
Total Ac. Grasos Poliinsaturados	42.957	1.661	26.788	8.253

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos totales de la dieta control y de la dieta alta en grasa. 

Así mismo, es importante resaltar que el DHA utilizado se encuentra en forma de triacilglicéridos y no en la forma de derivados sintéticos como ésteres etílicos, lo cual representa una mayor biodisponibilidad de estos AG⁵⁷.

Para el DHA se determinó el perfil de AG totales mediante cromatografía de gas-liquida (Tabla 6).

Aceite de oliva extra virgen (AOEV)

El producto usado de AOEV fue obtenido del valle de Huasco, Chile y la dosis de administración fue a su vez de 50mg/kg/día. Para el AOEV se determinó el perfil de AG totales mediante cromatografía de gas-liquida (Tabla 6).

Perfil de ácidos grasos		
	DHA	AOEV
	g/100g de dieta	g/100 g de dieta
Ácidos Grasos Saturados		
C10:0 Ácido Decanoico	1,211	0,000
C12:0 Ácido Dodecanoico	5,023	0,000
C14:0 Ácido Tetradecanoico	12,010	0,000
C16:0 Ácido Palmítico	10,669	11,779
C18:0 Ácido Estearico	0,371	1,491
C20:0 Ácido Eicosanoico	0,000	0,349
C22:0 Ácido Docosanoico	0,086	0,131
C24:0 Ácido Tetracosanoico	0,000	0,082
Total Ac. Grasos Saturados	29,371	13,833
Ácidos Grasos Monoinsaturados		
C14:1 Ácido Tetradecenoico	0,283	0,000
C16:1 Ácido Palmíticooleico	2,499	0,855
C18:1 Ácido Oleico	11,356	70,512
C20:1n9 Ácido Eicosanoico	0,000	0,390
C22:1n9 Ácido Erucico	0,000	0,000
C24:1 Ácido Tetracosanoico	0,000	0,000
Total Ac. Grasos Monoinsat.	14,137	71,756
Ácidos Grasos Poliinsaturados		
C18:2n6 Ácido Linoleico	0,184	5,255
C18:3n6 Ácido γ -Linolenico	0,000	0,000
C18:3n3 Ácido α -Linolenico	0,000	0,776
C20:2n6 Ácido Eicosadienoico	0,000	0,000
C20:3n6 Ácido Di-homo- γ -Linolenico	0,000	0,000
C20:3n3 Ácido 11,14,17 Eicosatrienoico	0,000	0,000
C20:4n6 Ácido Eicosatetraenoico	0,000	0,000
C20:5n3 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	0,000	0,000
C22:5n3 Ácido Docosapentaenoico	0,542	0,000
C22:6n3 Ácido Docosahexaenoico (DHA)	41,588	0,000
Total Ac. Grasos Poliinsaturados	42,313	6,031

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos totales del DHA y del AOEV

Igualmente, se consideró el aporte de vitamina E del AOEV, dada la evidencia científica que recomienda el uso de esta en pacientes con EHNA (Evidencia Nivel-A, fuerza-2) ya que mejora parámetros biológicos e histológicos^{58,59}. En la **Tabla 9** se presenta el aporte de los principales antioxidantes según la caracterización dada por el fabricante.

Caracterización de antioxidantes en el AOEV		
Variedad	Polifenoles totales (mg/1000g)	Alfa-tocoferol (mg/1000g)
Kalamata	859	290

Tabla 7. Caracterización de antioxidantes en el AOEV

3.5. Descripción de los métodos

3.5.1. Evaluación de la esteatosis hepática

Se realizó mediante:

- **Evaluación histológica:** cortes de hígado fijados en formaldehído incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina fueron evaluados por microscopia óptica. Se realizó valoración cuantitativa y cualitativa de las muestras. Cualitativamente, en función de la esteatosis presente en las muestras la cual se clasificó como micro o macrovesicular, y respecto a la inflamación estas se clasificaron como ausente, leve, moderada o severa⁶⁰. Cuantitativamente la acumulación hepática de lípidos fue medida como % de células con infiltración de vesículas lipídicas.
- **Cuantificación del contenido de grasa hepática total:** se determinó mediante gravimetría de acuerdo con la técnica descrita por Blygh & Dyer (1959)⁶¹. Los valores fueron expresados como g de grasa/100 g de hígado.
- **Cuantificación de TAG hepáticos:** se utilizó el método de hidrólisis enzimática de TAG a glicerol y AGL seguido de una medición colorimétrica del glicerol liberado. Para esto se aplicó el kit (Trygliceride Colorimetric Assay Kit. Ítem No. 10010303) de Chayman Chemical Company en muestras de hígado. Previamente, los hígados fueron homogeneizados en un diluyente estándar junto con un inhibidor de proteasa. Los valores fueron expresados como mg/g de hígado.
- **Cuantificación de AGL en suero:** se realizó por medio de un ensayo fluorométrico usando el kit (Free Fatty Acid Fluorometric Assay Kit. Ítem No. 700310) de Chayman Chemical Company. Los valores fueron expresados como μM .
- **Determinación del perfil de AG por análisis cromatográfico:** la extracción de lípidos totales hepáticos se realizó de acuerdo con el método descrito por Bligh & Dyer⁶¹, en donde los cortes de hígado (250 mg por muestra) fueron homogeneizadas en ambiente frío utilizando cloroformo/metanol (2:1 v/v) y butilhidroxitolueno (BHT; 0.01% w/v) como antioxidante. A continuación, al producto homogeneizado se adicionó H₂O bidestilada y Cloruro de Magnesio 0,5 N y por centrifugación (3000 rpm x 10 minutos) se obtuvo todo el cloroformo (fracción oleosa). Luego, mediante extracción del solvente con nitrógeno gaseoso se logró obtener el contenido total de grasa hepática (triacilglicéridos, mono y diacilglicéridos,

fosfolípidos, ácidos grasos libres, colesterol esterificado y libre). Posteriormente, se prepararon los esteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) según la técnica descrita por Morrison y Smith⁶². Así, los lípidos saponificables obtenidos del tejido hepático fueron derivados a esteres metílicos mediante hidrólisis alcalina e hidrólisis ácida utilizando NaOH saturado en metanol, trifluoruro de boro (BF₃) al 12% en metanol e hidróxido de sodio en metanol 0.5N. Finalmente, los EMAG fueron extraídos y recolectados para ser cuantificados mediante cromatografía gas-líquida en un equipo Agilent Hewlett-Packard (modelo 7890A, CA, USA). Los AG fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención, utilizando como estándar interno el AG C23:0 (Nu-Chek Prep Inc, Elysian MN, USA). Así, los resultados fueron expresados como porcentaje de esteres metílicos de ácidos grasos (% EMAG), es decir; porcentaje de área de metil éster reconocido de cada AG determinado con relación al ácido graso tricosanoico (C23:0) utilizado como patrón interno.

3.5.2. Evaluación del estrés oxidativo y capacidad antioxidante

Se realizó mediante:

- **Capacidad antioxidante sérica:** se determinó por medio de un ensayo colorimétrico usando el kit (Antioxidant Assay Kit. Ítem No. 709001) de Chayman Chemical Company. Los valores fueron expresados como mM equivalentes Trolox.
- **Niveles hepáticos de glutatión total, glutatión reducido y glutatión oxidado:** este ensayo está basado en la reacción del glutatión (GSH) con DNTB (5,5'-dithio-bis (2-ácido nitrobenzoico)) también conocido como el reactivo de Ellman que produce el cromóforo TNB (5-thio-2-ácido nitrobenzoico) y glutatión-TNB oxidado aducto (GS-TNB), que tienen una máxima absorbancia a 412 nm. La tasa de formación de TNB, medida a 412 nm, es proporcional a la concentración de GSH en el plasma. El producto disulfuro (GS-TNB) es luego reducido por la glutatión reductasa (GR) en la presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada (NADPH), reciclando GSH de nuevo en la reacción (**Figura 3**).

Debido a que la GR reduce el glutatión disulfuro (GSSG) formado en 2 GSH, la cantidad de glutatión medido representa la suma del glutatión reducido (GSH) y del glutatión oxidado (GSSG) en la muestra.

$$[GSH]_{total} = [GSH] + 2 \times [GSSG]$$

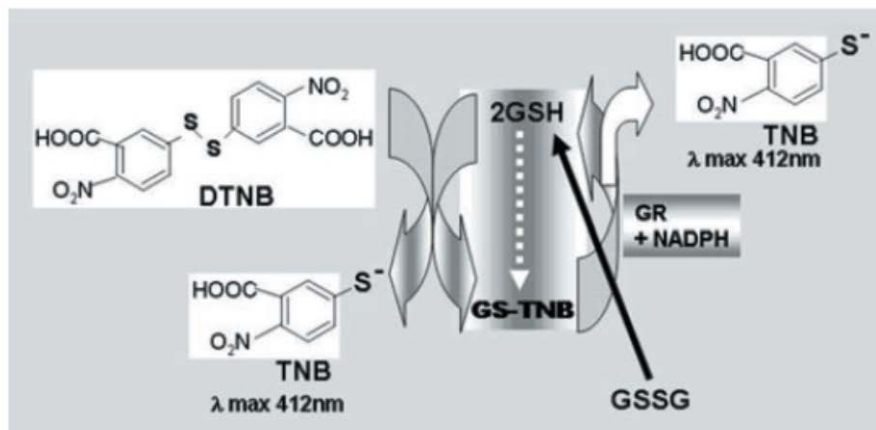


Figura 3. Ensayo para la determinación cuantitativa de los niveles de glutatión y de disulfuro de glutatión usando el método de reciclaje enzimática.

Fuente: Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–65 (2006)

La tasa de cambio en la absorbancia $\Delta A_{412\text{nm}} \text{min}^{-1}$ está hecha para ser lineal para la conveniencia y consistencia de la medición, y es linealmente proporcional a la concentración total de GSH. La concentración de una muestra conocida es determinada mediante el cálculo de la ecuación lineal o de la curva de regresión generada para diferentes estándares de GSH⁶³. Así, el contenido total de glutatión de la muestra es determinado por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH.

El glutatión oxidado (GSSG) hepático también fue determinado por el método de reciclaje enzimático mencionado anteriormente. Sin embargo, las muestras fueron previamente tratadas con 2-vinilpiridina; compuesto que se une al GSH e impide su oxidación, así es utilizado en las muestras para eliminar el glutatión reducido (GSH), dejando solo la forma oxidada como único sustrato del ensayo.

Por último, el glutatión reducido (GSH) fue calculado restando el glutatión oxidado (GSSG) del glutatión total. Los resultados de glutatión total, GSH y GSSG se expresaron como $\mu\text{mol/g}$ de hígado. La razón GSH/GSSG se determinó aplicando la fórmula:

$$\text{Razon} \frac{\text{GSH}}{\text{GSSG}} = \frac{\text{GSH}_t - 2\text{GSSG}}{\text{GSSG}}$$

Previo a las mediciones, las muestras de hígado (50 mg) fueron lavadas con una solución Cloruro de Sodio al 0.9% y homogenizadas en una solución de extracción de ácido Sulfosalicílico (SSA) al 0.6% para obtener los sobrenadantes. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol/g}$ de hígado.

- **Proteínas oxidadas en hígado:** previo a la determinación de los valores de carbonilos proteicos, se realizó la cuantificación de proteínas en las muestras de tejido (100 mg) basados en el método de Bradford (1976)⁶⁴ que consiste en determinar la concentración de proteínas solubles mediante la adición de un colorante ácido a la solución de proteínas y la subsecuente medición a 590 nm con el espectrofotómetro, en donde la comparación con respecto a una curva estándar provee una medición relativa de la concentración de proteínas. Posteriormente se ajustó la concentración total de proteínas a 7.5mg/ml por muestra. Finalmente, la concentración de carbonilos proteicos en las muestras de hígado se determinó usando el kit (Protein Carbonyl Fluorometric Assay Kit. Ítem No.700490) de Cayman Chemical Company. Los valores fueron expresados como mmol de carbonilos proteicos/mg de proteína.
- **Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbiturico (TBARS):** TBARS séricos y hepáticos fueron determinados mediante un ensayo colorimétrico usando el kit (TBARS Assay Kit. Ítem No. 10009055) de Cayman Chemical Company. Para las mediciones hepáticas, 50 mg de tejido fueron previamente homogenizados con *buffer* RIPA y un inhibidor de proteasas, posteriormente centrifugados, para una vez obtenido el sobrenadante realizar las mediciones. Los valores fueron expresados como μM de MDA en suero y μM de MDA/mg de hígado.
- **8-isoprostanos en hígado:** fueron determinados mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis (EIA) competitivo usando el kit (8-Isoprostane EIA Kit. Ítem No. 516351) de Cayman Chemical Company. Los valores fueron expresados como pg/mg de hígado.

3.5.3. Evaluación de la inflamación

Se realizó mediante:

- **Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α):** los niveles de TNF- α fueron determinados en muestras de suero mediante la técnica EIA no competitivo tipo

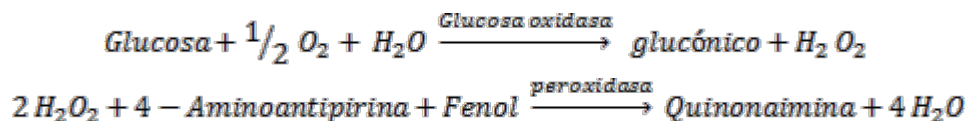
sándwich, usando el kit (TNF- α (mouse) EIA KIT. Ítem No. 500850) de Chayman Chemical Company. Los valores fueron expresados como pg/ml de suero.

- **Interleucina-6 (IL-6):** los niveles IL-6 fueron determinados en muestras de suero mediante la técnica EIA no competitivo tipo sándwich, usando el kit (Interleukin-6 (mouse) EIA KIT. Ítem No. 583371) de Chayman Chemical Company. Los valores fueron expresados como pg/ml de suero.

3.5.4. Evaluación de alteraciones metabólicas e insulinoresistencia

Se realizó mediante:

- **Determinación de la insulinoresistencia:** la glicemia se cuantificó en muestras de suero usando el kit comercial GLUCOSA (GLUCOSA OXIDASA/PEROXIDASA) de ByoSystems. Esta técnica se fundamenta en las siguientes reacciones acopladas que dan como resultado un complejo coloreado (quinonaimina) que se mide por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm:



Los resultados de glicemia fueron expresados como mg/dL. Paralelamente, se realizó medición de glicemia capilar, extrayendo sangre de la cola de los ratones previa sedación y usando las tiras reactivas y el lector OneTouch Ultra de Jhonson & Jhonson. De igual forma, Los resultados fueron expresados como mg/dL.

La determinación de la insulina se realizó en muestras de suero mediante la técnica EIA no competitivo usando el kit (Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA). Este ensayo se basa en la técnica de sándwich directo según la que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antígenos separados de la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados en peroxidasa y anticuerpos anti-insulina ligados con los pocillos de micro filtración. El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado. El conjugado enzimático unido a la molécula se detecta por reacción con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La reacción se para añadiendo un ácido para dar un punto final colorimétrico que se lee por espectrofotometría. Los valores se expresaron como $\mu\text{U/mL}$.

Posteriormente, la resistencia a la insulina se evaluó por medio de El Modelo de Determinación de la Homeostasis (HOMA-IR), desarrollado por Matthews (1985)⁶⁵, el cual estima la homeostasis basal mediante las concentraciones en ayuna de la glucosa y de la insulina, desarrollando la siguiente fórmula:

$$HOMA - IR = \frac{\text{insulinemia en ayunas } \left(\frac{\mu U}{ml}\right) * \text{glicemia en ayunas } \left(\frac{mg}{dL}\right)}{405}$$

- **Determinación del perfil lipídico sérico:** los niveles de TAG (kit triglicéridos de ByoSystems), colesterol total (kit colesterol oxidasa peroxidasa de ByoSystems) y colesterol HDL (kit colesterol HDL direct de ByoSystems) fueron determinados en muestras de suero por técnica espectrofotométrica usando los kit mencionados anteriormente; en donde se realizó la cuantificación espectrofotométricamente mediante reacciones acopladas. La lectura de los resultados se realizó utilizando el analizador semiautomático BioSystems BTS-350.

Los niveles de colesterol LDL en suero se determinaron aplicando la fórmula de Friedewald (1972)⁶⁶

$$C_{LDL} = C_{plasma} - C_{HDL} - \frac{TG}{5}$$

Los valores fueron expresados como mg/dL

3.6. Análisis estadístico

La evaluación de la distribución normal de las variables se realizó mediante el Test de Shapiro Wilk. Dado que las variables no presentaron distribución normal y considerando que en cada grupo se tenía un n menor de 30 se aplicó estadística no paramétrica, por lo cual los valores se presentan como mediana y rango intercuartílico.

