



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**CAMBIOS EN EL PERFIL HEPÁTICO DE ÁCIDOS GRASOS EN
RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA:
EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDOS
EICOSAPENTAENOICO Y DOCOSAHEXAENOICO**

DANIEL ALONSO GONZÁLEZ MAÑÁN

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

Profesor Patrocinante

Dra. M^a Antonieta Valenzuela Pedevila
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de Memoria

Dra. Gladys Tapia Opazo
Laboratorio de Estrés Oxidativo y
Hepatotoxicidad
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Santiago de Chile
- 2012 -

*«El estado actual de nuestro conocimiento es siempre provisional y...
debe haber, más allá de lo que se sabe, vastas regiones nuevas por descubrir»*

Louis de Broglie, Premio Nobel de Física 1929

Dedicado a mi familia, amigos y todos aquéllos que creyeron en mí y me acompañaron durante este largo pero fructífero sendero.

Mi gratitud hacia ustedes será eterna.

FINANCIAMIENTO

Esta memoria fue financiada por el proyecto Fondecyt Regular N°1110043, otorgado a la Dra. Gladys Tapia Opazo para su desarrollo durante el periodo 2011-2014.

ASISTENCIA A CONGRESOS

- **2011** XXXIII CONGRESO ANUAL SOCIEDAD DE FARMACOLOGÍA DE CHILE, OLMUÉ, CHILE. Tapia, G; D'Espessailles, A; Valenzuela, R; **González, D**. *La suplementación con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga previenen el estrés oxidativo y la esteatosis en ratones alimentados con una dieta alta en grasas.*
- **2011** II SIMPOSIO “RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES”, FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS GROUP, SANTIAGO, CHILE. **González, D**; Valenzuela, R; Dossi, C; D'Espessailles, A; Poblete, I; Cataldo, X; Varela, P; Tapia, G. *Cambios en los niveles de 8-isoprostanos, proteínas oxidadas y glutatión hepáticos en ratones obesos suplementados dietariamente con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3.*
- **2011** XXII CONGRESO ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE ENDOCRINOLOGÍA Y DIABETES, ANTOFAGASTA, CHILE. **González, D**; Valenzuela, R; Dossi, C; Tapia, G. *Determinación de la dosis de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico en la prevención de resistencia a la insulina inducida por dieta hipergrasa en ratón.*
- **2011** XIX CONGRESO DE NUTRICIÓN SOCIEDAD CHILENA DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA, COQUIMBO, CHILE. **González, D**; Valenzuela, R; D'Espessailles, A; Tapia, G. *Expresión de ACOX y CAT-1 en la prevención de la esteatosis hepática inducida por EPA y DHA, en ratones alimentados con una dieta hipergrasa.*
- **2011** XIX CONGRESO DE NUTRICIÓN SOCIEDAD CHILENA DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA, COQUIMBO, CHILE. Valenzuela, R; Espinosa, A; **González, D**; Tapia, G. *La suplementación con EPA y DHA previenen de esteatosis hepática y resistencia a la insulina inducidas por dieta hipergrasa: cambios en el perfil hepático de ácidos grasos en ratón.*

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico.....	1
1.2 Patogenia de la esteatosis hepática asociada a la EHGNA	3
1.2.1 Resistencia a la insulina	4
1.2.2 Disminución de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 en el hígado de pacientes con EHGNA.....	5
1.3 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	7
1.3.1 Generalidades.....	7
1.3.2 AGPICL ω -3 y efectos positivos para la salud	8
1.3.3 Relación de los ácidos grasos ω -6/ ω -3 e implicancia en la salud	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS GENERALES	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
5. METODOLOGÍA	12
5.1 Animales de experimentación.....	12
5.2 Diseño experimental	12
5.3 Evaluación de la histología hepática.....	16
5.4 Determinación de resistencia a la insulina mediante el índice HOMA-IR.....	16
5.5 Niveles plasmáticos de TNF- α	17
5.6 Determinación del perfil de ácidos grasos hepáticos totales y relación ω -6/ ω -3.....	17
5.6.1 Extracción de materia grasa.	17
5.6.2 Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos	18

5.6.3	Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos	18
5.7	Expresión de resultados y análisis estadístico.....	19
6.	RESULTADOS.....	20
6.1	Incremento en el peso corporal de los ratones	20
6.1.1	Tratamiento durante 8 semanas.....	20
6.1.2	Tratamiento durante 12 semanas.....	21
6.2	Evaluación de la esteatosis por histología hepática	23
6.2.1	Tratamiento durante 8 semanas.....	23
6.2.2	Tratamiento durante 12 semanas.....	24
6.3	Resistencia a la insulina	25
6.3.1	Niveles plasmáticos de insulina, glucosa y HOMA-IR en ratones con 8 semanas de tratamiento	25
6.3.2	Niveles plasmáticos de insulina, glucosa y HOMA-IR en ratones con 12 semanas de tratamiento	26
6.4	Inflamación sistémica: Niveles plasmáticos de TNF- α	27
6.5	Cambios en el perfil hepático de ácidos grasos	29
6.5.1	Tratamiento durante 8 semanas.....	29
6.5.1.1	Contenido hepático total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados	29
6.5.1.2	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3	30
	i) Niveles de AGPICL	30
	ii) Niveles de AGPI ω -6 y ω -3	30
	iii) Relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3.....	30
6.5.1.3	Niveles hepáticos de EPA, DHA y EPA+DHA	32
	i) Niveles de EPA.....	32
	ii) Niveles de DHA	32
	iii) Niveles de EPA+DHA.....	32
6.5.2	Tratamiento durante 12 semanas.....	34
6.5.2.1	Contenido hepático total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados	34
6.5.2.2	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3	35
	i) Niveles de AGPICL	35
	ii) Niveles de AGPI ω -6 y ω -3	35
	iii) Relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3.....	35
6.5.2.3	Niveles hepáticos de EPA, DHA y EPA+DHA.....	36

i) Niveles de EPA.....	36
ii) Niveles de DHA	37
iii) Niveles de EPA+DHA.....	37
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES.....	46
9. ANEXO	47
9.1 Certificado de aprobación del comité de bioética.....	47
9.2 Modelo de cromatograma obtenido a partir de un cromatógrafo de gas-liquido.	48
10. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Vías metabólicas que contribuyen al desarrollo de esteatosis hepática.	3
Figura 2 Malnutrición por exceso y su relación con el estrés oxidativo, resistencia a la insulina, y disminución de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICL ω -3) en el desarrollo de la esteatosis hepática.	6
Figura 3 Metabolización de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 y ω -3. Vías de desaturación y elongación de los ácidos linoleico y α -linolénico.	8
Figura 4 Representación esquemática del diseño experimental utilizado.	15
Figura 5 Incremento en el peso corporal de ratones con 8 semanas de tratamiento.	20
Figura 6 Incremento en el peso corporal de ratones con 12 semanas de tratamiento.	21
Figura 7 Histología hepática de ratones con 8 semanas de tratamiento.	23
Figura 8 Histología hepática de ratones con 12 semanas de tratamiento.	24
Figura 9 Resistencia a la insulina en ratones con 8 semanas de tratamiento.	25
Figura 10 Resistencia a la insulina en ratones con 12 semanas de tratamiento.	26

Figura 11	Niveles plasmáticos de TNF- α en ratones con 8 y 12 semanas de tratamiento.	28
Figura 12	Contenido hepático total de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) en ratones con 8 semanas de tratamiento.	29
Figura 13	Contenido hepático de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (AGPI ω -6), ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI ω -3) y relación entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 (relación ω -6/ ω -3) en ratones con 8 semanas de tratamiento.	31
Figura 14	Niveles hepáticos de ácido eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y de EPA + DHA en ratones con 8 semanas de tratamiento.	33
Figura 15	Contenido hepático total de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), en ratones con 12 semanas de tratamiento.	34
Figura 16	Contenido hepático de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (AGPI ω -6), ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI ω -3) y relación entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 (relación ω -6/ ω -3) en ratones con 12 semanas de tratamiento.	36
Figura 17	Niveles hepáticos de ácido eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y de EPA + DHA en ratones con 12 semanas de tratamiento.	37

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Composición nutricional y aporte calórico de la dieta control experimental.	13
Tabla 2 Composición nutricional y aporte calórico de la dieta alta en grasa experimental.	14
Tabla 3 Peso corporal de los ratones al inicio y final de las 8 y 12 semanas de tratamiento.	22
Tabla 4 Resistencia a la insulina en ratones con 8 y 12 semanas de tratamiento.	27
Tabla 5 Niveles plasmáticos de TNF- α en ratones con 8 y 12 semanas de tratamiento.	28
Tabla 6 Composición de ácidos grasos hepáticos en ratones controles y altos en grasa suplementados durante 8 semanas con EPA y DHA.	38
Tabla 7 Composición de ácidos grasos hepáticos en ratones controles y altos en grasa suplementados durante 12 semanas con EPA y DHA.	39

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico.
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados.
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados.
AGPICL ω-3	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3.
AGPICL ω-6	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-6.
AGPICL	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
AGS	Ácidos grasos saturados.
BF₃	Trifluoruro de boro.
BHT	Butilhidroxitolueno.
DHA	Ácido docosahexaenoico.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EHGNA	Enfermedad por hígado graso no alcohólico.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos grasos.
EPA	Ácido eicosapentaenoico.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
H₂SO₄	Ácido sulfúrico.
HSL	Lipasa sensible a hormonas.
HOMA	Homeostasis model assessment.
IL-1β	Interleuquina-1-beta.
IL-6	Interleuquina-6.

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
PPAR-α	Receptor activado por proliferadores peroxisomales-alfa.
PPAR-γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales-gamma.
SREBP-1c	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c.
TAG	Triglicéridos.
TMB	3,3'-5,5'-tetrametilbencidina.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad.

RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICL ω -3) son compuestos que están asociados a múltiples funciones fisiológicas, lo que sugiere que su administración puede prevenir varias enfermedades crónicas no transmisibles. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de la suplementación con AGPICL ω -3 en la prevención de la esteatosis hepática, resistencia a la insulina e inflamación sistémicas, en ratones alimentados con una dieta enriquecida en grasa. Para tales propósitos, ratones C57BL/6J machos recibieron (a) dieta control (10% grasa, 20% proteína, 70% carbohidrato), (b) dieta control más AGPICL ω -3 (108 mg/kg/día de ácido eicosapentaenoico más 92 mg/kg/día de ácido docosahexaenoico), (c) dieta alta en grasa (60% grasa, 20% proteína, 20% carbohidrato) y (d) dieta alta en grasa más AGPICL ω -3, durante períodos de 8 y 12 semanas. Se determinaron parámetros de peso corporal, resistencia a la insulina, inflamación sistémica, esteatosis hepática y composición hepática de ácidos grasos. La alimentación con dieta alta en grasa aumentó significativamente el peso corporal e indujo esteatosis hepática del tipo macrovesicular, junto con elevar los niveles plasmáticos de insulina y glucosa en ayuno, HOMA-IR (homeostasis model assessment) y los niveles plasmáticos de TNF- α . También se observó disminución en los niveles hepáticos de AGPICL ω -3 y un aumento en la relación ω -6/ ω -3 al comparar con el grupo control. Estas alteraciones fueron reducidas o normalizadas a valores control en animales alimentados con dieta alta en grasa y suplementados con AGPICL ω -3, junto con aumentos significativos en los niveles hepáticos de AGPICL ω -3 y disminución en la relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3. Por lo tanto, el restablecimiento de los niveles de AGPICL ω -3 en ratones alimentados con dieta alta en grasa y suplementados con EPA y DHA reduce el contenido lipídico hepático, disminuye la inflamación sistémica y mejora la sensibilidad a la insulina.

ABSTRACT

Changes on hepatic lipid profile in high-fat diet mice: effects of supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids.

Omega-3 (ω -3) long-chain polyunsaturated fatty acids (ω -3 LCPUFA) are associated with several physiological functions, suggesting that their administration may prevent many non transmissible chronic diseases. Therefore, prevention of liver steatosis, insulin resistance and systemic inflammation by LCPUFA supplementation in mice fed a high fat diet were evaluated. For these purposes, male C57BL/6J mice received (a) control diet (10% fat, 20% protein, 70% carbohydrate), (b) control diet plus ω -3 LCPUFA (108 mg/kg/day eicosapentaenoic acid plus 92 mg/kg/day docosahexaenoic acid), (c) high fat diet (60% fat, 20% protein, 20% carbohydrate), or (d) high fat diet plus ω -3 LCPUFA for 8 and 12 weeks. Parameters of body weight, insulin resistance, systemic inflammation, liver steatosis and fatty acid analysis were determined. High fat diet significantly increased body weight and induced macrovesicular steatosis, concomitantly with higher fasting serum glucose and insulin levels, HOMA-IR (homeostasis model assessment), and plasmatic TNF- α levels. Hepatic ω -3 LCPUFA depletion and elevated ω -6/ ω -3 ratio over control values were also observed. These changes were either reduced or normalized to control values in animals subjected to high fat diet and ω -3 LCPUFA supplementation, with significant increased hepatic total ω -3 LCPUFA content and reduced ω -6/ ω -3 ratio. So, repletion of liver ω -3 LCPUFA levels by ω -3 LCPUFA dietary supplementation in high fat diet mice reduces hepatic lipid content, systemic inflammation and improves insulin sensitivity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) corresponde a un término clínico-patológico que abarca un espectro amplio de enfermedades cuyo sello distintivo es la acumulación anormalmente alta de triglicéridos (TAG) en el tejido hepático (niveles de TAG superiores al 5% del peso del hígado, fenómeno conocido como esteatosis hepática), sin ingestas significativas de alcohol y en ausencia de marcadores de daño hepático virales, congénitos o autoinmunes (Musso *et al.*, 2009). La EHGNA es la causa más común de enfermedad hepática crónica en occidente con una prevalencia estimada de un 20-30% en la población general (Anderson & Borlak, 2008; Pettinelli *et al.*, 2011). Se encuentra fuertemente asociada a la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemia, factores de riesgo de gran impacto en la actualidad cuya incidencia ha aumentado de manera progresiva en la población (Videla *et al.*, 2006). Tal situación se ve reflejada en la alta prevalencia de EHGNA en estas personas: de un 30 a un 100% en obesos, 10-75% en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y 20-92% en aquéllos con hiperlipidemia (Bellentani *et al.*, 2010). Esa así como la esteatosis se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico (Angulo & Lindor, 2002; Rector *et al.*, 2008).

La EHGNA involucra un conjunto de patologías que se desarrollan en etapas secuenciales a medida que progresa la enfermedad. La esteatosis hepática representa el primer estadio, considerándose *per se* una condición reversible, asintomática y con pocas complicaciones clínicas asociadas, siendo sin embargo una condición obligada para el desarrollo y progresión de EHGNA (Buqué *et al.*, 2008). Se caracteriza principalmente por la acumulación de TAG en el citoplasma del hepatocito en forma de vesículas lipídicas del tipo microvesicular o macrovesicular (esta última siendo la más común en individuos con EHGNA, donde una gran vacuola lipídica desplaza al núcleo a

la periferia de la célula), sin causar inflamación hepática ni muerte celular. Entre un 12 a un 20% de los pacientes con esteatosis simple desarrollan esteatohepatitis, complicación necroinflamatoria de una esteatosis crónica caracterizada histológicamente por la presencia de vesículas lipídicas del tipo macrovesicular, junto con focos inflamatorios muy ricos en neutrófilos y otros leucocitos polimorfonucleares, además del aumento del daño y muerte celular. Una esteatohepatitis sostenida puede derivar en fibrosis como consecuencia de la pérdida de parénquima hepático, el cual suele ser reemplazado por tejido conectivo con la consecuente pérdida de funcionalidad del hígado. En las etapas finales de la EHGNA la fibrosis puede degenerar en cirrosis no alcohólica, representando esta última una fase irreversible de la enfermedad (Caldwell *et al.*, 1999; Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003; Buqué *et al.*, 2008). Muchos pacientes presentan un curso bastante benigno, de manera que se mantienen en un estado de esteatosis hepática simple, pero aquéllos que desarrollan cirrosis se enfrentan a un alto riesgo de morir por cáncer hepatocelular o fallo hepático (Day, 2006).

Los mecanismos responsables de la acumulación y mantención de una cantidad excesiva de lípidos en el hígado aún no se encuentran bien establecidos, pero implican un desbalance entre la captación y/o producción hepática de ácidos grasos y la “remoción” de TAG hepáticos (Fabbrini *et al.*, 2008). En condiciones fisiológicas son varias las fuentes potenciales de ácidos grasos presentes a nivel hepático: (i) ácidos grasos libres derivados de la hidrólisis de los TAG almacenados en el tejido adiposo, (ii) ácidos grasos provenientes de la dieta, absorbidos a nivel intestinal como parte estructural de los quilomicrones y transportados al hígado a través del sistema linfático, y (iii) síntesis de ácidos grasos a través de la lipogénesis *de novo* a nivel hepático (Anderson & Borlak, 2008). Una vez en el hígado, los ácidos grasos son esterificados para dar origen a los TAG, los cuales pueden a su vez ser almacenados en vesículas lipídicas en los hepatocitos, secretados al plasma sanguíneo como parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TAG), o hidrolizados para que los ácidos grasos libres sean catabolizados a través de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal. Cuando la captación hepática de ácidos grasos libres plasmáticos y la síntesis intrahepática de éstos

exceden la secreción de TAG y la oxidación de ácidos grasos hepáticos, se da lugar al desarrollo de esteatosis (Musso *et al.*, 2009; Ferré & Foufelle, 2010) (Figura 1).

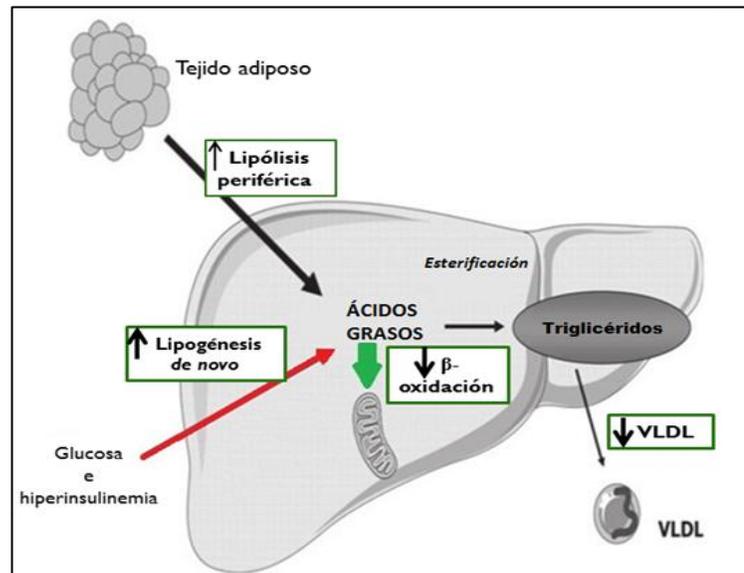


Figura 1: Vías metabólicas que contribuyen al desarrollo de esteatosis hepática (adaptado de Ferré & Foufelle, 2010).

1.2 Patogenia de la esteatosis hepática asociada a la EHGNA

La EHGNA tiene una etiología mayoritariamente nutricional, derivada principalmente de la malnutrición por un consumo excesivo tanto de hidratos de carbono digeribles como de lípidos, especialmente ácidos grasos saturados. De hecho, datos derivados de encuestas alimentarias indican una muy baja ingesta de pescado y una elevada ingesta de bebidas azucaradas y carnes rojas en estos pacientes al compararlos con el consumo alimentario de la población general (Zelber-Sagi *et al.*, 2007). El aporte dietario excesivo de hidratos de carbono y lípidos pueden determinar modificaciones significativas en el metabolismo intermediario hepático.