Las diferencias fueron evaluadas por medio de: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con DC y exclusivamente entre los grupos con DAG y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV).

Los estudios de correlación se realizaron aplicando el Test de Spearman. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Para el análisis estadístico se utilizó el *software* GraphPad Prism version 5.0, San Diego, CA, USA.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de las intervenciones en características antropométricas y de ingesta en los grupos experimentales

Las características generales en los grupos experimentales se presentan en la **Tabla 8**.


Al inicio del estudio no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos experimentales. Luego de 12 semanas de intervención el peso fue significativamente mayor en el grupo alimentado con DAG respecto al grupo DAG+DHA, y todos los grupos expuestos a DAG tuvieron un peso significativamente mayor y por ende una ganancia total de peso significativamente mayor que sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV). Con relación al peso del hígado, no se observaron diferencias entre los grupos con DC y entre los grupos con DAG este fue menor en el grupo que recibió suplementación con DHA con relación al grupo que recibió suplementación conjunta de DHA con AOEV o solo DAG, y solo el grupo con DAG y suplementación conjunta (DHA+AOEV) presentó un mayor peso en comparación con su grupo control ($p=0.0181$). Por el contrario, el peso del tejido adiposo entre los animales alimentados con DAG fue significativamente menor en aquellos que recibieron cualquier tipo de suplementación (DHA, AOEV o DHA+AOEV) en comparación con el grupo tratado solo con DAG. Además, el peso del tejido adiposo tras 12 semanas de tratamiento fue mayor ($p<0.05$) en todos los grupos alimentados con DAG frente a sus respectivos controles.

No se observaron diferencias significativas en la ingesta dietaria ni energética entre los grupos alimentados con DC, pero entre los grupos alimentados con DAG fue significativamente mayor para el grupo DAG+DHA con respecto al grupo DAG+DHA+AOEV. Como era de esperar, la ingesta energética fue mayor ($p<0.05$) en todos los grupos alimentados con DAG en relación con sus respectivos controles.

4.2. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros de esteatosis hepática

Análisis histológico

El análisis de placas histológicas hepáticas de los grupos experimentales se presenta en las **Figuras 4 y 5**. La alimentación con DAG durante 12 semanas indujo un cuadro de esteatosis hepática micro y macrovesicular, presentándose una histoarquitectura alterada con importantes focos de esteatosis superior al 60% de los campos estudiados (**Figura 5 E**), respecto a los grupos alimentados con DC (**Figura 4**) que presentaron una histoarquitectura normal, sin presencia de focos de esteatosis hepática.

Tabla 8. Características generales en los grupos experimentales 

	Grupos experimentales									
	DC	DC+ DHA	DC+ AOEV	DC+ DHA+ AOEV	Valor <i>p</i>	DAG	DAG+ DHA	DAG+ AOEV	DAG+DHA +AOEV	Valor <i>p</i>
Peso Inicial (g)	13.7 (12.5-15.6) a	13.6 (12.9-15.4) a	14.4 (13.5-6.3) a	14.2 (13.5-16.3) a	0.3601	15.1 (14.4-16.2) a	14.0 (14.5-14.9) a	14.5 (13.9-15.2) a	14.3 (13.5-14.6) a	0.1111
Peso Final (g)	28.6 (26.3-30.2) a	27.1 (25.6-29.0) a	27.3 (25.2-28.8) a	27.5 (26.4-29.0) a	0.6151	40.2 (38.9-43.1) a*	36.5 (38.8-38.5) b*	39.0 (36.8-40.2) a,b*	38.1 (37.4-39.2) a,b*	0.0002
Ganancia total de peso (g)	14.4 (11.7-17.3) a	13.9 (12.0-14.7) a	12.5 (10.7-14.4) a	12.2 (11.2-13.8) a	0.2701	25.4 (23.8-27.3) a*	22.3 (19.3-23.8) b*	24.0 (22.8-25.5) a,b*	24.6 (22.8-25.4) a,b*	0.0017
Peso Hígado (g)	1.07 (0.97-1.21) a	0.99 (0.95-1.10) a	1.0 (0.98-1.03) a	0.95 (0.87-1.03) a	0.2356	1.15 (0.99-1.23) a	0.94 (0.86-0.99) b	1.12 (0.96-1.2) a,b	1.15 (0.98-1.23) a*	0.0043
Peso Tejido Adiposo (g)	0.6 (0.6-0.8) a	0.7 (0.6-0.8) a	0.8 (0.7-1.0) a	0.7 (0.6-0.9) a	0.1970	2.3 (2.0-2.4) a*	1.8 (1.7-1.9) b*	1.7 (1.6-1.9) b*	1.4 (1.4-1.5) b*	0.0001
Ingesta dietaria (g/día)	3.6 (2.2-4.4) a	2.1 (1.9-2.5) a	1.83 (1.7-2.2) a	3.1 (1.4-3.4) a	0.0937	3.4 (3.1-3.5) a,b	3.8 (3.2-4.0) a*	3.0 (2.8-2.2) a,b*	2.7 (2.3-3.0) b	0.0136
Ingesta energética (Kcal/día)	13.7 (8.5-16.3) a	8.2 (7.3-9.7) a	7.0 (6.7-8.5) a	11.8 (5.4-13.2) a	0.0937	17.7 (16.3-18.6) a,b*	19.9 (16.5-21.2) a*	15.7 (14.8-16.7) a,b*	14.2 (12.1-15.5) b*	0.0136

Los valores se presentan como mediana (rango intercuartílico). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre pares.

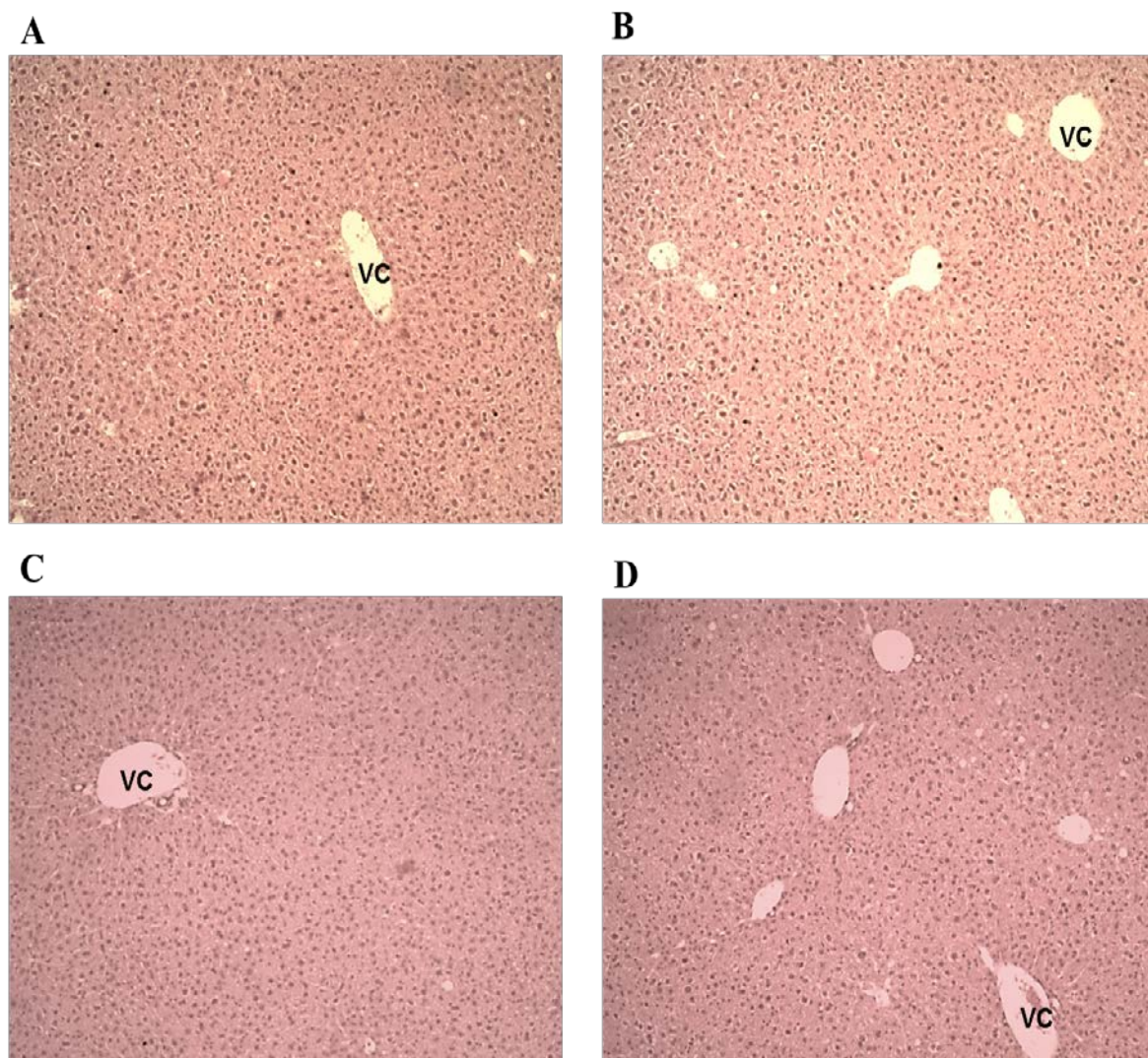



Figura 4. Microscopía de cortes de hígado de ratones en tratamiento con dieta control (DC) (A), DC+DHA (B), DC +AOEV (C), DC+DHA+AOEV (D). Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina. Vena centrolobulillar (VC) 

Confirmando la presencia de esteatosis macrovesicular, en los animales alimentados con DAG se observó un desplazamiento del núcleo de los hepatocitos desde el centro a la periferia; situación que no se encontró en aquellos alimentados con DC. Si bien los grupos DAG+DHA y DAG+AOEV (**Figura 5 F-G**) presentaron una histología alterada, en estos la presencia de focos de esteatosis micro y macrovesicular fue inferior que en el grupo con DAG (40% y 50% de los campos estudiados respectivamente). Interesantemente, se observó una reducción en el grado de esteatosis hepática en aquellos animales con DAG que se encontraban tratados con suplementación conjunta (DHA+AOEV) (**Figura 5 H**), en donde la presencia de focos de esteatosis micro y macrovesicular fue del 10 al 20% de los campos estudiados.

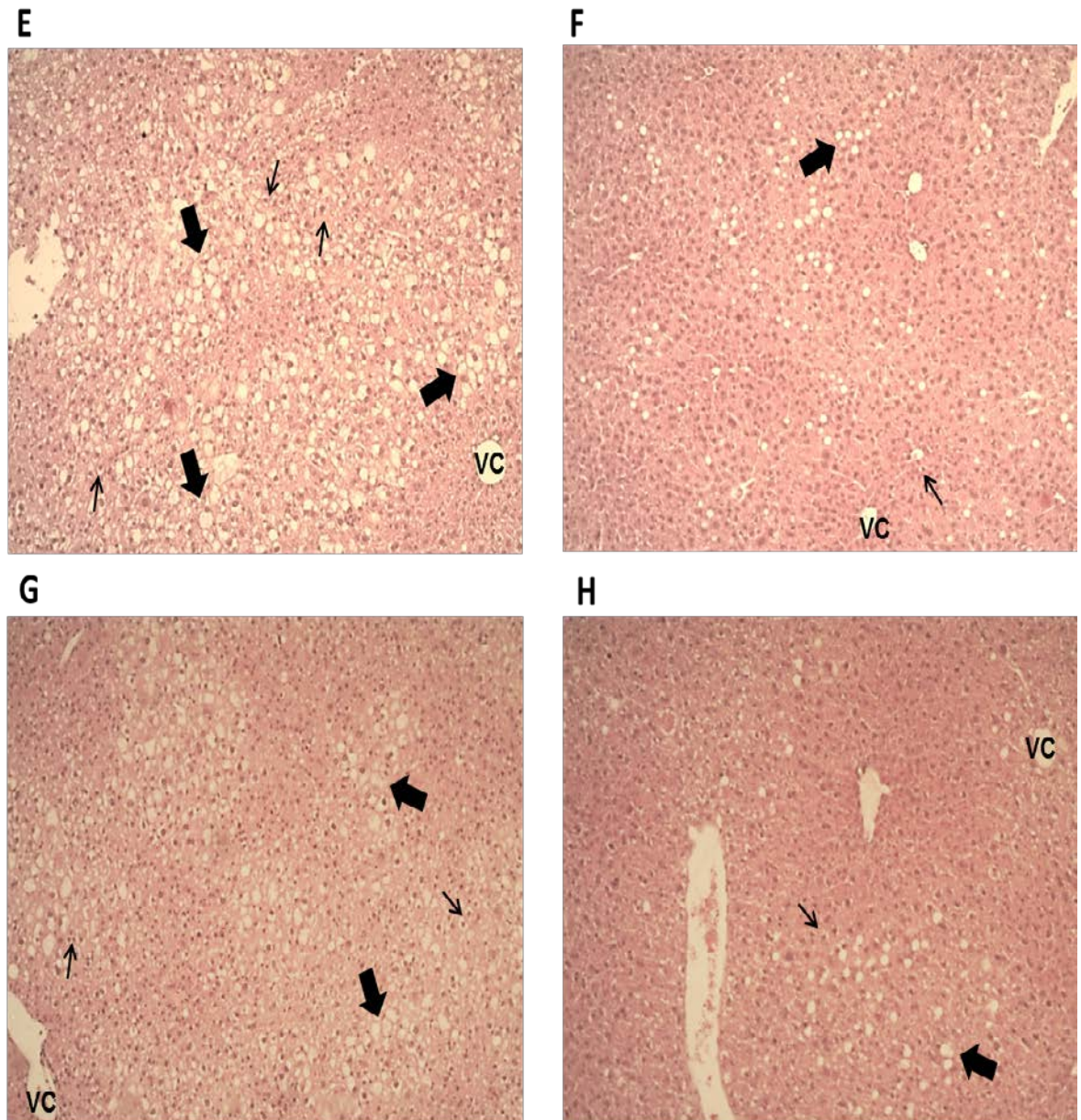


Figura 5. Microscopía de cortes de hígado de ratones en tratamiento con dieta alta en grasa (DAG) (E), DAG+DHA (F), DAG+AOEV (G), DAG+DHA+AOEV (H). Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina. VC (Vena centrolobulillar), → (esteatosis microvesicular), → (esteatosis macrovesicular)

Grasa hepática total

Entre los grupos alimentados con DC, se observó que los animales que recibieron DHA+AOEV presentaron un contenido mayor de grasa hepática que los suplementados solamente con DHA ($p=0.0184$), no obstante, esto no fue indicativo de esteatosis hepática

(Figura 6 A). Por el contrario, entre los grupos alimentados con DAG aquellos con suplementación conjunta (DHA+AOEV) exhibieron un contenido de grasa hepática en un 49% inferior con relación al tratamiento solo con DAG ($p=0.0006$); alcanzándose a normalizar el contenido de grasa hepática total con relación a su grupo control. Además, la exposición a la DAG generó que los grupos solo DAG y DAG+DHA presentaran un contenido de grasa hepática mayor que sus respectivos controles ($p<0.05$).