La fisiopatología de la esteatosis asociada a la EHGNA es compleja y multifactorial, siendo la obesidad un factor clave en su origen y desarrollo. Desde el punto de vista nutricional, la obesidad (como reflejo de un balance energético positivo) fomenta la acumulación hepática de lípidos por distintos mecanismos. Un aporte dietético excesivo

y permanente de ácidos grasos saturados e hidratos de carbono puede provocar una sobrecarga de ácidos grasos en el hígado, lo cual se asocia con tasas altas de β -oxidación a nivel mitocondrial e incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), explicándose así el aumento en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la disminución en el potencial antioxidante observados en el hígado de pacientes obesos con esteatosis (Videla *et al.*, 2004). Simultáneamente, la ingesta sostenida y excesiva de hidratos de carbono digeribles estimula directamente la lipogénesis, y el aporte permanente de glucosa al plasma eleva los niveles de insulina circulantes (Yamashita *et al.*, 2001; Hellemans *et al.*, 2007), lo que permite establecer una relación directa entre obesidad y resistencia a la insulina. Además, el estado de inflamación crónico del tejido adiposo obeso induce la producción de adipocitoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que llegan al hígado a través de la circulación sanguínea y afectarían negativamente la señalización normal del receptor de insulina en las células (Browning & Horton, 2004; Day, 2006). En estas condiciones, los pacientes obesos con EHGNA presentan dos alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo: (i) resistencia a la insulina y (ii) disminución hepática de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL ω -3) (Araya *et al.*, 2004).

1.2.1 Resistencia a la insulina: Existe una fuerte asociación entre resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, a pesar de que no se conozcan completamente los mecanismos fisiopatológicos que las relacionan. En condiciones normales la insulina impide la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo al inhibir la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL), enzima encargada de la hidrólisis de los TAG almacenados en los adipocitos. En este sentido, se ha demostrado que una disminución en la respuesta a la insulina activa a la HSL como consecuencia de la incapacidad de esta hormona para inhibir su acción, lo que induce la lipólisis de los TAG almacenados en los adipocitos e incrementa el flujo de ácidos grasos libres desde la periferia hacia el hígado, donde éstos son captados (Guilherme *et al.*, 2008). Los ácidos grasos libres en exceso pueden ser transportados fuera de los hepatocitos hacia tejidos extrahepáticos, pero sólo ocurre en una pequeña fracción por lo que el resto se acumula como TAG en el hígado en forma

de gotas de lípidos dentro de los hepatocitos (Bugianesi *et al.*, 2010). Por otro lado, elevados niveles de glucosa estimulan por retroalimentación β -pancreática un aumento compensatorio en la secreción de insulina (Sesti, 2002). Como consecuencia de esta hiperinsulinemia, hay un estímulo en la actividad de factores de transcripción de tipo lipogénicos tales como la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c (SREBP-1c) y el receptor activado por proliferadores peroxisomales-gamma (PPAR- γ), con lo cual aumenta la síntesis y/o captación de ácidos grasos y se redirecciona el destino de los ácidos grasos libres hacia la síntesis de TAG intrahepática (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003; Aronis *et al.*, 2005; Bradbury, 2006).

1.2.2 Disminución de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICL ω -3) en el hígado de pacientes con EHGNA: A nivel lipídico se ha observado en pacientes con EHGNA que el hígado presentaría una disminución significativa de los AGPICL ω -3 (Araya *et al.*, 2004), así como una deficiente capacidad para sintetizarlos (Araya *et al.*, 2009). La disminución en los niveles de AGPICL ω -3 puede ser causada por varios mecanismos; entre ellos, un aumento en la tasa de lipoperoxidación de estos ácidos grasos en el hígado como consecuencia de la elevada generación de ERO y la alta susceptibilidad de los AGPICL ω -3 a las ERO (Narasimhan *et al.*, 2010). Además, la desaturación y elongación del ácido α -linolénico, precursor de los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3), se encuentra significativamente disminuida, lo cual es un reflejo de cómo el estrés oxidativo en la EHGNA altera la actividad de las enzimas que participan en este proceso (Araya *et al.*, 2009). Por último, el desequilibrio dietario en pacientes obesos también pueden desempeñar un papel importante, considerando: (i) que éstos presentan un consumo deficitario de ácidos grasos ω -3 junto con un excesivo aporte dietario de ácidos grasos ω -6 y (ii) existe un elevado consumo de ácidos grasos *trans*, lo que provoca la inhibición sustancial en la actividad hepática de la Δ -6 desaturasa, una de las enzimas responsables de la generación de AGPICL ω -3 (Dorfman *et al.*, 2009; Obara *et al.*, 2010).

Lo anterior tiene una importancia fundamental en el desarrollo de esteatosis, ya que los AGPICL ω -3 son biomoléculas de señalización que regulan el metabolismo lipídico hepático a través de: (i) la inhibición de la expresión y actividad de SREBP-1c, vinculado a la expresión de genes lipogénicos y glicolíticos, y (ii) la activación del receptor activado por proliferadores peroxisomales-alfa (PPAR- α), factor de transcripción relacionado con la expresión de genes que codifican las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (Lelliott *et al.*, 2007; Pettinelli *et al.*, 2009). Por lo tanto, la disminución de los AGPICL ω -3 a nivel hepático podría favorecer la biosíntesis de ácidos grasos libres y TAG junto con una menor oxidación de ácidos grasos y, por ende, una promoción de la esteatosis hepática. En resumen, un aumento tanto en la lipogénesis *de novo* hepática como en la movilización periférica de ácidos grasos libres al hígado tienen un papel clave en la aparición de la esteatosis hepática por sobrealimentación (Alkhoury *et al.*, 2009). Los aspectos fundamentales en el desarrollo de esteatosis hepática se esquematizan en la figura 2.

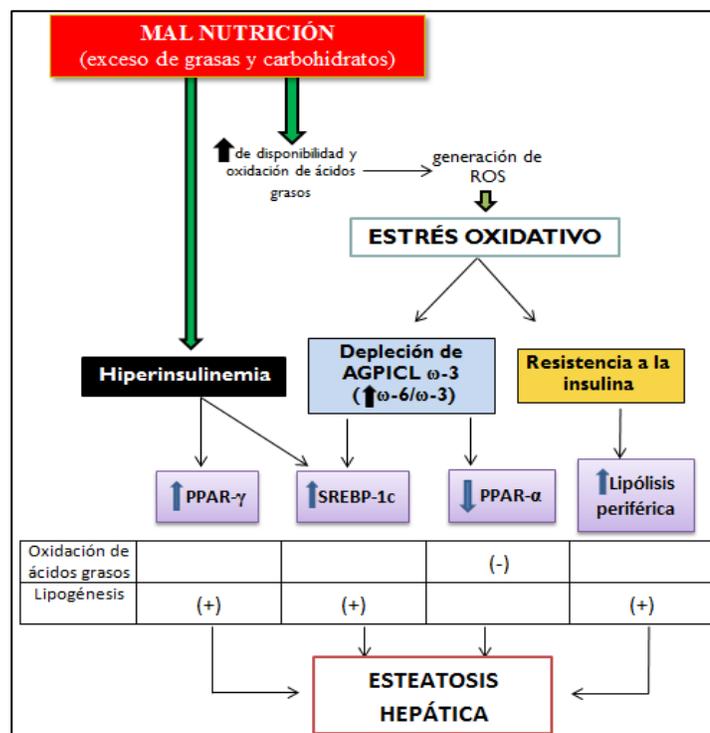


Figura 2: Malnutrición por exceso y su relación con el estrés oxidativo, resistencia a la insulina y disminución de AGPICL ω -3 en el desarrollo de la esteatosis hepática (adaptado de Valenzuela & Videla, 2011).

1.3 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

1.3.1 Generalidades: Los ácidos grasos insaturados constituyen una amplia familia de biomoléculas lipídicas cuya estructura básica consta de una cadena hidrocarbonada lineal (-CH₂-CH₂-CH₂-) que contiene al menos un doble enlace, delimitada por un extremo metilo (-CH₃) y otro extremo carboxilo (-COOH). Si la molécula contiene sólo un doble enlace se denomina ácido graso monoinsaturado (AGMI), mientras que si presenta dos o más dobles enlaces corresponde a un ácido graso poliinsaturado (AGPI) (González-Pérez, 2009). Dentro de los AGPI se encuentran dos grupos principales: (i) ácidos grasos omega-3 (ω -3), derivados del ácido α -linolénico (ALN, 18:3 ω -3) y (ii) ácidos grasos omega-6 (ω -6), derivados del ácido linoleico (AL, 18:2 ω -6). AL y ALN se definen como ácidos grasos esenciales, debido a que los vertebrados carecen de las enzimas Δ 12- y Δ 15-desaturasas necesarias para su síntesis, por lo que es necesario obtenerlos a partir del consumo de alimentos (Burr & Burr, 1930; Das, 2006a).

El AL y el ALN son los precursores de todos los demás AGPI ω -6 y ω -3 existentes. Tras ser adquiridos a través de la dieta, AL y ALN se metabolizan en el hígado mediante vías enzimáticas de desaturación y elongación que dan origen a los AGPI, compuestos de 20 o más carbonos con un número mayor de dobles enlaces pero que conservan la estructura básica de insaturación de su respectivo precursor (Gibson & Makrides, 1998; Cho *et al.*, 1999). La enzima Δ 6-desaturasa convierte el AL en ácido γ -linolénico, que es elongado a ácido dihomo- γ -linolénico, el cual a su vez es el sustrato de la enzima Δ 5-desaturasa para dar origen al ácido araquidónico (AA, 20:4 ω -6). El mismo sistema de enzimas es capaz también de metabolizar el ALN, lo que da lugar a toda la familia de ácidos grasos omega-3, siendo los de mayor relevancia biológica el EPA y DHA (Figura 3). Cabe señalar que AL y ALN, al utilizar el mismo sistema enzimático para formar sus respectivos AGPI, compiten constantemente por la misma vía de desaturación y elongación (Das, 2006a).