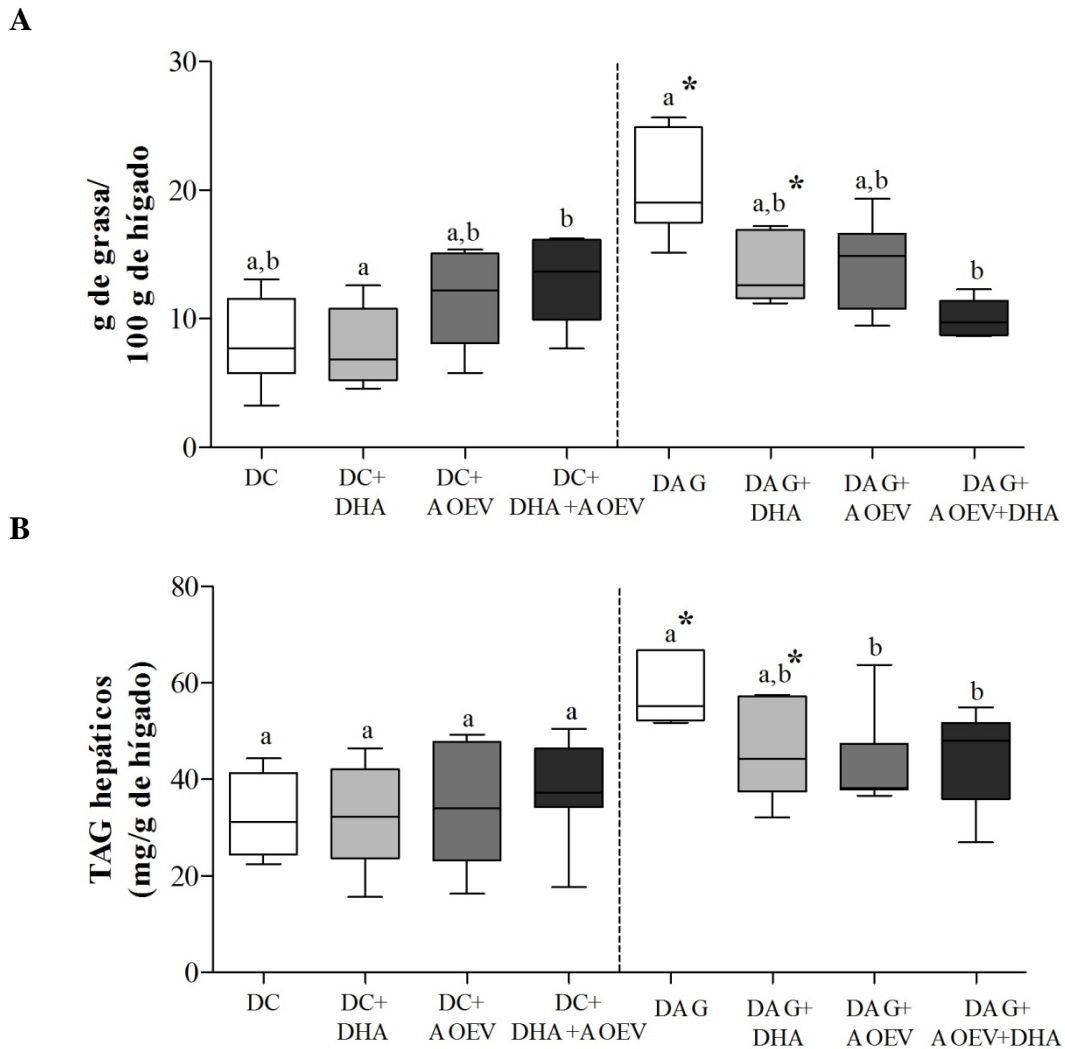


Figura 6. Contenido total de grasa hepática (A) y contenido total de triacilglicéridos (TAG) hepáticos (B) en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p<0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre pares.

TAG hepáticos

No se encontraron diferencias significativas en el contenido total de TAG entre los grupos alimentados con DC. No obstante, entre los grupos alimentados con DAG (**Figura 6 B**), en los grupos DAG+AOEV y DAG+DHA+AOEV los niveles de TAG hepáticos fueron un 31% y 13% respectivamente menores con relación al grupo solo DAG ($p=0.0106$); alcanzándose a normalizar el contenido de TAG hepáticos para ambos grupos con relación a sus respectivos controles. Tanto el grupo DAG como el grupo DAG+DHA exhibieron un contenido hepático de TAG mayor que sus respectivos controles ($p<0.05$). Cabe señalar que en el grupo de animales sometidos exclusivamente a DAG la acumulación de lípidos en forma de TAG dentro de los hepatocitos representó el 5% del peso del hígado; situación con la que se confirmó la inducción de la esteatosis hepática a través del modelo experimental.

AGL séricos

A nivel de los grupos alimentados con DC no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de AGL (**Figura 7**), pero entre los grupos alimentados con DAG los niveles séricos de AGL fueron un 67% inferiores para el grupo DAG+DHA y un 62% inferiores para el grupo con suplementación conjunta (DHA+AOEV) con relación al grupo solo DAG ($p=0.0051$). Sin embargo, todos los grupos alimentados con DAG exhibieron niveles séricos de AGL mayores que sus respectivos controles ($p<0.05$).

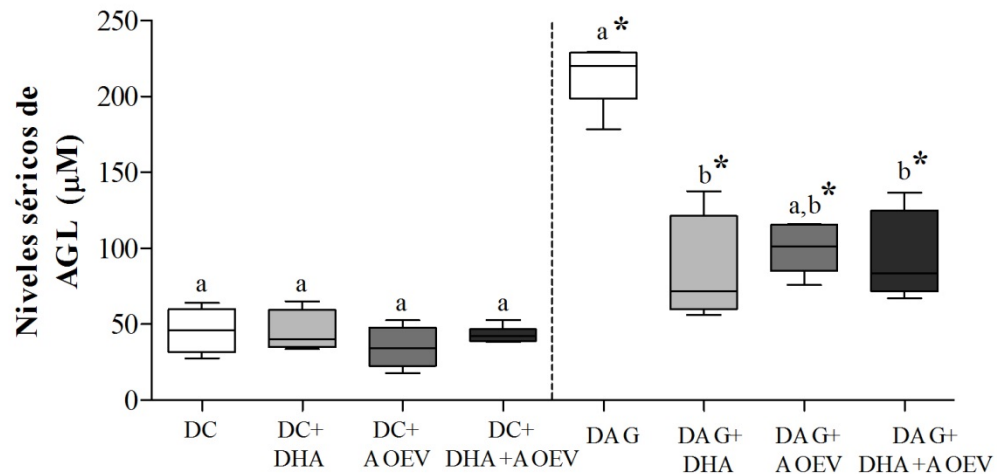


Figura 7. Niveles séricos de ácidos grasos libres (AGL) en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p<0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre pares.

Perfil de AG hepáticos totales

El análisis del perfil de los AG hepáticos totales más relevantes en los grupos experimentales se presenta en la **Tabla 9**.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de ácidos grasos saturados (AGS) totales entre grupos. Como era de esperar, tanto para los animales alimentados con DC como con DAG, aquellos que solo recibieron suplementación con DHA presentaron menores niveles hepáticos del ácido oleico (C18:1 n-9); siendo esta diferencia significativa solo entre los grupos con DC ($p=0.0002$). Además, la exposición a la DAG provocó niveles en un 26% inferiores para el grupo DAG+AOEV y en un 35% inferiores para el grupo DAG+DHA+AOEV en el contenido de AGM totales en relación con sus grupos control ($p<0.05$).

Respecto a los AGPI, para el ácido linoleico (C18:2 n-6, AL) se encontraron diferencias entre los grupos DC y DC+DHA+AOEV siendo mayores los niveles hepáticos en el primero ($p<0.0001$) y entre el grupo DAG y DAG+AOEV siendo en este caso los niveles hepáticos mayores en el segundo ($p=0.0038$), y para el ácido α -linolénico (C18:3 n-3, AAL) no se encontraron diferencias entre los grupos DAG, pero entre los grupos alimentados con DC los niveles hepáticos fueron mayores para los grupos DC y DC+DHA con relación al grupo con suplementación conjunta (DHA+AOEV) ($p=0.0003$). Todos los grupos de animales alimentados con DAG presentaron mayores niveles de AL que sus respectivos controles y los grupos DAG+AOEV y DAG+DHA+AOEV presentaron mayores niveles de AAL con relación a sus grupos control ($p=0.005$). A su vez, los grupos DAG+AOEV y DAG+DHA+AOEV exhibieron niveles hepáticos de AGPI totales en un 34% y 45% mayores respectivamente frente a sus respectivos controles.

En cuanto a los AGPICL *i*) para el ácido araquidónico (C20:4 n-6, ARA) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con DAG, pero entre los alimentados con DC los niveles hepáticos fueron mayores en los grupos DC y DC+AOEV ($p=0.0001$); *ii*) para el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) los niveles hepáticos fueron mayores en los animales suplementados solo con DHA o con suplementación mixta (DHA+AOEV) tanto entre los grupos alimentados con DC como con DAG, además el EPA exhibió valores significativamente inferiores en los grupos DAG, DAG+DHA y DAG+DHA+AOEV con relación a sus respectivos controles; encontrándose niveles en un 33, 73 y 50% inferiores respectivamente; y *iii*) para el ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA) coherentemente los grupos suplementados con DHA presentaron mayores niveles hepáticos que aquellos tratados solo con DC o solo con DAG, además los niveles hepáticos de DHA fueron un

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos hepáticos totales más relevantes en los diferentes grupos experimentales



Ácido graso	Composición de ácidos grasos (% EMAG)									
	Grupos experimentales				Valor p	DAG	DAG+ DHA	DAG+ AOEV	DAG+DHA +AOEV	Valor p
	DC	DC+ DHA	DC+ AOEV	DC+ DHA+ AOEV						
16:0	22.5 (21.5-23.1) a	23.3 (22.1-24.5) a,b	22.3 (21.2-23.5) a	24.1 (23.4-25.5) b	0.0105	21.1 (21.7-23.5) a	22.5 (21.8-22.9) a	21.7 (21.2-22.5) a	22.1 (21.7-22.2) a*	0.2978
18:1	29.5 (25.1-31.5) a	17.9 (16.1-21.0) b	27.9 (26.2-35.9) a	32.5 (28.0-39.4) a	0.0002	27.6 (22.8-31.8) a	18.6 (16.4-21.5) b	22.7 (19.3-16.7) a,b*	22.9 (19.1-23.6) a,b*	0.0007
18:2 n-6, AL	16.4 (13.7-19.8) a	13.9 (11.8-15.0) a	13.9 (13.4-15.6) a	10.9 (8.5-11.8) b	<0.0001	19.2 (18.5-20.4) a*	20.3 (19.1-21.5) a,b*	21.7 (20.5-23.0) b*	20.3 (19.7-20.9) a,b*	0.0038
18:3 n-3, AAL	0.6 (0.4-0.9) a	0.6 (0.5-0.7) a	0.5 (0.4-0.5) a,b	0.4 (0.3-0.4) b	0.0003	0.5 (0.5-0.6) a	0.6 (0.4-0.8) a	0.6 (0.5-0.8) a*	0.5 (0.5-0.6) a*	0.3329
20:4 n-6, ARA	9.1 (6.2-12.0) a	6.0 (4.5-7.1) b	10.0 (7.5-11.2) a	6.0 (4.8-6.4) b	0.0001	10.5 (7.3-12.0) a	9.0 (6.2-10.2) a*	10.8 (8.7-13-2) a	11.0 (9.7-11.4) a*	0.2443
20:5 n-3, EPA	0.3 (0.2-0.3) a	6.4 (5.7-7.9) b	0.4 (0.3-0.5) a,c	1.2 (1.1-1.7) b,c	<0.0001	0.2 (0.2-0.3) a*	1.7 (0.6-3.9) b	0.3 (1.8-0.4) a,c*	0.6 (0.4-0.7) b,c*	<0.0001
22:6 n-3, DHA	6.0 (4.5-7.3) a	14.9 (13.0-17.0) b	6.4 (5.5-6.8) a,b	10.1 (7.6-11.1) a	<0.0001	5.7 (4.5-6.7) a	11.6 (10.9-12.2) b*	7.7 (6.3-8.4) a,c	8.9 (8.0-10.1) b,c	<0.0001
Total AGS	30.6 (27.5-33.5) a	32.0 (31.3-35.8) a	33.3 (28.2-34.2) a	32.0 (30.1-33.6) a	0.1567	31.9 (30.4-32.8) a	34.5 (29.6-35.3) a	31.5 (30.7-33.6) a	32.8 (31.3-33.6) a	0.1588
Total AGM	35.0 (29.3-38.3) a	20.9 (19.1-24.7) b	32.5 (30.8-41.6) a	38.4 (33.5-46.0) a	0.0003	29.6 (24.4-34.3) a	19.7 (17.3-23.3) b	24.1 (20.5-28.7) a,b*	24.9 (20.4-25.5) a,b*	0.0008
Total AGPI	34.8 (33.9-37.3) a	44.4 (41.4-47.7) b	33.3 (31.2-34.7) a	29.8 (24.1-34.3) a	<0.0001	37.6 (35.4-42.3) a	46.63 (45.7-47.2) b	44.7 (41.6-45.2) a,b*	43.3 (41.6-45.6) b*	<0.0001

Total	27.7	19.9	26.4	18.3	<0.0001	30.9	31.0	35.0	32.6	0.0039
AGPICL n-6	(26.8-29.3)	(18.7-21.9)	(24.5-27.4)	(14.8-19.4)		(29.3-34.2)	(26.4-33.3)	(33.0-35.5)	(31.4-34.6)	
	a	b	a	b		a*	a*	b*	a,b*	
Total	7.3	24.0	7.4	12.4	<0.0001	6.8	14.7	9.1	10.6	<0.0001
AGPICL n-3	(6.0-8.5)	(21.6-26.6)	(6.7-8.1)	(9.9-14.7)		(5.7-8.1)	(13.6-18.1)	(8.1-9.8)	(9.0-11.9)	
	a	b	a	a,b		a	b*	a,c	b,c	
Total	16.3	30.0	18.9	18.8	<0.0001	18.0	25.3	20.0	22.5	<0.0001
AGPICL	(11.8-21.8)	(28.0-33.3)	(14.3-20.4)	(15.5-22.0)		(13.4-20.9)	(24.1-26.0)	(17.2-23.7)	(20.7-23.5)	
	a	b	a	a		a	b*	a	a,b*	
Razón	3.7	0.9	3.5	1.4	<0.0001	4.5	2.1	3.9	3.0	<0.0001
AGPICL n-6/	(3.2-4.6)	(0.8-0.9)	(3.1-3.7)	(1.4-1.6)		(4.2-5.2)	(1.4-2.3)	(3.6-4.0)	(2.8-3.6)	
AGPICL n-3	a	b	a,c	b,c		a*	b*	a,c*	b,c*	

Los valores se presentan como mediana (rango intercuartílico) % de esteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre pares. 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, 18:3n-3 (ácido α -linolénico, AAL). Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) son: 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).

22% menores en el grupo DAG+DHA con relación a su respectivo control ($p=0.0001$). Por consiguiente, entre los grupos de animales alimentados con DC los AGPICL totales fueron significativamente mayores en los grupos suplementados con DHA. Sin embargo, entre los grupos alimentados con DAG, los niveles hepáticos de AGPICL totales fueron un 16% menores para el grupo suplementado con DHA y un 20% mayores para el grupo con suplementación conjunta (DHA+AOEV) respecto a sus grupos control ($p<0.05$).

Finalmente, el tratamiento con la suplementación conjunta (DHA+AOEV) ocasionó una disminución en la razón AGPICL n-6/AGPICL n-3 frente a los grupos tratados solo con DC o solo con DAG ($p<0.0001$). También, la razón AGPICL n-6/AGPICL n-3 fue mayor ($p<0.05$) en todos los grupos alimentados con DAG en relación con sus respectivos controles.

4.3. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros de estrés oxidativo

Capacidad antioxidante sérica

Entre los animales alimentados con DC, el grupo tratado con AOEV mostró una capacidad antioxidante sérica en un 42% superior con respecto al grupo solo con DC. Así mismo, entre los animales alimentados con DAG todos los grupos con algún tipo de suplementación (DHA, AOEV o DHA+AOEV) exhibieron una capacidad antioxidante significativamente mayor que el grupo solo con DAG (251%, 223% y 229% superiores respectivamente) (**Figura 8**). Sin embargo, para los grupos DAG, DAG+AOEV y DAG+DHA+AOEV la alimentación con la DAG provocó que la capacidad antioxidante sérica fuera menor que en sus respectivos controles ($p<0.005$). (**Figura 8**).

Glutación hepático

Los niveles hepáticos de glutación total (**Figura 9 A**) no presentaron diferencias significativas entre los animales alimentados con DAG. Por el contrario, entre aquellos alimentados con DC, los que tenían suplementación conjunta (DHA+AOEV) mostraron niveles hepáticos de glutación total en un 56% superiores con respecto al grupo solo con DC ($p=0.0128$). Para el glutación reducido (GSH) (**Figura 9 B**) tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con DAG. No obstante, entre los grupos alimentados con DC, los grupos suplementados con AOEV y con DHA+AOEV presentaron niveles de GSH hepáticos en un 33% y 74% mayores respectivamente con relación al grupo solo con DC ($p=0.0266$).

Por consiguiente, el incremento ocasionado por la suplementación conjunta (DHA+AOEV) en los niveles hepáticos de glutación total y de GSH se vio suprimido cuando los animales recibieron la DAG.

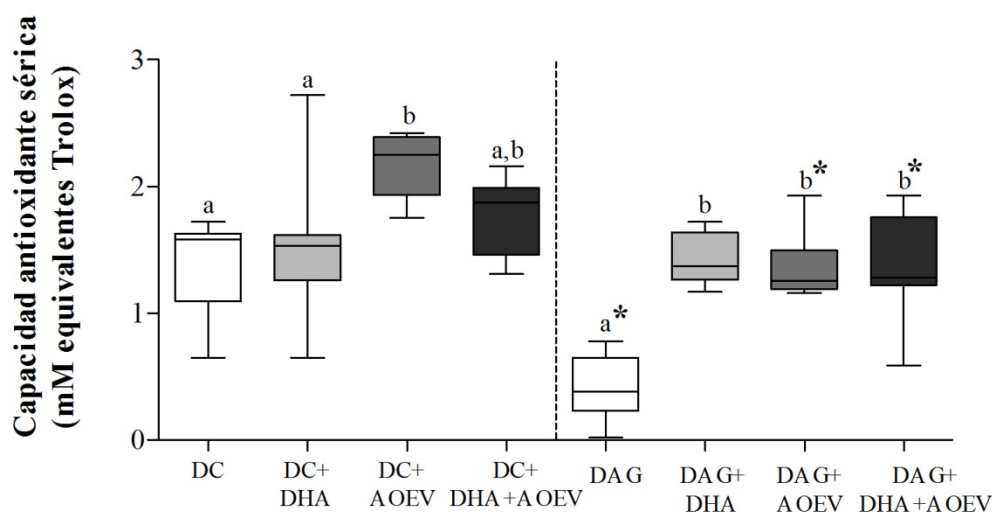


Figura 8. Capacidad antioxidante sérica expresada en términos de equivalentes Trolox. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre pares.

Respecto a los niveles hepáticos de glutatión oxidado (GSSG) (**Figura 9 C**), en los animales alimentados con DC aquellos con suplementación conjunta (DHA+AOEV) presentaron niveles hepáticos de GSSG en un 143% superiores con respecto al grupo solo DC y en un 161% superiores con relación al grupo DC+AOEV ($p=0.0020$). Similarmente, entre los animales alimentados con DAG, el grupo con suplementación conjunta (DHA+AOEV) presentó niveles hepáticos de GSSG en un 97% superiores con respecto al grupo solo DAG y en un 79% superiores con respecto al grupo DAG+DHA ($p=0.0039$).

Por último, se encontraron diferencias significativas en la razón GSH/GSSG (**Figura 9 D**) entre los animales alimentados con DC; siendo la razón para el grupo suplementado con AOEV un 112% mayor con respecto al grupo DC+DHA y un 109% mayor con respecto a grupo DC+DHA+AOEV ($p=0.0035$). Este comportamiento no se observó entre los animales alimentados con DAG, pero se encontró que la exposición a la DAG ocasionó que la razón GSH/GSSG en el grupo suplementado con AOEV fuera menor con relación a su grupo control ($p=0.0360$).

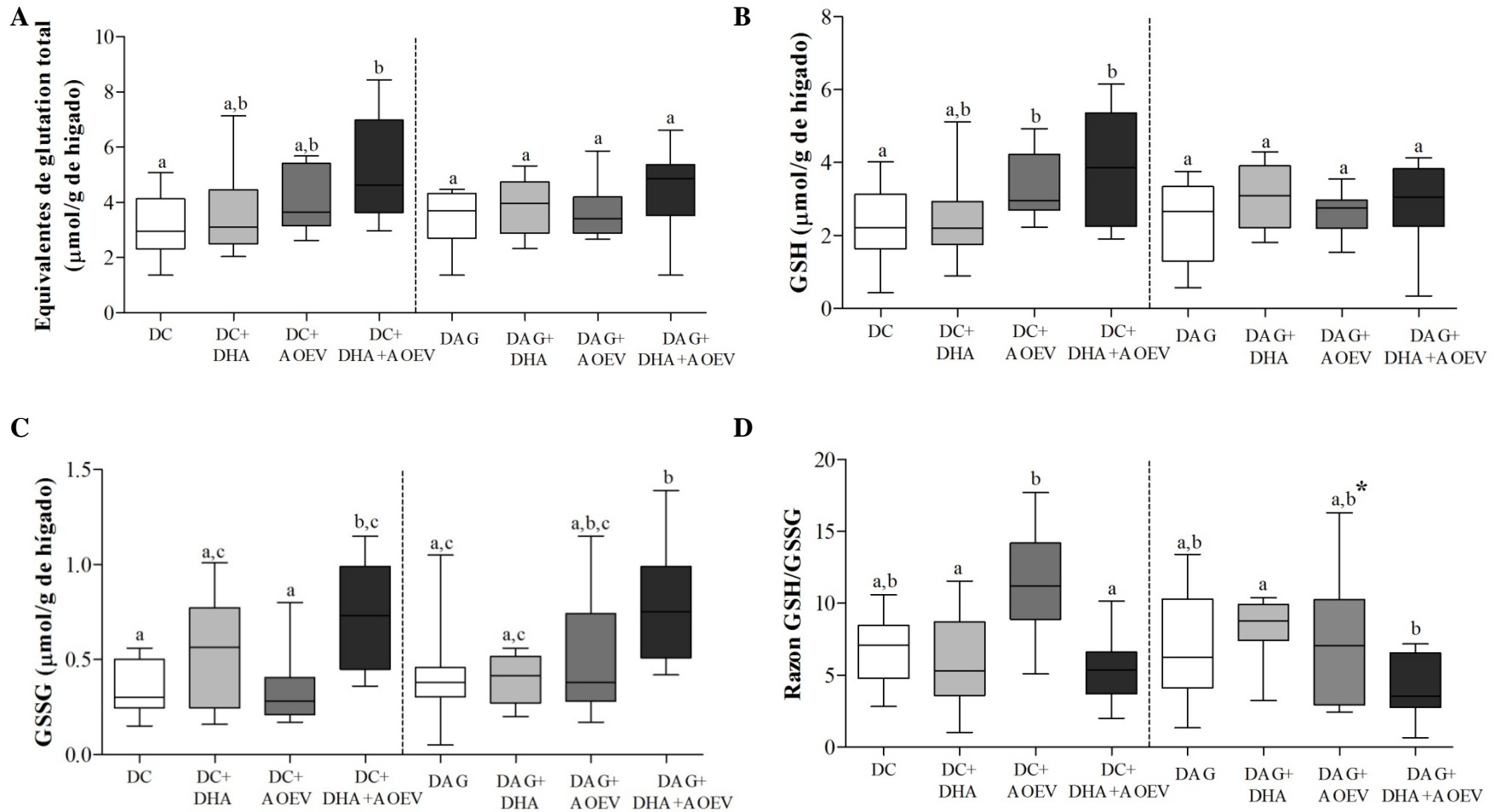


Figura 9. Niveles hepáticos de glutatión total (expresados como equivalentes de glutatión total=GSH+2GSSG) (A), glutatión reducido (GSH) (B), glutatión oxidado (GSSG) (C) y razón GSH/GSSG (D) en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p<0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre pares.

Proteínas oxidadas hepáticas

Los niveles hepáticos de carbonilos proteicos (**Figura 10**) no indicaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con DC. Por el contrario, entre los grupos alimentados con DAG aquellos suplementados con DHA y con DHA+AOEV presentaron niveles de proteínas oxidadas hepáticas en un 28% y 34% inferiores respectivamente con relación al grupo tratado solo con la DAG ($p=0.0016$). Sin embargo, todos los grupos alimentados con DAG exhibieron niveles hepáticos de carbonilos proteicos significativamente mayores que sus respectivos controles.

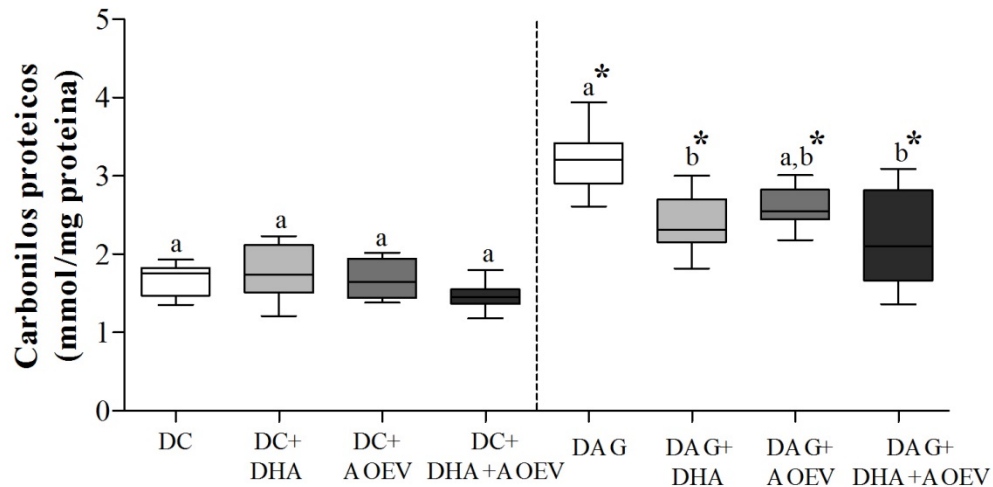


Figura 10. Niveles hepáticos de carbonilos proteicos en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p<0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre pares.

Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs)

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de malondialdehído (MDA) séricos (**Figura 11 A**) o hepáticos (**Figura 11 B**) entre los grupos alimentados con DC. Por el contrario, entre los grupos alimentados con DAG se observaron niveles séricos de MDA en un 88% inferiores para el grupo DAG+DHA, en un 95% inferiores para el grupo DAG+AOEV y en un 96% inferiores para el grupo DAG+DHA+AOEV con relación al grupo tratado solo con DAG ($p<0.0001$). Para los niveles hepáticos de MDA (**Figura 11 B**), solo el grupo con suplementación conjunta (DHA+AOEV) presentó niveles de MDA significativamente menores con respecto al grupo tratado solo con DAG; siendo estos

niveles en un 87% inferiores. No obstante, tanto los niveles séricos como hepáticos de MDA fueron mayores ($p<0.05$) en todos los grupos alimentados DAG con relación a sus respectivos grupos control.

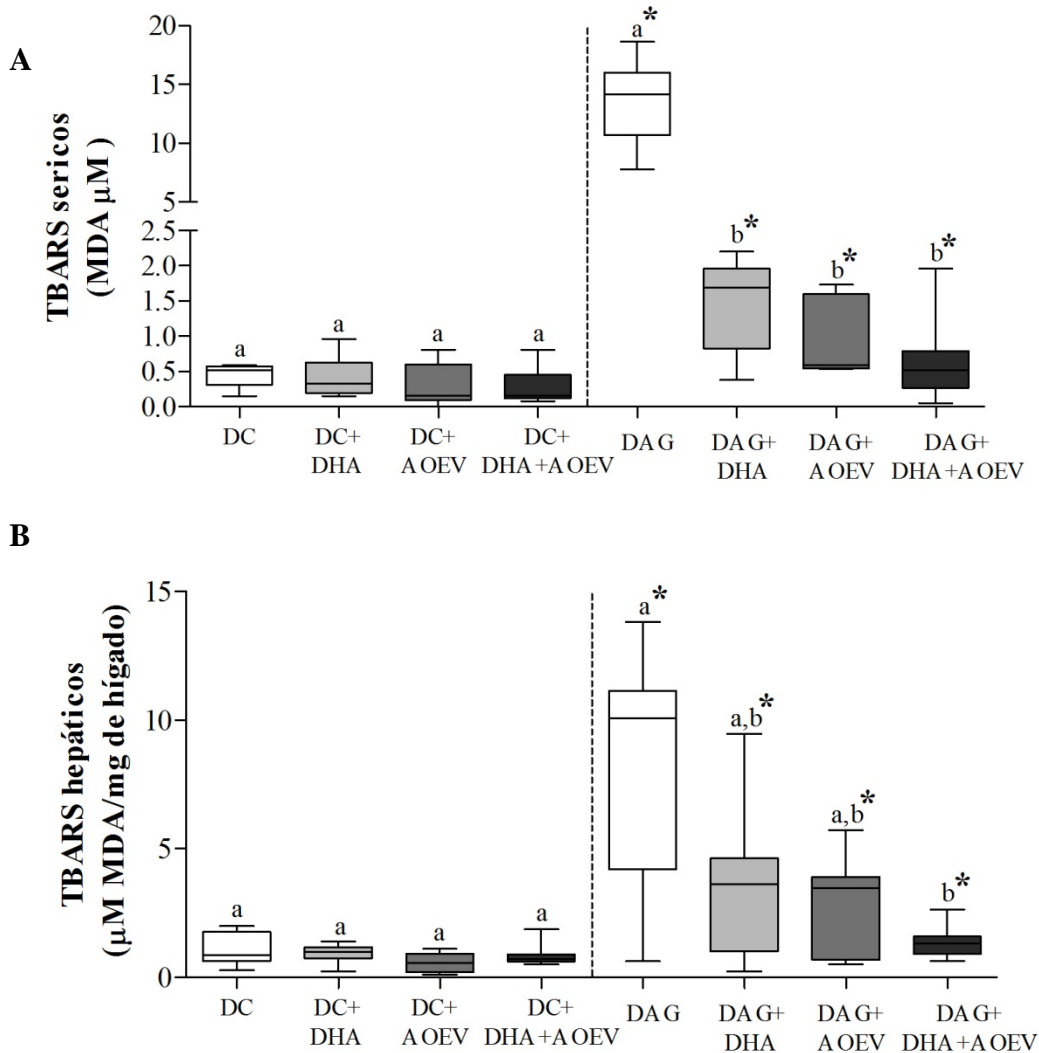


Figura 11. Niveles séricos de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A) y niveles hepáticos de TBARS (B) expresados en términos de malondialdehído (MDA) en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p<0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre pares.

8-isoprostanos hepáticos

No se encontraron diferencias significativas en los niveles hepáticos de 8-isoprostanos para los diferentes tipos de intervenciones entre los animales alimentados con DC y tampoco en entre aquellos alimentados con DAG. (**Figura 12**). La exposición a la DAG ocasionó que los grupos DAG, DAG+DHA y DAG+AOEV presentarán niveles hepáticos de 8-isoprostanos mayores que sus respectivos controles ($p<0.05$); situación que no se observó al comparar el grupo DAG+DHA+AOEV con su grupo control.

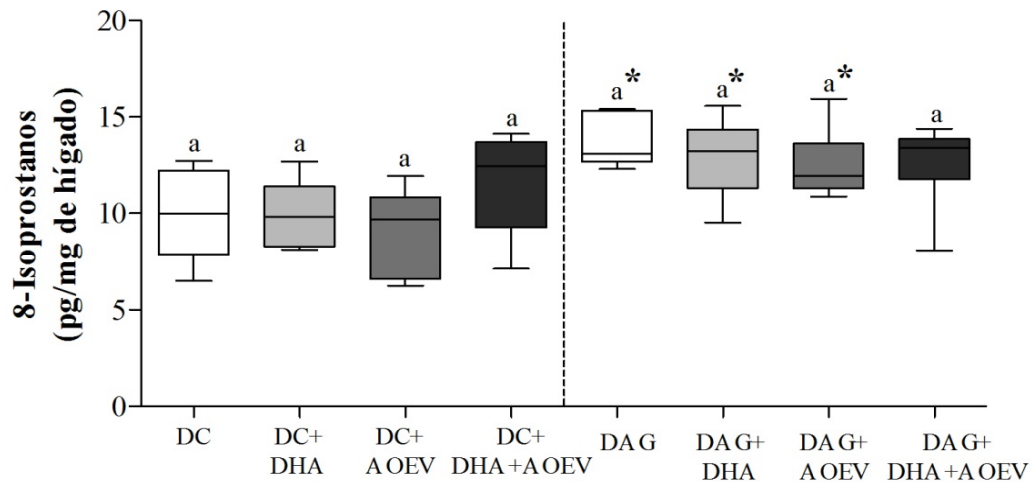


Figura 12. Niveles hepáticos de 8-isoprostanos en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p<0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p<0.05$) entre pares.