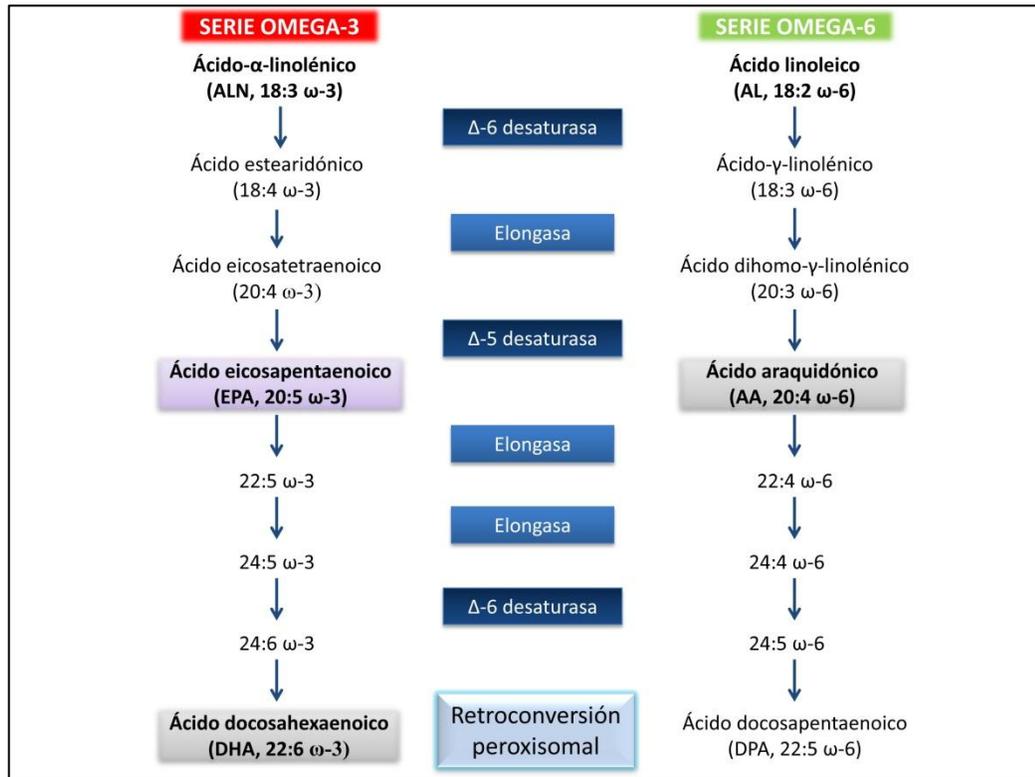


Figura 3. Metabolización de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 y ω -3. Vías de desaturación y elongación de los ácidos linoleico y α -linolénico.

Las fuentes alimentarias de AL y ALN son los alimentos de origen vegetal, especialmente los frutos secos y aceites de soya, linaza, canola, chía y rosa mosqueta (Valenzuela *et al.*, 2012). En cambio, la fuente nutricional de los AGPICL son los alimentos de origen animal: el AA se encuentra principalmente en las carnes de vacuno, cordero y cerdo, mientras que el EPA y el DHA están presentes tanto en animales como vegetales de origen marino, particularmente en pescados con un elevado contenido de grasa, como el atún, jurel y salmón (Simopoulos, 2010).

1.3.2 AGPICL ω -3 y efectos positivos para la salud: Los AGPICL ω -3, en especial EPA y DHA, representan un papel fundamental en nutrición y en el cuidado de la salud en general. Han sido asociados a roles claves en varias funciones fisiológicas, lo que sugiere que su administración puede prevenir muchas enfermedades crónicas no

transmisibles (Simopoulos, 2008). Estudios previos han demostrado que la administración directa de AGPICL ω -3 o dietas que contienen aceite de pescado ejercen efectos protectores a nivel (i) cardíaco, al disminuir el daño por isquemia/reperfusión *in vivo* (Yang *et al.*, 1993; McGuinness *et al.*, 2006), (ii) renal, al mejorar la hemodinámica y presión sanguínea en casos de trasplante (van der Heide *et al.*, 1993), (iii) cerebral, al desarrollar resistencia neuronal frente a episodios de isquemia o epilepsia (Blondeau *et al.*, 2001), y (iv) hepático. En este último caso, la hepatoprotección ejercida por los ácidos grasos ω -3 fue demostrada en el modelo de isquemia/reperfusión en ratas (Zhong & Thurman, 1995; Zúñiga *et al.*, 2010; Mardones *et al.*, 2011), en el daño al DNA y membranas inducido por H₂O₂ *in vitro*, en el daño hepático inducido por CCl₄ en ratones (González-Pérez *et al.*, 2006), y en la hepatitis aguda inducida por la administración de D-galactosamina/LPS en ratones (Schmocker *et al.*, 2007).

La composición de las membranas celulares está fuertemente influenciada por el tipo de ácidos grasos consumidos en la dieta. La ingesta de AGPICL ω -3 provenientes del pescado o aceite de pescado en humanos genera un reemplazo parcial de los AGPICL ω -6 en la membrana de las células, especialmente del AA, en las plaquetas, eritrocitos, neutrófilos, monocitos y células hepáticas, lo que aumenta la fluidez de la membrana y mejora la señalización de los receptores que se encuentran unidos a ésta (Das, 2006b). Además son el sustrato para la formación de una serie de derivados lipídicos llamados resolvinas y docosatrienos, de potentes efectos antiinflamatorios (Serhan *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2011). A nivel del metabolismo lipídico se ha demostrado que los AGPICL ω -3 son capaces de estimular la lipólisis e inhibir la lipogénesis *de novo* en hígado de ratón (Sun *et al.*, 2011). Esto se debe a que los AGPICL ω -3 pueden suprimir la transcripción de genes lipogénicos al disminuir la unión al DNA de SREBP-1c, a la vez que activan el catabolismo de los lípidos al estimular a PPAR- α , lo que gatilla la transcripción de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (Clarke, 2004).

Se ha demostrado también que el DHA es un potente ligando de PPAR- γ (González-Pérez *et al.*, 2006), por lo que los AGPICL ω -3 podrían tener efectos importantes en la

disminución de la captación e ingreso de ácidos grasos libres hacia el hígado contribuyendo así a la atenuación del estado lipogénico de este órgano. Además, estudios recientes sugieren que los efectos antiesteatóticos de EPA y DHA en el hígado incluyen la disminución en el almacenamiento de los ácidos grasos como TAG y el aumento en su β -oxidación, junto con el redireccionamiento del metabolismo de la glucosa hacia la síntesis de glucógeno (Capanni *et al.*, 2006). A nivel hepático han surgido evidencias experimentales de que los AGPICL ω -3 aumentarían el potencial antioxidante vía incrementos en las actividades de la catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa, conjuntamente con mayores niveles de glutatión y menor tasa lipoperoxidativa, al administrar 1 g EPA/kg por 10 días consecutivos (Demoz *et al.*, 1992; Zúñiga *et al.*, 2010).

1.3.3 Relación de los ácidos grasos ω -6/ ω -3 e implicancias en la salud: Los AGPICL ω -6 y ω -3 presentan frecuentemente funciones fisiológicas opuestas, por lo que el balance de éstos es importante para un estado fisiológico saludable y desarrollo normal. Se ha observado que desbalances en la relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3 han sido relacionados con el inicio y la progresión de varias enfermedades crónicas, incluyendo enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis (Harris, 2003), obesidad (Wang *et al.*, 2002), diabetes (Kelley *et al.*, 2002), cáncer (Cho *et al.*, 2003) y alteraciones del comportamiento (Fedorova & Salem, 2006), entre otras. En estudios con ratones *ob/ob* alimentados con una dieta con una relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3 de 4:1 y 9:1, éstos presentaron esteatosis hepática. Posteriormente, al ser suplementados con AGPICL ω -3 los ratones disminuyeron la relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3, con una consecuente disminución en el grado de esteatosis hepática (Wang *et al.*, 2002). En el hígado, la relación ω -6/ ω -3 constituiría un sensor que determinaría el tipo de metabolismo lipídico predominante, y la disminución en esta relación canalizaría a los ácidos grasos saturados desde su almacenamiento hacia su oxidación, reduciéndose así el riesgo de desarrollo de la esteatosis y resistencia a la insulina (Lombardo & Chicco, 2006).

2. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, se plantea la siguiente hipótesis:

“Una dieta alta en grasa en ratón induce disminución de AGPICL ω -3 y un aumento en la relación de AGPICL ω -6/ ω -3 a nivel hepático, junto con el desarrollo de resistencia a la insulina y esteatosis hepática. Tales alteraciones no se observan al suplementar esta dieta con los AGPICL ω -3 eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA)”.

3. OBJETIVOS GENERALES

- Demostrar que una dieta alta en grasa en ratón produce disminución de los AGPICL ω -3 y un aumento de la relación de AGPICL ω -6/ ω -3 a nivel hepático, junto con el desarrollo de resistencia a la insulina y esteatosis hepática.
- Evaluar el efecto de la suplementación con EPA y DHA en ratones que reciben una dieta alta en grasa, sobre las alteraciones metabólicas señaladas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratones alimentados durante 8 y 12 semanas con una dieta alta en grasa, con y sin administración de EPA y DHA:

1. Determinar resistencia a la insulina, lo que incluye mediciones de insulinemia, glicemia y cálculo de HOMA-IR.
2. Determinar parámetros de inflamación midiendo niveles plasmáticos de TNF- α .
3. Determinar esteatosis hepática, a través de histología hepática.
4. Evaluar el impacto de los diferentes tratamientos sobre el perfil de ácidos grasos hepáticos totales, considerando los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales de experimentación

Se asignaron de forma aleatoria a cada grupo experimental ratones machos *Mus musculus* cepa C57BL/6J (Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con un peso inicial de 12-14 g, los que recibieron agua *ad libitum* y se mantuvieron bajo temperatura ambiental controlada y ciclos luz/oscuridad de 12 horas. Los protocolos de tratamiento de animales experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Autorización Bioética: CBA 0386, FMUCH). Se anexa carta de aprobación en esta memoria.

5.2 Diseño experimental

El modelo consideró cuatro grupos experimentales, separados según la dieta y suplementación dietaria con ácidos grasos ω -3 a utilizar.

- a) **Grupo A:** Dieta control.
- b) **Grupo B:** Dieta control más suplementación con EPA y DHA.
- c) **Grupo C:** Dieta alta en grasa.
- d) **Grupo D:** Dieta alta en grasa más suplementación dietaria con EPA y DHA.

Los grupos A y B se alimentaron con una dieta normal certificada (Research Diet INC. Rodent Diet whit 10% Kcal% fat. Product data D12492. USA), que contiene un 10% de las calorías totales como grasa, 70% como carbohidratos y 20% como proteínas, y aporta todos los requerimientos nutricionales que necesita el ratón (Tabla 1).

Dieta Control		
	% g totales	% kcal totales
Proteínas	19,2	20
Carbohidratos	67,3	70
Grasas	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
Mineral Mix S10026	10	0
Fosfato Dicálcico	13	0
Carbonato de Calcio	5,5	0
Citrato de Potasio	16,5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Bitartrato de Colina	2	0
Tartracina	0,05	0
TOTAL	1055,05	4057

Tabla 1. Composición nutricional y aporte calórico de la dieta control experimental.

Para los grupos C y D se utilizó una dieta alta en grasa certificada (Research Diet INC. Rodent Diet whit 60% Kcal% fat. Product data D12492. USA), la cual aporta el 60% de las calorías como grasa, 20% como carbohidratos y 20% como proteínas, además de contener cantidad suficiente de todos los demás nutrientes (Tabla 2).

Dieta alta en grasa		
	% g totales	% kcal totales
Proteínas	26,2	20
Carbohidratos	26,3	20
Grasas	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
Mineral Mix S10026	10	0
Fosfato Dicálcico	13	0
Carbonato de Calcio	5,5	0
Citrato de Potasio	16,5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Bitartrato de Colina	2	0
Colorante Azul	0,05	0
TOTAL	773,85	4057

Tabla 2. Composición nutricional y aporte calórico de la dieta alta en grasa experimental.

Los grupos suplementados con AGPICL ω -3 recibieron dosis orales diarias de 200 miligramos de EPA+DHA por kilogramo de peso (108 mg/kg de EPA más 92 mg/kg de DHA) (Acolest TG, Procaps, Colombia).

Con el objetivo de determinar experimentalmente el rango de tiempo en el cual se manifiestan la esteatosis hepática y sus alteraciones fisiopatológicas asociadas, las dietas y suplementación se administraron durante dos periodos de tiempo: 8 y 12 semanas. Al

término del tratamiento, los animales fueron ayunados por 6 a 8 horas y anestesiados con ketamina y xilacina en una dosis de 150 y 10 mg/kg, respectivamente. Posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, a partir de la cual se separó el plasma sanguíneo mediante centrifugación a 600 x g durante 10 minutos, para luego ser utilizadas en las respectivas determinaciones. A su vez, los hígados fueron pesados, se les extrajo una muestra de tejido hepático para su análisis histológico y el resto del tejido fue congelado en nitrógeno líquido para fijar las muestras, las que posteriormente se almacenaron a -80°C. El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando el software nQuery Advisor, y el análisis estadístico, considerando el modelo experimental y tipo de intervención (prueba de ANOVA de muestra repetida), indicó un tamaño muestral de 9 animales por grupo, en un número total de 36 animales para el total de grupos experimentales (Figura 4).

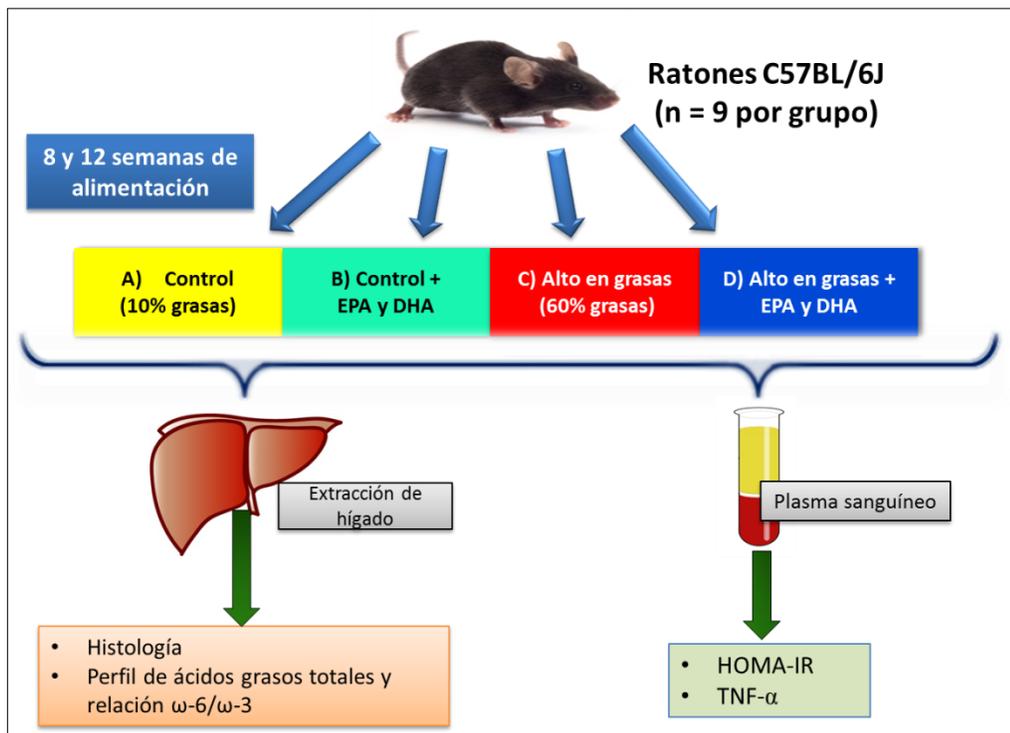


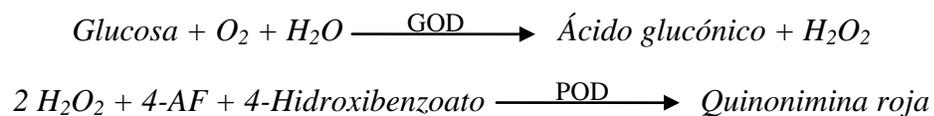
Figura 4. Representación esquemática del diseño experimental utilizado.

5.3 Evaluación de la histología hepática

Se utilizó microscopía óptica para analizar cortes de hígado previamente fijados en formaldehído (10%), incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina. Esta técnica fue realizada por un Tecnólogo Médico de la mención de Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, mientras que el resultado fue informado por un Médico Patólogo, quien realizó un análisis ciego de los cortes histológicos y los clasificó de acuerdo a la presencia de inflamación, hemorragia, fibrosis, necrosis y arquitectura del tejido. En función del grado de esteatosis e inflamación de las muestras, éstas se clasificaron como ausentes, leves, moderadas o severas (Piro *et al.*, 2008).

5.4 Determinación de resistencia a la insulina mediante el índice HOMA-IR

La glicemia se cuantificó mediante un kit comercial (Wiener Lab., Rosario, Argentina), cuyo método se fundamenta en la medición indirecta de los niveles de glucosa a través de la formación de peróxido de hidrógeno, en una reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno se acopla a su vez a una segunda reacción catalizada por la enzima peroxidasa (POD) para dar origen a la quinonimina roja, compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 505 nm:



A su vez, la determinación de insulinemia se realizó a través de un inmunoensayo tipo ELISA ultrasensible (Mercodia, Uppsala, Suiza). Específicamente, dicho kit corresponde a un ELISA “sándwich” del tipo directo, en el cual dos anticuerpos monoclonales se unen a diferentes determinantes antigénicos de la molécula de insulina. Uno de ellos es un anticuerpo anti-insulina adosado a la superficie de la placa de ELISA, mientras el segundo anticuerpo anti-insulina se encuentra conjugado a la enzima peroxidasa. Después de remover mediante lavado el anticuerpo conjugado no unido a insulina, se detecta el anticuerpo conjugado unido a la molécula mediante una reacción

con TMB. Esta reacción se detiene al añadir H₂SO₄ 0,5 M al medio de reacción, luego de lo cual se procede a determinar la absorbancia de las muestras a 450 nm de longitud de onda.

Obtenidos estos valores, la resistencia a la insulina se evaluó a través del índice HOMA-IR (Matthews *et al.*, 1985), mediante la siguiente expresión:

$$HOMA-IR = \frac{Insulinemia \times Glicemia}{405}$$

donde la insulinemia se expresa en microunidades por mililitro (μUI/ml) y la glicemia, en miligramos por decilitro (mg/dl). Se consideró resistencia a la insulina con 2 desviaciones estándar sobre el valor de HOMA-IR del grupo control.

5.5 Niveles plasmáticos de TNF-α

Los niveles plasmáticos de TNF-α se determinaron mediante ELISA utilizando kits específicos (Ultrasensitive Cytoscreen KRC 3013 kit, Biosource International, Camarillo, Ca, USA) acorde a las instrucciones del catálogo. Los resultados se expresaron como picogramos de TNF-α por mililitro de plasma (pg/ml).

5.6 Determinación del perfil de ácidos grasos hepáticos totales y relación ω-6/ω-3

5.6.1 Extracción de materia grasa

El contenido de lípidos totales presentes en hígado se obtuvo cualitativamente mediante la técnica de Bligh y Dyer modificada (Bligh & Dyer, 1959). Brevemente, se homogeneizaron 500 mg de tejido hepático en frío, luego de lo cual se adicionaron cloroformo y metanol en una relación 2:1 v/v, junto con BHT como antioxidante. Con el fin de otorgar mayor fuerza iónica a la solución y obtener así una mejor separación de las fases orgánica y acuosa, se adicionó MgCl₂ 0,5 N, centrifugándose las muestras a

1500 x g por 5 min, después de lo cual se recuperó la fase orgánica (cloroformo), que es la fase en la cual se encuentran solubilizados los lípidos. Este ciclo se repitió 3 veces. Finalmente, las muestras fueron concentradas mediante evaporación del cloroformo con nitrógeno gaseoso y refrigeradas a -20°C.