4.4. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros de inflamación

No se encontraron diferencias significativas en citoquinas inflamatorias a nivel de los grupos alimentados con DC. En cambio, entre los grupos alimentados con DAG el grupo con suplementación conjunta (DHA+AOEV) presentó niveles de TNF- α (**Figura 13 A**) en un 70% inferiores ($p=0.0043$) y de IL-6 (**Figura 13 B**) en 67% inferiores ($p<0.0001$) con respecto a los grupos solo DAG. Para TNF- α los niveles fueron mayores ($p<0.05$) en todos los grupos DAG en relación con sus respectivos controles, pero para IL-6 los niveles en el grupo con suplementación mixta (DHA+AOEV) se normalizaron respecto a su grupo control.

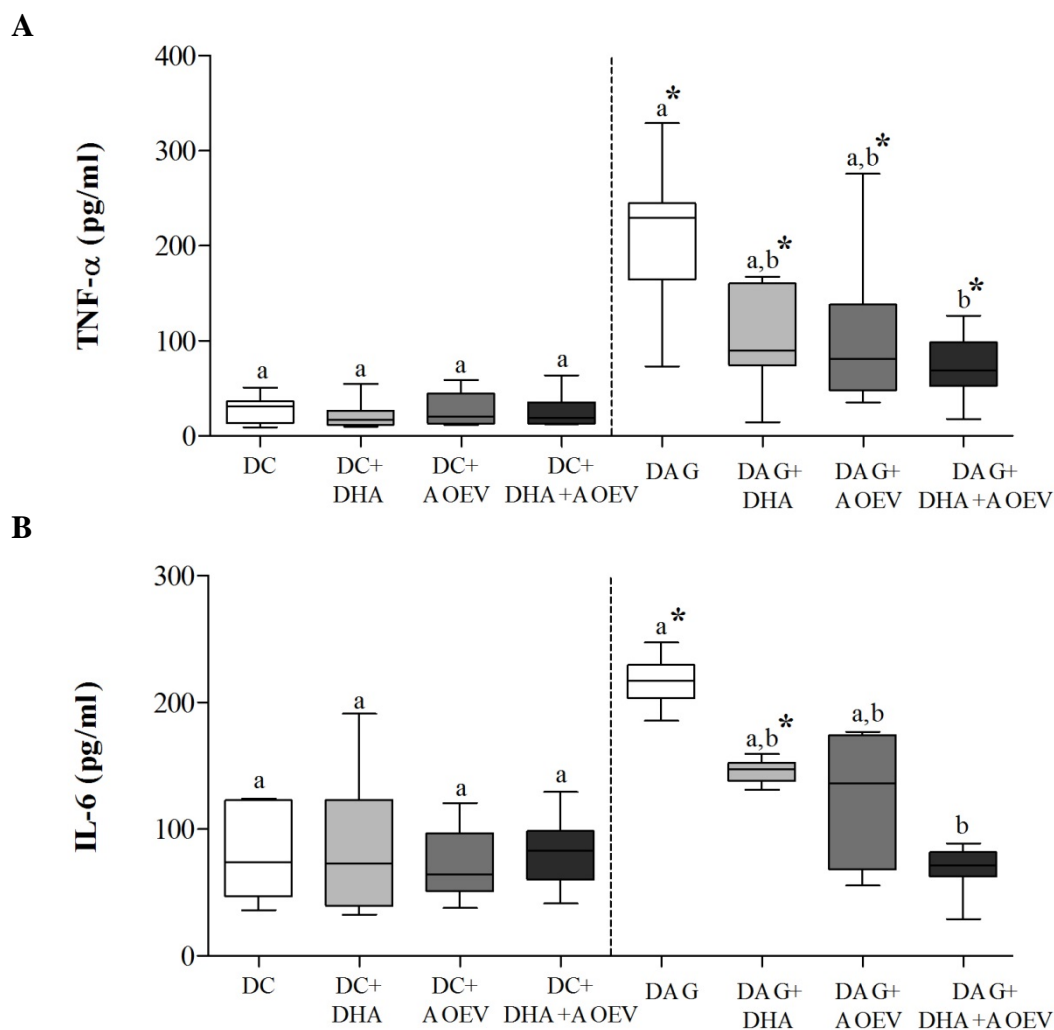


Figura 13. Niveles séricos de TNF- α (A) e IL-6 (B) en los grupos experimentales. Los valores se presentan en mediana (línea interna de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja) y percentil 75 (línea superior de la caja). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre pares.

4.5. Evaluación del efecto de las intervenciones en parámetros metabólicos

Los resultados de los parámetros metabólicos evaluados se presentan en la **Tabla 10**.

Luego de 12 semanas de intervención se observó que entre los grupos de animales alimentados con DC, aquellos suplementados ya fuera con DHA o con AOEV de manera

Tabla 10. Parámetros metabólicos por grupo experimental 

	Grupos experimentales				Valor p	DAG	DAG+DHA	DAG+AOEV	DAG+DHA+AOEV	Valor p
	DC	DC+DHA	DC+ AOEV	DC+ DHA+AOEV						
Glicemia (mg/dL)	99.0 (96.0-99.0) a	119.6 (115.9-114.6) b	118.8 (115.2-118.8) b	94.7 (91.8-94.7) a	0.0001	153.3 (148.6-153.5) a*	121.9 (118.2-121.9) b	137.3 (133.2-137.3) a,c*	130.1 (126.1-130.1) b,c*	<0.0001
Insulinemia (µU/mL)	4.59 (2.24-5.40) a	4.43 (3.28-6.18) a,b	4.94 (4.28-5.91) a,b	6.99 (5.72-10.15) b	0.0264	23.52 (22.19-24.85) a*	25.43 (22.77-28.50) a*	26.45 (19.56-33.32) a*	20.85 (18.37-22.61) a*	0.0442
HOMA-IR	1.12 (0.55-1.36) a	1.30 (0.96-1.64) a	1.41 (1.19-1.50) a	1.61 (1.19-2.35) a	0.0975	8.68 (7.29-11.34) a*	7.38 (6.85-8.19) a,b*	8.46 (6.88-11.22) a,b*	6.59 (5.03-7.60) b*	0.0256
TAG (mg/dL)	65.0 (41.8-76.8) a	54.0 (44.0-85.0) a	62.5 (47.0-98.0) a	89.0 (54.0-101.0) a	0.2166	163.0 (92.0-193.0) a*	77.0 (69.0-166.3) a,b*	77.0 (68.8-81.2) b	73.0 (54.5-89.5) b	0.0160
Colesterol Total (mg/dL)	132.0 (128.0-156.0) a	115.0 (78.0-129.5) b	146.0 (122.0-166.8) a	138.5 (90.8-167.3) a,b	0.0354	201.0 (164.5-215.5) a*	169.0 (136.3-211.8) a*	202.0 (161.0-220.0) a*	152.5 (126.5-194.0) a	0.2427
Colesterol LDL (mg/dL)	66.9 (41.8-96.7) a	71.4 (27.5-92.1) a	101.6 (45.2-111.3) a	53.1 (23.7-87.6) a	0.2577	82.8 (66.3-115.5) a	71.5 (66.7-124.7) a	114.9 (74.2-155.9) a	85.7 (62.21-91.3) a	0.3911
Colesterol HDL (mg/dL)	42.6 (32.0-56.8) a,b	36.2 (26.3-44.1) a	52.2 (45.4-72.4) b	51.3 (39.2-62.4) a,b	0.0186	40.35 (35.4-78.9) a	59.3 (47.1-74.2) a*	47.5 (43.2-59.3) a	64.9 (25.3-87.6) a	0.4072

Los valores se presentan como mediana (rango intercuartílico). Análisis estadístico: *i*) Test de Kruskal Wallis seguido de post-test Dunns exclusivamente entre los grupos con dieta control (DC) (izquierda) y exclusivamente entre los grupos con dieta alta en grasa (DAG) (derecha); valores con letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0.05$) y *ii*) Test Mann Whitney entre los grupos con DAG y sus respectivos controles (DC vs. DAG; DC+DHA vs. DAG+DHA; DC+AOEV vs. DAG+AOEV; DC+DHA+AOEV vs. DAG+DHA+AOEV); * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre pares. TAG (Triacilglicéridos).

aislada presentaron mayores niveles de glicemia sérica que el grupo de animales solo con DC o con suplementación conjunta (DHA+AOEV). Los grupos DAG, DAG+AOEV y DAG+DHA+AOEV presentaron valores de glicemia sérica mayores que sus respectivos controles ($p<0.05$), sin embargo, entre los grupos alimentados con DAG, el grupo con suplementación mixta (DHA+AOEV) exhibió niveles séricos de glicemia en un 15% inferiores en relación con el grupo solo DAG ($p<0.0001$). Con respecto a la insulina sérica, si bien no se observaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con DAG; todos los grupos expuestos a la DAG presentaron mayores niveles que sus respectivos controles ($p<0.05$). Por consiguiente, el mismo comportamiento fue encontrado para la evaluación homeostática de resistencia a la insulina (HOMA-IR). No obstante, el grupo con DAG y suplementación conjunta (DHA+AOEV) tuvo un índice HOMA-IR en un 24% inferior con respecto al grupo solo con DAG.

Acerca del perfil lipídico, los niveles séricos de triacilglicéridos (TAG) no presentaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con DC, pero si entre los grupos alimentados con DAG; en donde aquellos suplementados con AOEV y con suplementación conjunta (DHA+AOEV) presentaron niveles séricos de TAG en un 53% y en un 55% inferiores respectivamente con respecto al grupo en tratamiento solo con DAG. Para los niveles séricos de colesterol total (CT) no se encontraron diferencias entre los grupos alimentados con DAG, sin embargo, entre los grupos alimentados con DC, el grupo suplementado con DHA exhibió niveles séricos de CT en un 13% inferiores con respecto al grupo en tratamiento solo con la DC y en un 20% inferiores con respecto al grupo en tratamiento con DC+AOEV ($p=0.0354$). A su vez, los niveles séricos de CT fueron mayores en los grupos DAG, DAG+DHA y DAG+AOEV que en sus respectivos controles ($p<0.05$). En cuanto a los niveles séricos de colesterol LDL (C-LDL) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni entre grupos control. Finalmente, entre grupos alimentados con DC los animales suplementados con AOEV presentaron niveles séricos de colesterol HDL (C-HDL) en un 44% superiores en comparación con el grupo suplementado solo con DHA ($p=0.0186$) y el grupo DAG+DHA presentó niveles séricos de C-HDL significativamente mayores que su grupo control.

4.6. Correlación entre variables antropométricas y citoquinas inflamatorias

Se encontró una asociación positiva ($p<0.0001$) entre el peso corporal y el peso del tejido adiposo a las 12 semanas de intervención (**Figura 14 A**), entre el peso del tejido adiposo y los niveles séricos de TNF- α ($p<0.0001$) (**Figura 14 B**) y entre el peso del tejido adiposo y los niveles séricos de IL-6 ($p<0.0001$) (**Figura 14 C**).

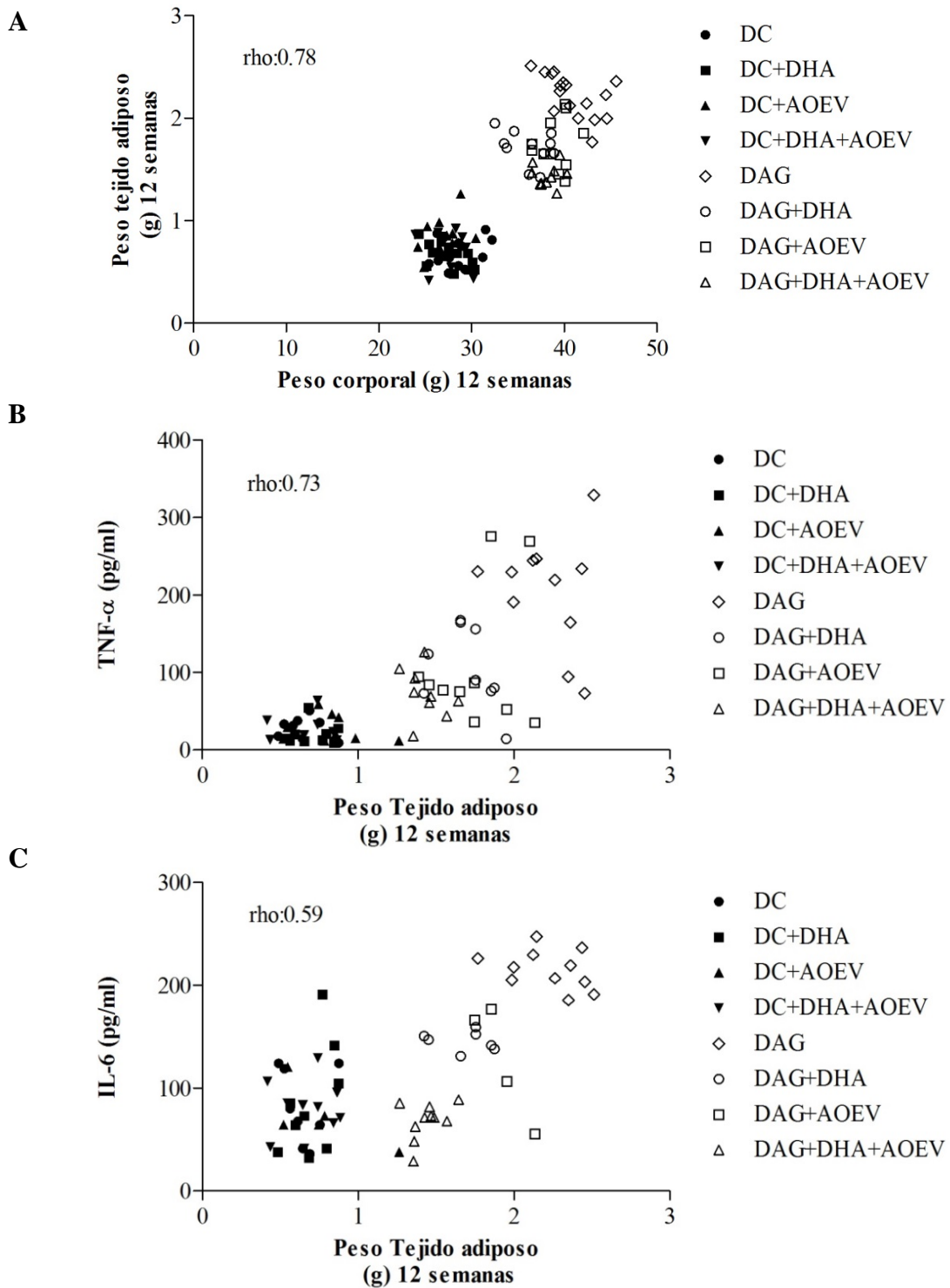


Figura 14. Correlación entre peso corporal y peso del tejido adiposo (A), peso del tejido adiposo y niveles plasmáticos de TNF- α (B) y entre peso del tejido adiposo y niveles plasmáticos de IL-6 luego de 12 semanas de tratamiento (C). Análisis estadístico: test de correlación de Spearman.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta investigación se propuso que la suplementación conjunta de DHA con AOEV podría reducir la esteatosis hepática, EO, inflamación, alteraciones metabólicas y resistencia a la insulina inducida por DAG en ratón, planteando que el DHA junto con el AOEV actuarían sinérgicamente contra la injuria hepática generada por la DAG, permitiendo así reducir la dosis de DHA con el fin de evitar la lipoperoxidación y el EO que se ha atribuido a una alta ingesta de aceite de pescado^{37,46,67} y potenciar las propiedades citoprotectoras ampliamente descritas para los AGPICL n-3 (**Figura 2**), junto con las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del AOEV⁴⁷⁻⁵¹. Al respecto, se encontró que la suplementación conjunta de DHA con AOEV generó una mayor protección que la suplementación aislada de DHA o AOEV frente a la alimentación con DAG en *i*) reducción de la esteatosis hepática; *ii*) menor lipoperoxidación en hígado; *iii*) menor respuesta proinflamatoria y *iv*) menor resistencia a la insulina (**Figura 15**).

Este estudio utilizó una DAG certificada (60% de las calorías a partir de la grasa) como modelo para inducir esteatosis hepática de origen nutricional, donde un elevado aporte de AGS (10.6g/100g de dieta), especialmente de ácido palmítico (C16:0) (6.5g/100g de dieta) son los principales causantes de la injuria hepática. Al respecto, una excesiva ingesta de AGS ha sido vinculada a lipotoxicidad activando vías inflamatorias, alterando la microbiota intestinal y produciendo endotoxemia⁶⁸. Estudios en líneas celulares de hepatocitos humanos han reportado que concentraciones lipotóxicas de ácido palmítico alteran el metabolismo de los lípidos, causan EO y alteran el balance intracelular de calcio lo cual induce estrés del retículo endoplásmico y lipoapoptosis^{69,70}. Como era de esperar, alimentar a ratones con DAG por 12 semanas produjo: *i*) ganancia de tejido adiposo, esteatosis micro y macrovesicular, incremento en el contenido de grasa y TAG hepáticos y aumento en los niveles séricos de AGL; junto con *ii*) una pérdida en la capacidad antioxidante e incremento en parámetros de EO; *iii*) mayor liberación de citoquinas proinflamatorias y *iv*) IR e incremento en los niveles séricos de colesterol total y de TAG.

Efecto de las intervenciones en el peso corporal e ingesta dietaria

Respecto al peso corporal e ingesta dietaria se observó que la suplementación conjunta de DHA con AOEV no modificó el peso corporal final en los animales alimentados con DAG, pero la suplementación solo con DHA si ocasionó una menor ganancia de peso. Hallazgo coherente con otros estudios en roedores donde la administración de AGPICL n-3 atenúa la ganancia de peso inducida por DAG, reduciendo principalmente la acumulación de grasa corporal⁷¹⁻⁷⁶, siendo el DHA el principal mediador para generar una reducción en la acumulación de grasa visceral. Ruzickova *et al.*⁷⁶ alimentaron ratones C57BL/6J con dietas

que tenían diferentes contenidos de grasa (3.4, 20 o 35%), observándose que en los grupos que recibieron una mezcla de EPA+DHA (15% o 45% del total de lípidos aportados en la dieta) se atenuaba la acumulación de grasa epididimal (grasa visceral), pero tenía un efecto limitado sobre la acumulación de grasa subcutánea; estableciéndose que este efecto sería mediado principalmente por el DHA, dado una baja relación EPA/DHA⁷⁶. Además, resulta interesante indicar que en los animales alimentados con DAG el menor incremento en el peso del tejido adiposo observado en aquellos que fueron suplementados con DHA, AOEV o DHA+AOEV, se podría atribuir principalmente a que los AGPICL n-3 aumentan la expresión de genes en el epidídimo, que regulan la biogénesis mitocondrial (Coativador-1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PGC-1 α) y Factor-1 nuclear respiratorio (NRF-1)) y el metabolismo oxidativo regulando el transporte de AG a la mitocondria (Carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I)), junto con reducir la expresión de enzimas lipogénicas tales como la Esteroil-CoA Desaturasa (SCoAD) favoreciéndose la oxidación de AG en el tejido adiposo visceral⁷⁷. En relación al efecto anti-lipogénico del AOEV, es posible vincular el ácido oleico (principal ácido graso del AOEV) y su potencial efecto en la estimulación dependiente de ácido oleico de la transcripción de genes para PPAR- α , translocasa de ácidos grasos (CD36) y enzimas para la β -oxidación mitocondrial mediante la activación en la señalización de PGC1- α , llevando a un incremento en las tasas de oxidación de AG⁷⁸.

Efecto de las intervenciones en la esteatosis hepática

Larter *et al.*³⁷ evaluaron el rol de la dieta sobre la activación del PPAR- α en el modelo de esteatosis hepática inducida por una dieta deficiente en metionina y colina (DMC) en ratones, estableciendo que si bien la dieta enriquecida con AGPICL n-3 (aceite de atún-24% DHA) activó PPAR- α y suprimió la lipogénesis hepática de *novo*, falló en prevenir el desarrollo de esteatohepatitis, y por el contrario, causó una marcada acumulación hepática de lipoperóxidos en comparación con los ratones alimentados con DC o suplementados con aceite de oliva³⁷. En contraste, este trabajo encontró que la suplementación con DHA otorga una protección frente al EO cuando los animales fueron alimentados con DAG (menor contenido de MDA séricos y de carbonilos proteicos y mayor capacidad antioxidante sérica), además, el grado de esteatosis hepática también fue menor para este grupo. Sin embargo, la suplementación conjunta (DHA+AOEV) tuvo un mayor efecto que la suplementación aislada de DHA o de AOEV en atenuar el grado de esteatosis hepática e incremento en el contenido de grasa hepática ocasionado por la DAG. Asimismo, cabe resaltar que una alimentación con DAG por 12 semanas indujo un cuadro de esteatosis micro y macrovesicular, indicando no solo una anomalía metabólica frente a la síntesis y exportación de lípidos sino también una perturbación en la función ribosomal y mitocondrial llevando a un deterioro en la β -oxidación de AG y por ende mayor posibilidad

de progresión de la injuria hepática⁷⁹; frente a lo cual la protección otorgada por la administración conjunta de DHA con AOEV cobra más relevancia.

Con respecto a la hepatoprotección otorgada por el DHA y por el AOEV, estudios del efecto de la suplementación de AGPICL n-3 (EPA+DHA o solo DHA) en modelos de esteatosis hepática inducida por dieta en roedores han demostrado contrarrestar la injuria hepática ocasionada por la exposición a la dieta^{45,80-82}, así como estudios en humanos han demostrado que un tratamiento prolongado (15-18 meses) con DHA+EPA se ha asociado con una disminución en el contenido de grasa hepática⁸³. De igual forma, estudios en roedores con dietas aterogénicas (15% del peso en grasa neutra, 1.25% en colesterol y 0.5% en colato/colina) suplementadas con aceite de oliva han demostrado claramente atenuar la inflamación hepática⁸⁴, y en el estudio desarrollado por Park *et al.*⁸⁵ en ratones C57BL/6N se halló que la suplementación de la DAG con oleuropeína revirtió el incremento en el peso del hígado y del peso corporal y mejoró el perfil de lípidos en plasma e hígado; sugiriendo que la oleuropeína (compuesto fenólico presente en el aceite de oliva) puede tener un efecto protector contra la esteatosis hepática que parece estar mediado por la cascada de señalización de la lipogénesis mediada por el factor 21 de crecimiento de fibroblastos (FGF21) junto con las vías de señalización proinflamatorias mediadas por los receptores tipo Toll (TLR2 y TLR4)⁸⁵.

Investigaciones enfocadas a evaluar los efectos sinérgicos de diferentes AG en la esteatosis han encontrado que en ratas alimentadas con DAG enriquecida con una mezcla de aceite de canola y de linaza, se observa una menor ganancia en el peso corporal, menor contenido de lípidos en hígado, menor inflamación y marcadores de EO y un mayor contenido de EPA y DHA y las más bajas concentraciones de ARA en el perfil de AG hepáticos, en comparación con DAG enriquecidas solo con aceite de colza, canola, cártamo, soja o manteca de cerdo²³. Sin embargo, estas investigaciones han evaluado el efecto de dietas ricas en AAL n-3 a base de plantas, por lo cual se involucran mecanismos de elongación y saturación de AG, y han estudiado el efecto en conjunto con AGM distintos y por ende con propiedades biológicas diferentes. Más afín con el modelo de intervención de este estudio, Provenzano *et al.*⁶⁷ compararon los efectos de la suplementación con aceite de oliva solo o de aceite de oliva junto con AGPICL n-3 (EPA+DHA) en el desarrollo y la progresión de esteatosis experimental en ratones Balb/C alimentados con una DMC, y a diferencia con los resultados de este estudio, hallaron que la suplementación con AGPICL n-3 y aceite de oliva se asoció con más severidad de la necroinflamación y de la fibrosis que en los ratones tratados solo con el aceite de oliva. Estos hallazgos se podrían deber a las discrepancias con el modelo experimental de esta investigación, en donde cabe resaltar: tiempo de intervención (8 semanas vs. 12 semanas); tratamiento para inducir esteatosis hepática (DMC vs. DAG certificada); naturaleza de los productos (EPA+DHA vs. solo DHA, aceite

de oliva vs. AOEV); y de gran importancia la diferencia en la dosis de administración (EPA y DHA 25mg + 75mg de aceite de oliva o 100 mg de aceite de oliva 2 veces por semana vs. DHA 50mg/kg/día o AOEV 50mg/kg/día o DHA 50mg/kg/día + AOEV 50mg/kg/día); donde las dosis fueron claramente superiores en el estudio desarrollado por Provenzano *et al.*⁶⁷ lo cual pudo haber contribuido a que la intervención resultara en un fenotipo inflamatorio más severo y empeoramiento de la fibrogénesis.

Los resultados de este estudio sugieren que la protección frente al incremento en el contenido de TAG hepáticos en los animales alimentados con DAG y suplementados con AOEV o con DHA+AOEV, podría ser atribuida principalmente al efecto ejercido por el AOEV. Este resultado es coherente con el estudio de Hussein *et al.*⁸⁶ en el que ratas Sprague-Dawley alimentadas con una DMC al ser suplementadas con aceite de oliva presentaron una menor acumulación de TAG hepáticos que aquellas suplementadas con aceite de pescado o solo con la DMC. Al respecto, el efecto hepatoprotector del aceite de oliva puede ser explicado por su capacidad para *i)* inhibir la síntesis de TAG hepática⁸⁷; *ii)* estimular la β -oxidación peroxisomal hepática⁸⁸; *iii)* disminuir la lipoproteína lipasa y lipasa de triglicéridos en el hígado; *iv)* reducir los niveles de TAG en plasma y *v)* los AGM presentes en él oliva pueden mejorar la resistencia a la insulina, y aumentar la liberación de TAG desde el hígado, lo cual disminuye la liberación de AGL del tejido adiposo periférico al hígado⁸⁹.

Efecto de las intervenciones en el perfil de ácidos grasos hepáticos

Los resultados de este estudio indican que la exposición a la DAG indujo un perfil de AGPICL con mayor contenido de ARA y menor contenido de EPA y DHA. El mayor contenido de AL observado en todos los grupos alimentados con DAG, se puede explicar a expensas de una mayor razón AGPI n-6/n-3 en la DAG en comparación con la DC. No obstante, mayores niveles del ácido derivado del AL (ARA) y menores niveles de los ácidos derivados del AAL (EPA y DHA) en los grupos alimentados con DAG podrían involucrar varios aspectos *i) Mayor cantidad de producto a expensas de mayor precursor.* Al respecto, el AL y el AAL de la dieta se pueden convertir en familias de AGPICL n-6 y n-3 mediante una serie de reacciones de desaturación y alargamiento que involucran a las desaturasas Δ -6 y Δ -5, una elongasa del sistema microsómico y una fase de acortamiento de la cadena, lo que implica la β -oxidación en los peroxisomas^{90,91}. Si bien las dos rutas son independientes y no hay una reacción cruzada, ambas rutas emplean las mismas enzimas y por lo tanto compiten por las transformaciones. Así, cuando LA es el AGPI predominante, los niveles plasmáticos y celulares de los AGPICL n-6 derivados de AL tienden a ser más altos que los niveles de AGPICL n-3; *ii) Un bajo rendimiento en la transformación de AAL en EPA y DHA.* Tal como ha sido demostrado en estudios con marcadores de isótopos estables en los que el rendimiento de transformación del AL en

EPA es de un 0.2%, en DPA n-3 de un 0.13% y en DHA de un 0.05%⁹². Así, aunque los humanos y los animales tienen la capacidad de transformar el AAL en EPA y DHA, el rendimiento de la transformación es bajo, en particular en el caso del DHA, lo que se ha explicado en parte a que el AL ingerido se oxida a acetil-CoA, el cual se recicla en la síntesis de *novo* de colesterol, AGS y AGM o se metaboliza a dióxido de carbono⁹³, además de que es el AG insaturado que se oxida en forma más rápida⁹⁴. No obstante, en algunas investigaciones se ha demostrado que el contenido corporal de DHA se puede mejorar mediante la ingesta a largo plazo de aceites vegetales que contengan más AAL y menos AL^{95,96}; y **iii) Procesos de elongación y desaturación defectuosa en animales alimentados con DAG**. Acorde con esto, algunos factores ambientales han sido descritos por afectar la actividad de las desaturasas Δ -5 y Δ -6 y, por lo tanto, a la transformación del AL y del AAL en sus correspondientes AGPICL. Entre estos, investigaciones han demostrado que el colesterol de la dieta⁹⁷⁻⁹⁹ y las dietas ricas en grasa⁹⁹ disminuyen la actividad de las desaturasas, y en personas con diabetes se ha reportado una baja actividad de la Δ -5 desaturasa^{100,101}. En línea con los resultados de este trabajo, en pacientes obesos con EHGNA se ha evidenciado una disminución del 50% en el contenido hepático de EPA y DHA y un aumento en la relación AGPI n-6/n-3. El estudio realizado por Araya *et al.*¹⁰² encontró una correlación inversa en la actividad de la Δ -6 desaturasa con la resistencia a la insulina y el EO en pacientes con EHGNA, indicando una menor biodisponibilidad de AGPICL n-3 en pacientes con EHGNA¹⁰².

De igual modo, en este trabajo se encontró que en los animales alimentados con DAG y suplementados con DHA, ocurre un consumo hepático significativo de este AG respecto a su grupo control. Esta situación podría ser un mecanismo de citoprotección del DHA frente a la exposición a la DAG, en donde el DHA estaría siendo utilizado para la producción de sus derivados bioactivos. Si bien el DHA es un mal sustrato para la COX y no se conocían derivados bioactivos de dicho AG, en los últimos años se han identificado productos del DHA originados por la COX-2 y la 5-LOX, que han sido denominados resolvinas de la serie D y protectinas (neuroprotectinas D1) y que reciben el término genérico de docosanoides (derivados de 22 átomos de carbono)^{103,104}. Entre estos docosanoides, las resolvinas, protectinas y maresinas son mediadores lipídicos especializados que estimulan y aceleran la resolución de la respuesta inflamatoria, mediante mecanismos que involucran 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 IF- γ y reducción en la trans migración de PMN¹⁰⁵. Todas estas acciones implicarían una protección frente a la injuria hepática y frente a la progresión de la esteatosis por la exposición a la DAG. Por consiguiente, el mayor contenido de AGPICL encontrado en el grupo DAG+DHA+AOEV con respecto al grupo DC+DHA+AOEV resulta a expensas de mayores niveles hepáticos del ARA y menores del EPA y DHA; indicando que la

inhibición competitiva entre las series n-3 y n-6 por las COX y la LOX disminuiría la formación de eicosanoides proagregantes e inflamatorios derivados del ARA aumentando así su contenido en tejido hepático y por el contrario aumentaría los eicosanoides derivados del EPA y docosanoides derivados del DHA con efecto antiinflamatorio, razón por lo cual estarían disminuidos estos AG en tejido hepático. No obstante, para confirmar este planteamiento se requiere de nuevas investigaciones que planteen la identificación y cuantificación de estos mediadores bioactivos a través de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS), e investigaciones que se valgan de la lipidómica con el objetivo de relacionar las composiciones lipídicas de los sistemas biológicos con sus funciones biológicas en cuanto a la expresión de los genes implicados en el metabolismo y función de los lípidos, incluyendo la regulación de genes¹⁰⁶.

Efecto de las intervenciones en el estrés oxidativo

Contrario a los resultados del estudio de Tsuduki *et al.*⁴⁶ en el que ratones alimentados con una dieta de aceite de pescado (5% aceite de pescado y 5% aceite de cártamo) la alimentación a largo plazo generó un fuerte EO que causó hiper peroxidación de fosfolípidos de membrana y una disminución en el sistema de defensa antioxidante debido a una disminución en el tocoferol en comparación con los ratones alimentados con una dieta de aceite de cártamo (10% aceite de cártamo)⁴⁶, los resultados de este estudio mostraron que la suplementación con DHA indujo una mejor defensa antioxidante en términos de mayor capacidad antioxidante sérica y provocó menores niveles en parámetros de EO (carbonilos proteicos hepáticos y MDA séricos) en relación con el grupo de animales tratados solo con DAG. Sin embargo, la suplementación conjunta de DHA+AOEV en comparación con la suplementación aislada de DHA además de generar los efectos mencionados solo por la suplementación con DHA, indujo menores niveles hepáticos de MDA entre los grupos con DAG y mayores niveles de glutatión total y GSH hepático entre los grupos alimentados con DC. De este modo, la defensa antioxidante en términos generales fue mayor para el grupo tratado con suplementación conjunta (DHA+AOEV).