5.6.2 Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos

Los ácidos grasos obtenidos del tejido hepático se transformaron a ésteres metílicos de ácidos grasos (Firestone, 1997) a través de incubación a 95°C con BF₃ al 12% en metanol y NaOH en metanol. Posteriormente se agregó NaOH saturado, luego de lo cual se adicionó hexano para solubilizar los ésteres metílicos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización para análisis por cromatografía de gases.

5.6.3 Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos

Se realizó un análisis del perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados y poliinsaturados presentes en las muestras, así como la relación entre ácidos grasos ω -6 y ω -3, mediante cromatografía de gas-líquida acoplada a ionización en llama como método de detección. El equipo utilizado fue un Hewlett-Packard, modelo 6890A, acoplado a una columna capilar (Agilent HP-88, 0,25 mm x 60 m, 0,2 μ m), utilizándose hidrógeno como fase móvil. La temperatura se programó desde 160 a 220°C con una rampa de temperatura de 3°C/min, alcanzándose un tiempo final de 30 min por muestra inyectada. La temperatura del detector y el inyector fue de 250°C. Los ácidos grasos de la muestra se identificaron a través de la comparación de sus tiempos de retención con aquéllos de los estándares individuales de ácidos grasos inyectados previamente (Nu-Check Prep., Elysian, MN, USA), mediante integración computarizada [ChemStation Rev A.10.01 (1635), Agilent Technologies, 2003]. El estándar interno utilizado fue el C23:0. Los resultados se expresaron como gramos de ácido graso/100 g EMAG. En el segmento 9 de esta memoria se incluye un modelo de cromatograma obtenido a través de cromatografía de gas-líquida.

5.7 Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (SEM) de 9 animales por cada grupo de experimentación. La significancia estadística de los cambios entre los grupos se determinó por ANOVA unifactorial junto con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$. Para todas las determinaciones estadísticas se utilizó el software GraphPad Prisma versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU).

6. RESULTADOS

6.1 Incremento en el peso corporal de los ratones

6.1.1 Tratamiento durante 8 semanas

En la **Figura 5** se muestra el incremento del peso corporal a lo largo de las 8 semanas de tratamiento junto con el peso corporal al inicio y final del periodo de experimentación, cuyos valores se indican además en la **Tabla 3**. No se observaron diferencias significativas en la pendiente del incremento de peso corporal, como tampoco hubo diferencias ($p < 0,05$) en el peso corporal final en ninguno de los grupos experimentales.

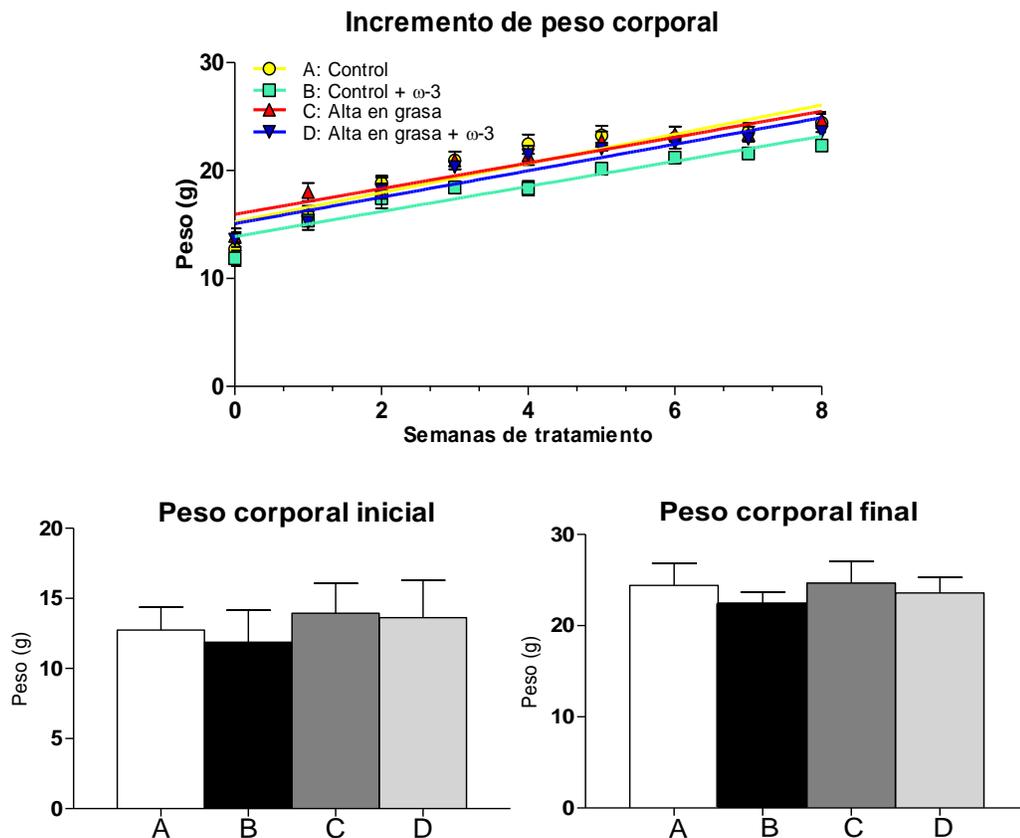


Figura 5. Incremento en el peso corporal de ratones con 8 semanas de tratamiento. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. ^a: significativamente diferente del grupo A; ^b: significativamente diferente del grupo B; ^c: significativamente diferente del grupo C; ^d: significativamente diferente del grupo D. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.1.2 Tratamiento durante 12 semanas

Las **Figura 6** y **Tabla 3** muestran que al término de las 12 semanas de tratamiento el peso corporal de los ratones alimentados con dieta alta en grasa fue significativamente mayor en relación a los grupos control (19,8%), control más EPA y DHA (36,3%) y alto en grasa más EPA y DHA (18,8%), a pesar de que no se observaron diferencias ($p < 0,05$) en las pendientes de incremento de peso corporal entre los distintos grupos experimentales. En el grupo alimentado con dieta alta en grasa y suplementado con EPA y DHA hubo una normalización del peso corporal final a valores del grupo control.

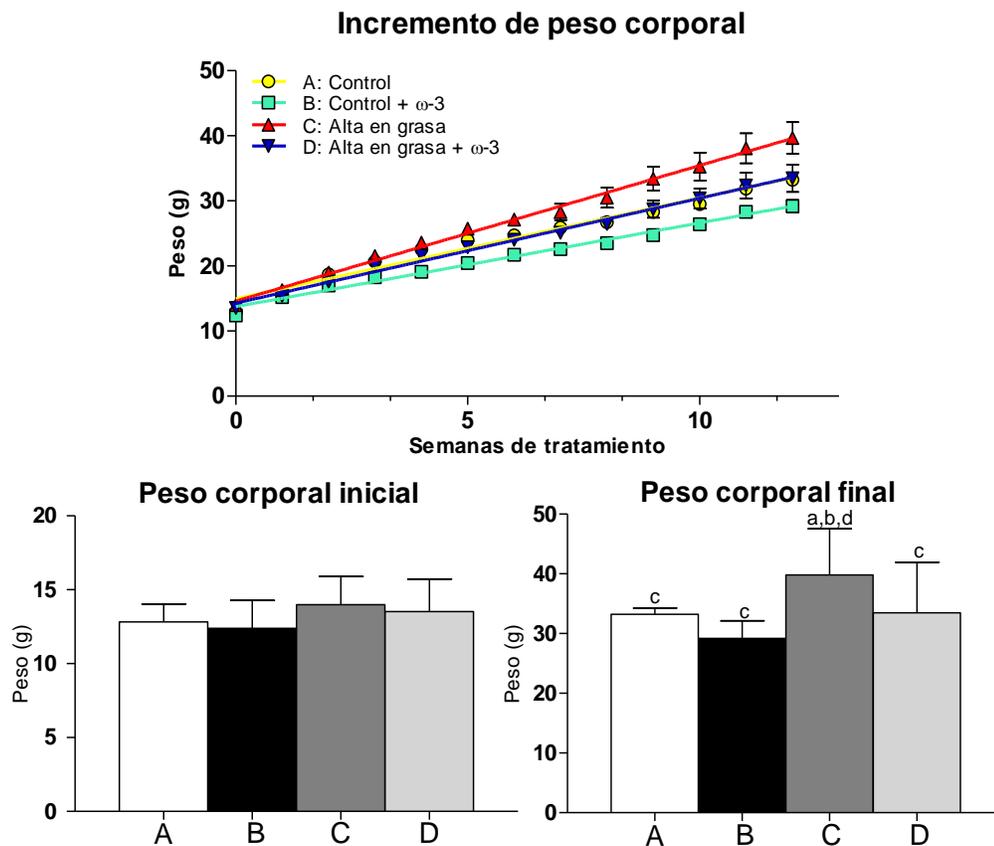


Figura 6. Incremento en el peso corporal de ratones con 12 semanas de tratamiento. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. ^a: significativamente diferente del grupo A; ^b: significativamente diferente del grupo B; ^c: significativamente diferente del grupo C; ^d: significativamente diferente del grupo D. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

Tabla 3. Peso corporal de los ratones al inicio y final de las 8 y 12 semanas de tratamiento. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

<i>8 semanas</i>	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
Peso corporal inicial (g)	12,7 \pm 0,6	11,9 \pm 0,7	14,0 \pm 0,7	13,6 \pm 0,7
Peso corporal final (g)	24,4 \pm 0,9	22,3 \pm 0,4	24,7 \pm 0,8	23,6 \pm 0,4
<i>12 semanas</i>	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
Peso corporal inicial (g)	12,8 \pm 0,3	12,4 \pm 0,5	14,0 \pm 0,5	13,5 \pm 0,4
Peso corporal final (g)	33,2 \pm 0,3 ^c	29,2 \pm 0,9 ^c	39,8 \pm 2,2 ^{a,b,d}	33,5 \pm 2,1 ^c

6.2 Evaluación de la esteatosis por histología hepática

6.2.1 Tratamiento durante 8 semanas

Como se puede apreciar en los cortes histológicos mostrados en la **Figura 7**, no se observaron signos de esteatosis hepática en ningún grupo experimental. Todas las muestras histológicas mostraron una microarquitectura normal, sin signos de inflamación, apoptosis y/o necrosis, reflejando una buena preservación del tejido hepático.