Por otra parte, los mayores niveles de proteínas oxidadas que se encontraron en el grupo DAG en comparación con el grupo DC, pueden dar una explicación del menor contenido de los AGPICL EPA y DHA evidenciado en el grupo DAG; ya que la mejoría en la actividad de los radicales libres inducida por la exposición a la DAG produce interacciones de proteínas con radicales libres, tal como se evidencia por los altos niveles de carbonilos proteicos encontrados en este estudio. Al respecto, investigaciones recientes han planteado que esta interacción corresponde a un proceso oxidativo que puede involucrar la Δ -5 y Δ -6 desaturasa llevándolas a su inactivación debido al mal plegamiento de proteínas seguido de la degradación proteosomal¹⁰⁷; lo cual finalmente implica una reducción en la

biodisponibilidad de AGPICL en hígado inducida por la DAG. Interesantemente, se encontró que tanto la suplementación con DHA como la suplementación conjunta (DHA+AOEV) generaron una protección al atenuar el incremento en los niveles hepáticos de carbonilos proteicos generados como consecuencia de la alimentación con la DAG. De este modo, el tratamiento con DHA y AOEV podría implicar una citoprotección tanto frente al EO como frente al agotamiento hepático de AGPICL en la EHGNA.

Respecto a los procesos de peroxidación lipídica que han sido el blanco de discusión frente a la suplementación de AGPICL n-3, debido a investigaciones que han planteado que la suplementación con aceite de pescado está asociada con más severidad en la necroinflamación y fibrosis⁶⁷, y mayores niveles de lipoperóxidos hepáticos en dietas enriquecidas con AGPICL n-3, atribuyendo a esta situación como responsable de la injuria hepatocelular lipotóxica y del reclutamiento inflamatorio³⁷. Es importante resaltar que en esta investigación, si bien la suplementación con DHA generó menores niveles de MDA séricos, solo la suplementación conjunta (DHA+AOEV) fue capaz de atenuar los procesos de peroxidación lipídica hepática (menores niveles de MDA hepáticos) en aquellos animales expuestos a la DAG.

Efecto de las intervenciones en la inflamación

Este estudio encontró que solo la suplementación conjunta (DHA+AOEV) fue capaz de inducir una protección significativa frente a la producción de citoquinas inflamatorias generadas como consecuencia de la alimentación con DAG, alcanzándose a normalizar los niveles séricos de IL-6 en el grupo DAG+DHA+AOEV con relación a su grupo control. Estos resultados se encuentran en línea con el estudio de Itariu *et al.*¹⁰⁸ en el que la suplementación con AGPICL n-3 (3.3g/día de EPA y DHA) a pacientes con obesidad severa no diabéticos disminuyó la expresión de genes inflamatorios en tejido adiposo subcutáneo e incremento la producción de eicosanoides en tejido adiposo visceral y subcutáneo, y en comparación con sujetos control que recibieron grasa láctea, los niveles circulantes de IL-6 y la concentración de TAG disminuyó significativamente en el grupo con AGPICL n-3¹⁰⁸. De igual forma, con respecto a los mecanismos antiinflamatorios del AOEV, un estudio de una subpoblación del estudio PREDIMED encontró que la intervención con Dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen tuvo un efecto antiinflamatorio incitando una reducción significativa en las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-6 y de la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1)¹⁰⁹.

Los efectos protectores de la suplementación conjunta de DHA con AOEV frente a la inflamación generada por la exposición a la DAG podrían ser resultado de *i*) los AGPI n-3 pueden actuar por 2 mecanismos, primero reduciendo mediadores inflamatorios a través de la modulación en la expresión de genes inflamatorios en células inmunes¹¹⁰ y segundo

modulando la producción de citoquinas o la liberación del receptor soluble TNF a través de vías independientes de eicosanoides, por ejemplo, al influir en la composición y fluidez de la membrana, afectando los procesos de transducción de señales o moléculas segundos mensajeros, o uniendo o afectando receptores nucleares tales como los proliferadores de peroxisomas del factor nuclear- $\kappa\beta$ ^{111,112} y *ii*) los compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y antiinflamatoria presentes en el AOEV, son capaz de regular a la baja la vía NF- $\kappa\beta$ y específicamente la regulación a la baja en la expresión de múltiples genes inflamatorios incluyendo PTGS2, IL-1B, CCL3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4, IL-6 y OSM¹¹³.

De igual forma, ratificando el postulado de que el tejido adiposo visceral es un sitio de inflamación crónica, este estudio encontró una asociación positiva entre el peso del tejido adiposo y los niveles séricos de IL-6 y de TNF- α . Considerando que la suplementación conjunta de DHA con AOEV tuvo un marcado efecto en atenuar la ganancia de tejido adiposo como resultado de la exposición a la DAG; en consecuencia, este tratamiento se vería reflejado en una menor inflamación, actuando así como otro mecanismo de citoprotección frente a la progresión de la esteatosis hepática.

Efecto de las intervenciones en parámetros metabólicos

Paradójicamente se encontraron mayores niveles de glicemia en los grupos de animales suplementados con DHA o AOEV y alimentados con DC, por el contrario, en los animales alimentados con DAG aquellos suplementados tanto con DHA como con suplementación conjunta (DHA+AOEV) exhibieron menores niveles de glicemia. Al respecto, el rol de los ácidos grasos n-3 en la prevención de la diabetes tipo 2 no está completamente entendido. Reportes de metaanálisis y revisiones sistemáticas han indicado que el consumo de AGPI n-3 aumenta el riesgo de diabetes Tipo 2 en americanos y caucásicos pero lo reduce entre asiáticos^{114,115} y el estudio de Agrawal *et al.*¹¹⁶ en una muestra representativa de adultos en la India (99574 hombres y 56742 mujeres) encontró que el consumo de pescado diario o semanal se asoció positivamente con la presencia de diabetes¹¹⁶. En contraste, Rylander *et al.*¹¹⁷ encontraron que el consumo de pescado magro (75-100g/d) tuvo un efecto benéfico en la diabetes Tipo 2¹¹⁷ y un estudio de cohorte con un seguimiento por 19.3 años reportó que las concentraciones séricas de AGPICL n-3; un biomarcador objetivo de ingesta de pescado fue asociado con menor riesgo a largo plazo de diabetes tipo 2¹¹⁸.

Con relación a la insulinemia y la resistencia a la insulina (HOMA-IR), en los animales alimentados con DAG la suplementación conjunta de DHA con AOEV tuvo un mejor efecto que la administración aislada de estos compuestos en atenuar la resistencia a la insulina. Al respecto, estudios en roedores obesos han demostrado que la alimentación con una dieta rica en AGPICL n-3 protege a los animales contra el desarrollo de IR y

proporciona una mejor homeostasis de la glucosa¹¹⁹⁻¹²¹ y que en ratones obesos alimentados con DAG basada en aceite de maíz, un reemplazo en los lípidos dietarios del 5 al 44% por AG n-3 puede proteger contra el desarrollo de dislipidemia, alteración en el metabolismo de la glucosa e IR⁷⁷. Los efectos insulinosensibilizadores del DHA podrían ser consecuencia de *i*) la adiponectina inducida por EPA y DHA puede estimular la AMPK en el hígado, lo cual a su vez puede aumentar los efectos metabólicos de los AGPICL n-3 en la modulación de la actividad de los factores de transcripción PPAR- α y SREBP-1c; así la AMPK inhibe la lipogénesis y estimula la oxidación de AG y transporte de glucosa en las células. Como resultado de estos cambios, el contenido de TAG en el hígado disminuye y la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina aumenta¹²². Además, la inducción sobre el promotor del gen de la adiponectina a través de la vía PPAR- γ ¹²³ mejora la sensibilidad a la insulina al aumentar la perfusión del fluido intersticial en los adipocitos por su acción como espaciador intercelular²⁹ y *ii*) los AGPICL n-3 aumentan la fluidez de la membrana, por lo cual aumentan el número de receptores de insulina en la membrana celular y la promoción de la translocación de los transportadores de glucosa tipo 4 dependiente de insulina (GLUT-4) a la superficie de membrana²⁶. Acerca de los efectos insulinosensibilizadores del AOEV, estudios sobre los beneficios de la Dieta Mediterránea la cual es rica en aceite de oliva han demostrado que una mayor adherencia a la Dieta Mediterránea está asociada con menor grado de IR y menor grado de severidad hepática entre pacientes con EHGNA¹²⁴. De este modo, la administración conjunta del DHA con AOEV podría potenciar los efectos insulinosensibilizadores atribuidos a estos componentes y así actuar como una terapia protectora frente al desarrollo y la progresión de la EHGNA.

Por último, cabe resaltar que la resistencia a la insulina que se encontró en ratones alimentados con DAG podría ser otro de los mecanismos que dé cuenta del agotamiento de los AGPICL en hígado encontrado en este grupo de animales, ya que ha sido reportado que la insulina regula a la baja la expresión del mRNA de las desaturasas Δ -5 y Δ -6 en ratones¹²⁵. Así, dado que la suplementación conjunta de DHA con AOEV tuvo un mayor efecto en prevenir el desarrollo de IR asociada a la alimentación con DAG, esto implicaría otro mecanismo de protección frente al agotamiento hepático de AGPICL n-3 y por ende frente a la progresión de la esteatosis hepática.

Limitaciones

Si bien los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a la enfermedad del hígado graso, en donde los trabajos en roedores han sido ampliamente usados dada su similitud biológica con el hombre y el gran conocimiento que se tiene a todos los niveles (genético, molecular, enzimático) de estas especies¹²⁶, los hallazgos de este estudio se restringen al modelo murino y son necesarios estudios clínicos controlados en humanos que permitan respaldar y

validar los mecanismos citoprotectores de la suplementación conjunta de DHA con AOEV descritos en los resultados presentados. Además, se debe considerar que si bien el modelo utilizado para inducir esteatosis hepática (DAG certificada) es uno de los más indicados para desarrollar injuria hepática de origen nutricional en ratones; en humanos un enfoque solo en función del contenido graso en la dieta podría ser una mirada simplista frente a la patogenia de la EHGNA, ya que cabría considerar aspectos relacionados con calidad de la dieta que contemplen la ingesta de bebidas ricas en fructosa, carnes rojas y embutidos, alimentos procesados, entre otros, y que además considere influencias ambientales como son el sedentarismo y la transgresión ambiental, y la predisposición genética.

De igual forma, nuevas investigaciones que incluyan la determinación de mediadores bioactivos derivados del DHA por medio de la técnica HPCL o la GC/MS ayudarían a entender los posibles mecanismos de protección del tratamiento conjunto de DHA con AOEV frente a la depleción de AGPICL en hígado ocasionada por la alimentación con una DAG que fueron propuestos en este trabajo.

Conclusiones y proyecciones

A saber este es el primer estudio en evaluar el efecto de la suplementación conjunta de DHA con AOEV en la prevención de la esteatosis hepática y alteraciones metabólicas inducidas por la DAG en ratón. Si bien hay reportes de investigaciones que hayan evaluado el efecto aislado de estos componentes en la EHGNA, según la búsqueda realizada solo el estudio de Provenzano *et al.*⁶⁷ evaluó el efecto de la suplementación con aceite de oliva solo o de aceite de oliva junto con AGPICL n-3 en el desarrollo y la progresión de la esteatosis experimental. No obstante, a diferencia de este estudio la suplementación con AGPICL n-3 incluyó el EPA y DHA y el modelo experimental, la dosis de suplementación y naturaleza de los productos difiere con la metodología de esta investigación.

Este trabajo evaluó si al administrar una dosis menor de DHA en conjunto con AOEV se podrían potenciar los efectos hepatoprotectores de estos agentes frente a la EHGNA y si esta suplementación conjunta lograría proteger frente a la pérdida de la defensa antioxidante y procesos de hiper peroxidación de lípidos asociados a una alta ingesta de AGPICL n-3. Al respecto, se encontró que el tratamiento con suplementación conjunta de DHA y AOEV generó una mayor capacidad antioxidante sérica y menores parámetros de estrés oxidativo (proteínas oxidadas y MDA sericos y hepáticos) en relación con los animales alimentados solo con DAG; lo cual lleva a plantear la administración conjunta de DHA y AOEV como una estrategia de protección frente al EO en la EHGNA. A su vez, se encontró que la suplementación conjunta de DHA con AOEV generó una mayor protección que la suplementación aislada de estos componentes frente a la alimentación con DAG en *i*) reducción de la esteatosis hepática; *ii*) menor lipoperoxidación en hígado; *iii*) menor

respuesta proinflamatoria y *iv*) menor resistencia a la insulina (**Figura 15**). Además, la suplementación conjunta (DHA+AOEV) indujo una normalización en el contenido de grasa total y de TAG hepáticos y en los niveles séricos de IL-6 en los animales alimentados con DAG con relación a su grupo control (**Figura 15**). Por lo tanto, la administración conjunta de DHA con AOEV podría ser considerada como una potencial línea terapéutica para el manejo de la EHGNA y prevención en la progresión de la esteatosis no alcohólica. No obstante, estudios clínicos controlados en humanos son necesarios para la validación de este tratamiento como una terapia nutricional en pacientes con EHGNA.

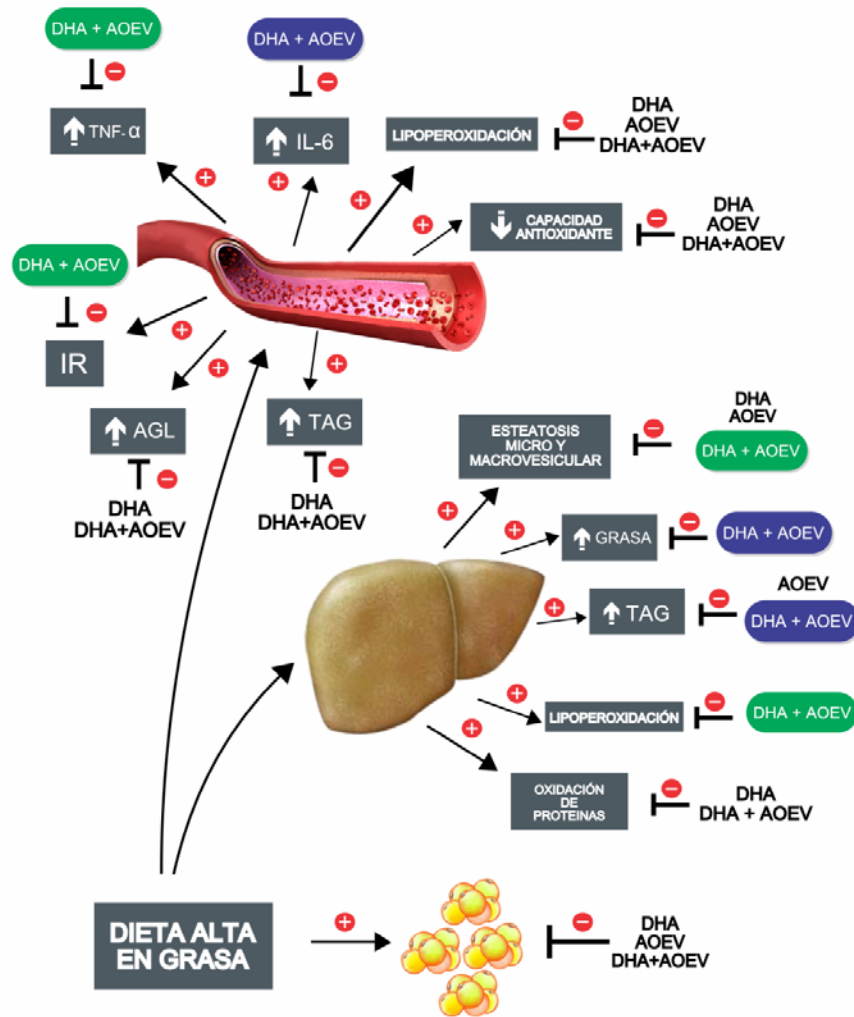


Figura 15. Efectos de la alimentación con una DAG por un periodo de 12 semanas y protección otorgada por los diferentes tipos de tratamientos. → y + indican estímulo, ⊥ y - indican protección. ■ verde Indica una mayor protección en comparación con los otros tratamientos. ■ azul Indica normalización con respecto al grupo control.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo lo dedico especialmente a mi familia y novio. Para mis padres un eterno agradecimiento por enseñarme el camino, a mis hermanos por sus sabios consejos y su acompañamiento en esta etapa de mi vida y a mi novio por su apoyo incondicional y colaboración en este proceso.

Mis más sentidos agradecimientos al director de tesis Dr. Rodrigo Valenzuela por su valiosa orientación en este proceso, por todas sus enseñanzas académicas y por motivarme a continuar en el área de la investigación.

A la comisión evaluadora agradezco sus recomendaciones, disposición y sus valiosos aportes para este proyecto.