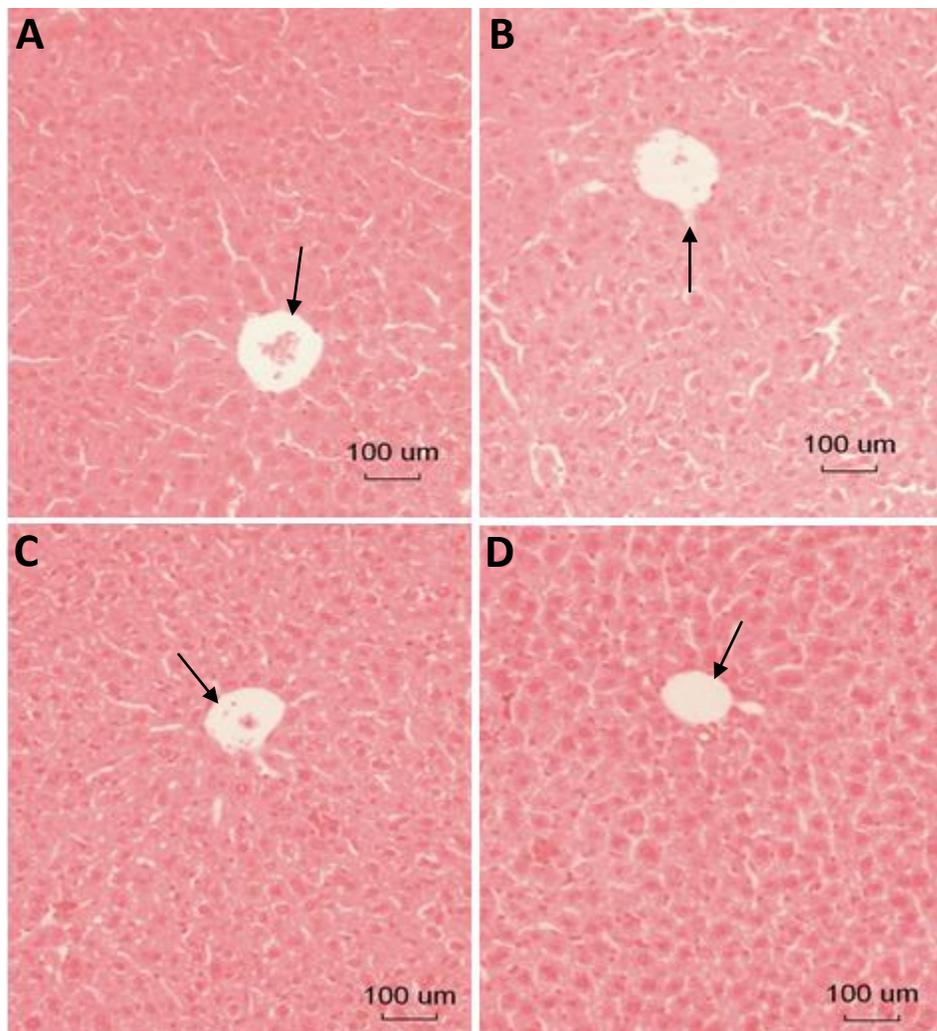


Figura 7. Histología hepática de ratones con 8 semanas de tratamiento. Secciones representativas de tejido hepático, fijados en formalina y teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas indican la posición de la vena central. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA (aumento: 10X).

6.2.2 Tratamiento durante 12 semanas

En las muestras histológicas de tejido hepático observadas en la **Figura 8**, los grupos A y B exhibieron una histología normal, mientras que el grupo C presentó esteatosis macro y microvesicular, distorsión en la arquitectura hepática e inflamación lobular y periportal moderada, junto con focos de necrosis. Se observó una prevención de la esteatosis hepática en el grupo alimentado con dieta alta en grasa y suplementado con EPA y DHA, con persistencia de sólo unos pequeños focos de esteatosis, ausencia de inflamación y una leve distorsión en la arquitectura hepática.

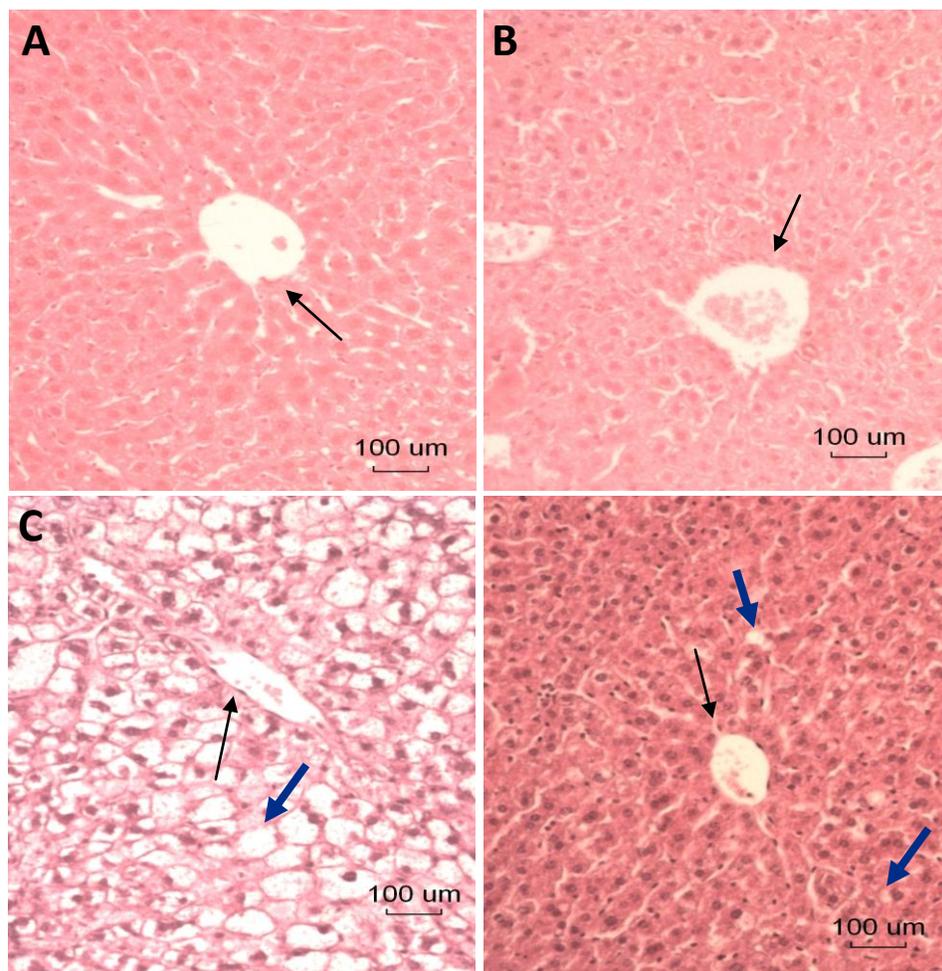


Figura 8. Histología hepática de ratones con 12 semanas de tratamiento. Secciones representativas de tejido hepático, fijados en formalina y teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas negras indican la posición de la vena central, mientras que las flechas azules (gruesas) señalan vesículas lipídicas al interior del hepatocito. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA (aumento: 10X).

6.3 Resistencia a la insulina

6.3.1 Niveles plasmáticos de insulina, glucosa y HOMA-IR en ratones con 8 semanas de tratamiento

La **Figura 9** muestra los resultados de las determinaciones de los niveles plasmáticos de insulina y glucosa en ayuno, además del índice HOMA-IR, para los distintos grupos experimentales. Como lo indica la **Tabla 4**, no se observaron diferencias significativas en los valores tanto de insulinemia como de glicemia para ninguno de los 4 grupos experimentales. Como consecuencia de ello, tampoco hubo diferencias ($p < 0,05$) en el valor de HOMA-IR entre los distintos grupos, lo cual es un indicativo de que los ratones no desarrollaron resistencia a la insulina.