A Alicia Corbari, Patricio Muñoz, Alejandra Espinosa y Romina Vargas por su acompañamiento y enseñanzas que facilitaron el proceso de aprendizaje a nivel de laboratorio.

A mis amigos que a pesar de la distancia siempre están presentes y a las nuevas amistades forjadas durante mi estancia en Santiago, porque su acogida, grata compañía y sus lecciones de vida han contribuido enormemente en este proceso de crecimiento personal y académico.

REFERENCIAS

1. Anderson, N. & Borlak, J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol. Rev.* **60**, 311–57 (2008).
2. Abenavoli, L. *et al.* Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: Mediterranean diet. *World J. Gastroenterol.* **20**, 16831–16840 (2014).
3. Shpyleva, S. *et al.* Interstrain differences in the progression of nonalcoholic steatohepatitis to fibrosis in mice are associated with altered hepatic iron metabolism. *J. Nutr. Biochem.* (2014). doi:10.1016/j.jnutbio.2014.06.012
4. Milić, S. & Stimac, D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig. Dis.* **30**, 158–62 (2012).
5. Centis, E., Marzocchi, R., Di Domizio, S., Ciaravella, M. F. & Marchesini, G. The effect of lifestyle changes in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.* **28**, 267–73 (2010).
6. Ayyad, C. & Andersen, T. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obes. Rev.* **1**, 113–9 (2000).
7. Dudekula, A., Rachakonda, V., Shaik, B. & Behari, J. Weight loss in nonalcoholic Fatty liver disease patients in an ambulatory care setting is largely unsuccessful but correlates with frequency of clinic visits. *PLoS One* **9**, e111808 (2014).
8. Park, H. J. *et al.* Green tea extract suppresses NFκB activation and inflammatory responses in diet-induced obese rats with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr.* **142**, 57–63 (2012).
9. Rector, R. S., Thyfault, J. P., Wei, Y. & Ibdah, J. A. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J. Gastroenterol.* **14**, 185–92 (2008).
10. Pagano, G. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* **35**, 367–72 (2002).
11. Liu, Z. L. *et al.* Herbal medicines for fatty liver diseases. *Cochrane database Syst. Rev.* **8**, CD009059 (2013).

12. Marcolin, E. *et al.* Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr.* **142**, 1821–8 (2012).
13. Hashemi Kani, A., Alavian, S. M., Haghghatdoost, F. & Azadbakht, L. Diet macronutrients composition in nonalcoholic Fatty liver disease: a review on the related documents. *Hepat. Mon.* **14**, e10939 (2014).
14. Da Silva, H. E. *et al.* A cross-sectional study assessing dietary intake and physical activity in Canadian patients with nonalcoholic fatty liver disease vs healthy controls. *J. Acad. Nutr. Diet.* **114**, 1181–94 (2014).
15. Nseir, W., Hellou, E. & Assy, N. Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9338–44 (2014).
16. 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.* **2**, 644–8 (2011).
17. Araya, J. *et al.* 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. (Lond).* **106**, 635–43 (2004).
18. Zelber-Sagi, S. *et al.* Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J. Hepatol.* **47**, 711–7 (2007).
19. Kargulewicz, A., Stankowiak-Kulpa, H. & Grzymisławski, M. Dietary recommendations for patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Przeгляд Gastroenterol.* **9**, 18–23 (2014).
20. Allard, J. P. *et al.* Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J. Hepatol.* **48**, 300–7 (2008).
21. Masterton, G. S., Plevris, J. N. & Hayes, P. C. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **31**, 679–92 (2010).
22. Xin, Y.-N., Xuan, S.-Y., Zhang, J.-H., Zheng, M.-H. & Guan, H.-S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a specific liver drug for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Med. Hypotheses* **71**, 820–1 (2008).
23. Hanke, D., Zahradka, P., Mohankumar, S. K., Clark, J. L. & Taylor, C. G. A diet high in α -linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis

- and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **89**, 391–401
24. Shapiro, H. *et al.* The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Nutr.* **30**, 6–19 (2011).
 25. Rahmawaty, S., Lyons-Wall, P., Charlton, K., Batterham, M. & Meyer, B. J. Effect of replacing bread, egg, milk, and yogurt with equivalent ω -3 enriched foods on ω -3 LCPUFA intake of Australian children. *Nutrition* **30**, 1337–43
 26. Gormaz, J. G., Rodrigo, R., Videla, L. A. & Beems, M. Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Prog. Lipid Res.* **49**, 407–19 (2010).
 27. Inagaki, T. *et al.* Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**, 415–25 (2007).
 28. Huang, Y. Y., Gusdon, A. M. & Qu, S. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular pathways and therapeutic strategies. *Lipids Health Dis.* **12**, 171 (2013).
 29. Nakamura, M. T., Yudell, B. E. & Loor, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **53**, 124–44 (2014).
 30. Nakamura, M. T., Cheon, Y., Li, Y. & Nara, T. Y. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* **39**, 1077–83 (2004).
 31. Simopoulos, A. P. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev. Nutr. Diet.* **100**, 1–21 (2009).
 32. Kelley, D. S. *et al.* Flaxseed oil prevents trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-induced insulin resistance in mice. *Br. J. Nutr.* **101**, 701–8 (2009).
 33. Ordonez, R., Carbajo-Pescador, S., Mauriz, J. L. & Gonzalez-Gallego, J. Understanding nutritional interventions and physical exercise in non-alcoholic Fatty liver disease. *Curr. Mol. Med.* **15**, 3–26 (2015).
 34. Tanaka, T. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15924–9 (2003).
 35. Capanni, M. *et al.* Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 1143–51 (2006).

36. Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. & Stanton, C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J. Nutr. Metab.* **2012**, 539426 (2012).
37. Larter, C. Z. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by dietary fish oil attenuates steatosis, but does not prevent experimental steatohepatitis because of hepatic lipoperoxide accumulation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 267–75 (2008).
38. Clària, J., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Rius, B. & Titos, E. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Front. Immunol.* **2**, 49 (2011).
39. González-Pérez, A. *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* **20**, 2537–9 (2006).
40. Rogue, A. *et al.* PPAR agonists reduce steatosis in oleic acid-overloaded HepaRG cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **276**, 73–81 (2014).
41. Zivkovic, A. M., German, J. B. & Sanyal, A. J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 285–300 (2007).
42. St-Jules, D. E. *et al.* Estimation of fish and ω -3 fatty acid intake in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **57**, 627–33 (2013).
43. Yashodhara, B. M. *et al.* Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad. Med. J.* **85**, 84–90 (2009).
44. Poudyal, H., Panchal, S. K., Diwan, V. & Brown, L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog. Lipid Res.* **50**, 372–87 (2011).
45. Depner, C. M., Philbrick, K. A. & Jump, D. B. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr(-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr.* **143**, 315–23 (2013).
46. 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* **27**, 334–7 (2011).

47. Rosignoli, P., Fuccelli, R., Fabiani, R., Servili, M. & Morozzi, G. Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1513–9 (2013).
48. Bermudez, B. *et al.* Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 831–43 (2011).
49. Omar, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* **78**, 133–54 (2010).
50. Rosillo, M. Á. *et al.* Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 1275–81 (2014).
51. Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J. & Keast, R. S. J. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 218–36 (2009).
52. Masarone, M., Federico, A., Abenavoli, L., Loguercio, C. & Persico, M. Non Alcoholic Fatty Liver. Epidemiology and Natural history. *Rev. Recent Clin. Trials* (2014). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25514916>>
53. Valenzuela, R. *et al.* Reduction in the desaturation capacity of the liver in mice subjected to high fat diet: Relation to LCPUFA depletion in liver and extrahepatic tissues. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **98**, 7–14 (2015).
54. Tapia, G. *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.* **58**, 1333–41 (2014).
55. Valenzuela, R. *et al.* N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS One* **7**, e46400 (2012).
56. Dossi, C. G., Tapia, G. S., Espinosa, A., Videla, L. A. & 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.* **25**, 977–84 (2014).
57. Dyerberg, J., Madsen, P., Møller, J. M., Aardestrup, I. & Schmidt, E. B. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **83**, 137–41 (2010).
58. Watanabe, S. *et al.* Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Res.* **45**, 363–77 (2015).

59. Ji, H.-F., Sun, Y. & Shen, L. Effect of vitamin E supplementation on aminotransferase levels in patients with NAFLD, NASH, and CHC: results from a meta-analysis. *Nutrition* **30**, 986–91 (2014).
60. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A. & Bacon, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 2467–74 (1999).
61. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–7 (1959).
62. Morrison, W. R. & Smith, L. M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600–8 (1964).
63. Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–65 (2006).
64. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54 (1976).
65. Matthews, D. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–9 (1985).
66. Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499–502 (1972).
67. Provenzano, A. *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids worsen inflammation and fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **34**, 918–30 (2014).
68. Estadella, D. *et al.* Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators Inflamm.* **2013**, 137579 (2013).
69. Nissar, A. U., Sharma, L. & Tasduq, S. A. Palmitic acid induced lipotoxicity is associated with altered lipid metabolism, enhanced CYP450 2E1 and intracellular calcium mediated ER stress in human hepatoma cells. *Toxicol. Res.* **4**, 1344–1358 (2015).
70. Valdecantos, M. P. *et al.* Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **84**, 263–78 (2015).

71. Buckley, J. D. & Howe, P. R. C. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. *Nutrients* **2**, 1212–30 (2010).
72. Baillie, R. A., Takada, R., Nakamura, M. & Clarke, S. D. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **60**, 351–6
73. Belzung, F., Raclot, T. & Groscolas, R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am. J. Physiol.* **264**, R1111–8 (1993).
74. Cunnane, S. C., McAdoo, K. R. & Horrobin, D. F. n-3 Essential fatty acids decrease weight gain in genetically obese mice. *Br. J. Nutr.* **56**, 87–95 (1986).
75. Hainault, I., Carolotti, M., Hajduch, E., Guichard, C. & Lavau, M. Fish oil in a high lard diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **683**, 98–101 (1993).
76. Ruzickova, J. *et al.* Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* **39**, 1177–85 (2004).
77. Flachs, P. *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* **48**, 2365–75 (2005).
78. Lim, J.-H. *et al.* Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. *J. Biol. Chem.* **288**, 7117–26 (2013).
79. Day, C. P. & James, O. F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* **27**, 1463–6 (1998).
80. Soni, N. K., Nookaew, I., Sandberg, A.-S. & Gabrielsson, B. G. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis.* **14**, 74 (2015).
81. Espinosa, A. *et al.* Prevention of liver steatosis through fish oil supplementation: correlation of oxidative stress with insulin resistance and liver fatty acid content. *Arch. Latinoam. Nutr.* **63**, 29–36 (2013).
82. Jump, D. B., Depner, C. M., Tripathy, S. & Lytle, K. A. Impact of dietary fat on the development of non-alcoholic fatty liver disease in Ldlr $^{-/-}$ mice. *Proc. Nutr. Soc.* 1–9 (2015). doi:10.1017/S002966511500244X

83. Scorletti, E. *et al.* Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: results from the Welcome* study. *Hepatology* **60**, 1211–21 (2014).
84. Buettner, R. *et al.* Olive oil attenuates the cholesterol-induced development of nonalcoholic steatohepatitis despite increased insulin resistance in a rodent model. *Horm. Metab. Res.* **45**, 795–801 (2013).
85. Park, S., Choi, Y., Um, S.-J., Yoon, S. K. & Park, T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *J. Hepatol.* **54**, 984–93 (2011).
86. Hussein, O. *et al.* Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J. Gastroenterol.* **13**, 361–8 (2007).
87. Wong, S. H. *et al.* The adaptive effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **792**, 103–9 (1984).
88. Rivellese, A. A., De Natale, C. & Lilli, S. Type of dietary fat and insulin resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **967**, 329–35 (2002).
89. Assy, N., Nassar, F., Nasser, G. & Grosovski, M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **15**, 1809–15 (2009).
90. Moore, S. A., Hurt, E., Yoder, E., Sprecher, H. & Spector, A. A. Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* **36**, 2433–43 (1995).
91. Sprecher, H. The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **67**, 79–83
92. Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A. & Salem, N. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J. Lipid Res.* **42**, 1257–65 (2001).
93. DeLany, J. P., Windhauser, M. M., Champagne, C. M. & Bray, G. A. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 905–11 (2000).
94. Nettleton, J. A. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.* **91**, 331–7 (1991).

95. Ezaki, O. *et al.* Long-term effects of dietary alpha-linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **45**, 759–72 (1999).
96. Ghafoorunissa, Vani, A., Laxmi, R. & Sesikeran, B. Effects of dietary alpha-linolenic acid from blended oils on biochemical indices of coronary heart disease in Indians. *Lipids* **37**, 1077–86 (2002).
97. Huang, Y. S., Horrobin, D. F. & Manku, M. S. Short-term effect of dietary cholesterol on tissue n-6 fatty acids in fat-deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **178**, 209–14 (1985).
98. Huang, Y. S., Mills, D. E., Ward, R. P., Simmons, V. A. & Horrobin, D. F. Stress modulates cholesterol-induced changes in plasma and liver fatty acid composition in rats fed n-6 fatty acid-rich oils. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**, 136–41 (1990).
99. Garg, M. L., Snoswell, A. M. & Sabine, J. R. Influence of dietary cholesterol on desaturase enzymes of rat liver microsomes. *Prog. Lipid Res.* **25**, 639–44 (1986).
100. Jones, D. B., Carter, R. D. & Mann, J. I. Indirect evidence of impairment of platelet desaturase enzymes in diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* **18**, 341–4 (1986).
101. Bassi, A. *et al.* Short-term diabetic ketosis alters n-6 polyunsaturated fatty acid content in plasma phospholipids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 1650–3 (1996).
102. Araya, J. *et al.* Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 1460–3 (2010).
103. Serhan, C. N. *et al.* Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* **192**, 1197–204 (2000).
104. Bazan, N. G. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **10**, 136–41 (2007).
105. Freire, M. O. & Van Dyke, T. E. Natural resolution of inflammation. *Periodontol. 2000* **63**, 149–64 (2013).
106. Spener, F., Lagarde, M., G elo en, A. & Record, M. Editorial: What is lipidomics? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 481–482 (2003).
107. Shang, F. & Taylor, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 5–16 (2011).

108. Itariu, B. K. *et al.* Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 1137–49 (2012).
109. Urpi-Sarda, M. *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.* **142**, 1019–25 (2012).
110. Zeyda, M. & Stulnig, T. M. Lipid Rafts & Co.: an integrated model of membrane organization in T cell activation. *Prog. Lipid Res.* **45**, 187–202 (2006).
111. Pischon, T. *et al.* Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* **108**, 155–60 (2003).
112. Graber, R., Sumida, C. & Nunez, E. A. Fatty acids and cell signal transduction. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **9**, 91–116 (1994).
113. Camargo, A. *et al.* Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC Genomics* **11**, 253 (2010).
114. Li, D. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: meta-analysis based systematic review. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **24**, 10–5 (2015).
115. Muley, A., Muley, P. & Shah, M. ALA, fatty fish or marine n-3 fatty acids for preventing DM?: a systematic review and meta-analysis. *Curr. Diabetes Rev.* **10**, 158–65 (2014).
116. Agrawal, S., Millett, C., Subramanian, S. V & Ebrahim, S. Frequency of fish intake and diabetes among adult Indians. *J. Am. Coll. Nutr.* **33**, 215–30 (2014).
117. Rylander, C., Sandanger, T. M., Engeset, D. & Lund, E. Consumption of lean fish reduces the risk of type 2 diabetes mellitus: a prospective population based cohort study of Norwegian women. *PLoS One* **9**, e89845 (2014).
118. Virtanen, J. K., Mursu, J., Voutilainen, S., Uusitupa, M. & Tuomainen, T.-P. Serum omega-3 polyunsaturated fatty acids and risk of incident type 2 diabetes in men: the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor study. *Diabetes Care* **37**, 189–96 (2014).
119. Storlien, L. H. *et al.* Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* **237**, 885–8 (1987).

120. Storlien, L. H. *et al.* Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**, 280–9 (1991).
121. Lombardo, Y. B. & Chicco, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 1–13 (2006).
122. Kuda, O. *et al.* n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* **52**, 941–51 (2009).
123. Iwaki, M. *et al.* Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**, 1655–63 (2003).
124. Kontogianni, M. D. *et al.* Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Nutr.* **33**, 678–83 (2014).
125. Brenner, R. R. Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**, 151–62 (2003).
126. Ayala, I., Camara, P. & Fernández-Pardo, J. Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. *Anales de Veterinaria de Murcia* **24**, (2008).