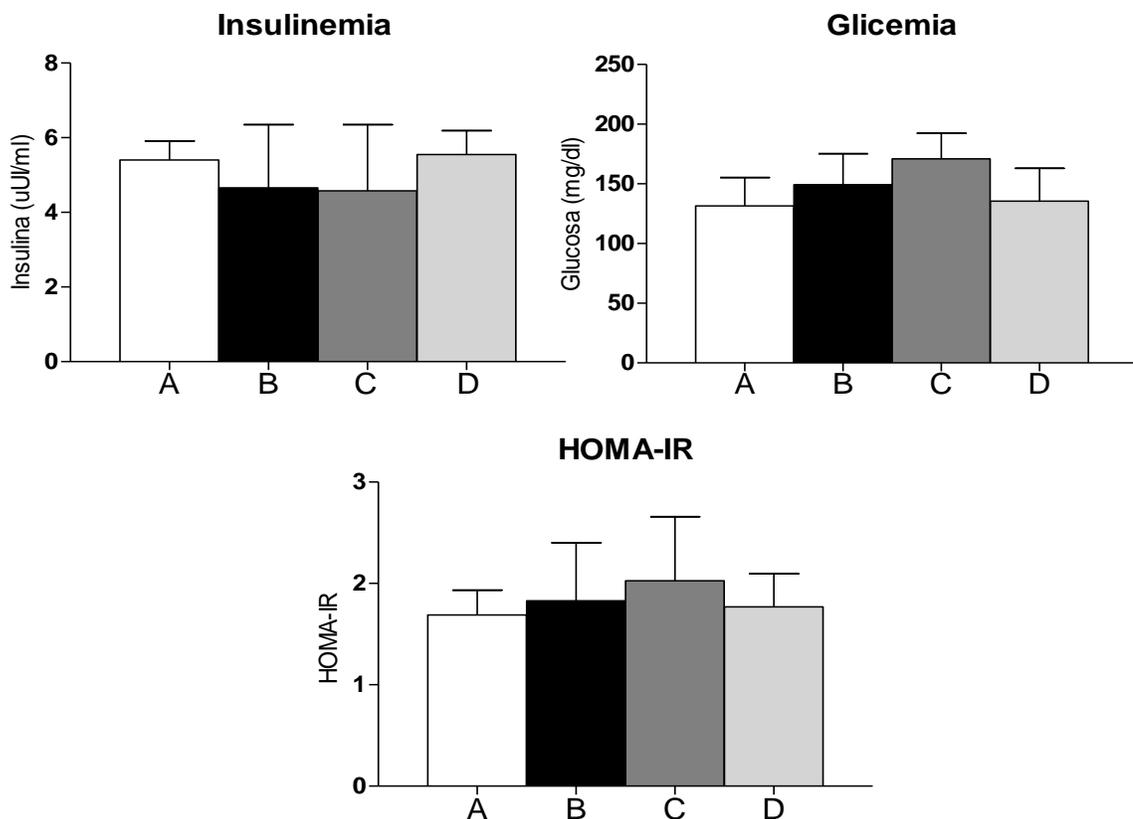


Figura 9. Resistencia a la insulina en ratones con 8 semanas de tratamiento. Niveles plasmáticos de insulina ($\mu\text{UI/ml}$) y glucosa (mg/dl), junto con determinación de HOMA-IR. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.3.2 Niveles plasmáticos de insulina, glucosa y HOMA-IR en ratones con 12 semanas de tratamiento

Como lo señalan la **Figura 10** y la **Tabla 4**, el grupo alto en grasa mostró un incremento ($p < 0,05$) en los niveles plasmáticos de glucosa e insulina de un 70% y 200% respectivamente, al comparar con el grupo control, con un consecuente aumento de 5.1 veces en el índice HOMA-IR. Los ratones alimentados con dieta alta en grasa y suplementados con EPA y DHA no desarrollaron resistencia a la insulina a pesar de que su índice HOMA-IR fuese más alto ($p < 0,05$) en relación con los grupos A y B, debido a que no hubo diferencias significativas en los valores de insulinemia y glicemia entre estos grupos.

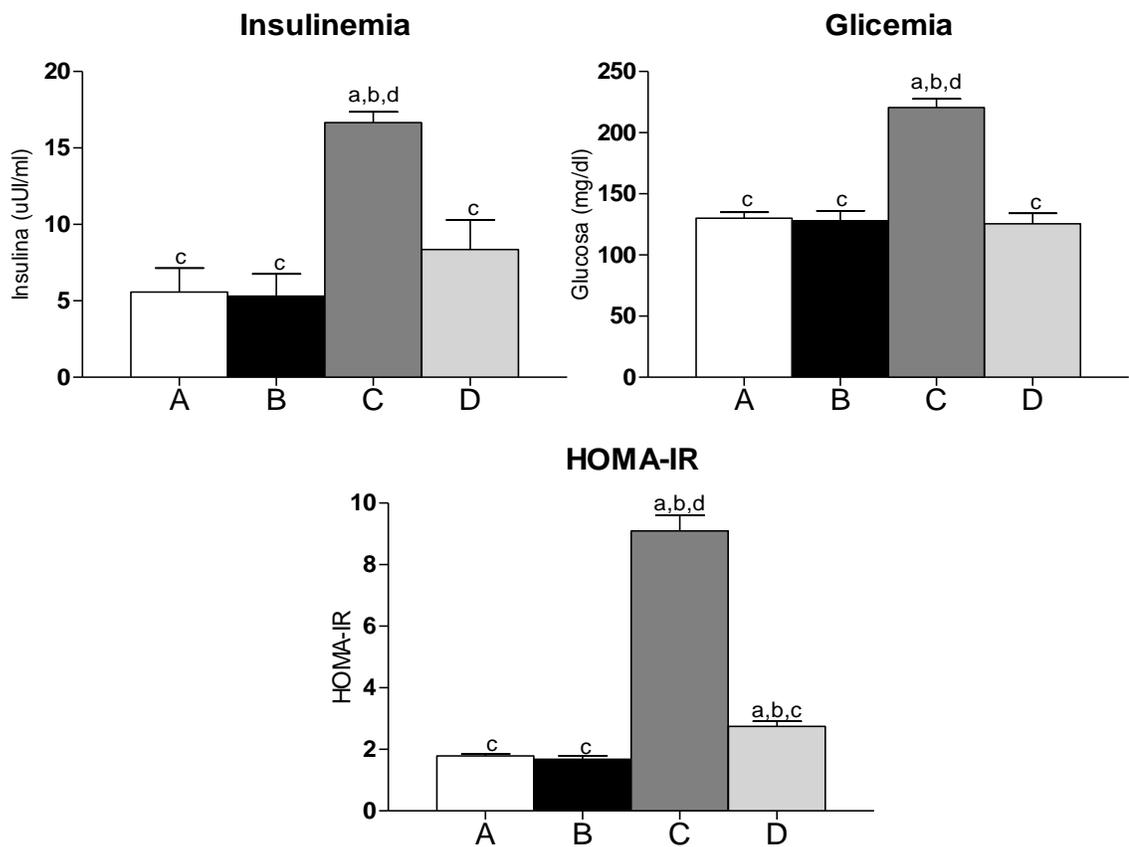


Figura 10. Resistencia a la insulina en ratones con 12 semanas de tratamiento. Niveles plasmáticos de insulina ($\mu\text{UI/ml}$) y glucosa (mg/dl), junto con determinación de HOMA-IR. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

Tabla 4. Resistencia a la insulina en ratones con 8 y 12 semanas de tratamiento. Niveles plasmáticos de insulina ($\mu\text{UI/ml}$), glucosa (mg/dl) y determinación de HOMA-IR. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

8 semanas	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
Insulinemia ($\mu\text{UI/ml}$)	$5,4 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,3$
Glicemia (mg/dl)	$131,6 \pm 10,6$	$149,4 \pm 11,6$	$170,9 \pm 7,2$	$135,6 \pm 11,2$
HOMA-IR	$1,7 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$
12 semanas	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
Insulinemia ($\mu\text{UI/ml}$)	$5,6 \pm 1,6^c$	$5,3 \pm 1,5^c$	$16,7 \pm 0,7^{a,b,d}$	$8,4 \pm 1,9^c$
Glicemia (mg/dl)	$130,1 \pm 4,8^c$	$128,1 \pm 8,0^c$	$220,6 \pm 7,1^{a,b,d}$	$125,6 \pm 8,5^c$
HOMA-IR	$1,8 \pm 0,07^c$	$1,7 \pm 0,1^c$	$9,1 \pm 0,5^{a,b,d}$	$2,8 \pm 0,2^{a,b,c}$

6.4 Inflamación sistémica: Niveles plasmáticos de TNF- α

Para evaluar el desarrollo de inflamación sistémica se midieron los niveles de TNF- α en plasma de ratones con 8 y 12 semanas de tratamiento, lo que se indica en la **Figura 11** y **Tabla 5**. En ellas se observa que, a las 8 semanas de tratamiento, no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles plasmáticos de TNF- α entre los distintos grupos experimentales. En cambio, a las 12 semanas se observó un aumento ($p < 0,05$) de un 16% en los niveles de TNF- α en ratones alimentados con dieta alta en grasa con respecto al grupo control; tal efecto fue suprimido por la suplementación con EPA y DHA en el grupo D.

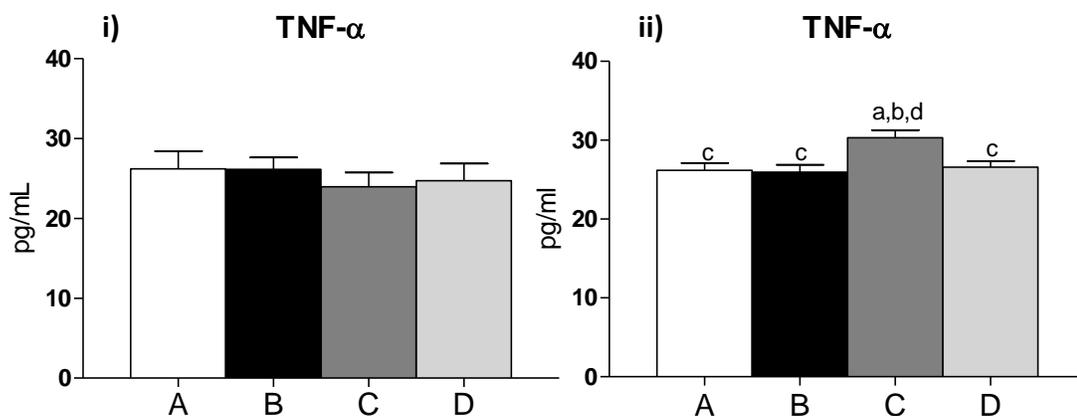


Figura 11. Niveles plasmáticos de TNF- α en ratones con i) 8 y ii) 12 semanas de tratamiento. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

Tabla 5. Niveles plasmáticos de TNF- α en ratones con 8 y 12 semanas de tratamiento. Los valores corresponden a promedios \pm SEM para 9 animales por grupo experimental. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

8 semanas	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
TNF- α (pg/ml)	26,2 \pm 2,2	26,1 \pm 1,5	24,0 \pm 1,8	24,7 \pm 2,1
12 semanas	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
TNF- α (pg/ml)	26,2 \pm 0,9 ^c	26,0 \pm 0,9 ^c	30,3 \pm 1,0 ^{a,b,d}	26,6 \pm 0,8 ^c

6.5 Cambios en el perfil hepático de ácidos grasos

6.5.1 Tratamiento durante 8 semanas

Con el objetivo de evaluar los cambios en la composición lipídica del tejido hepático producida por una dieta alta en grasa, así como el impacto de la suplementación con EPA y DHA sobre esta composición, se realizó mediante cromatografía de gases un análisis completo del perfil de ácidos grasos presentes en el hígado, cuyos valores se presentan en la **Tabla 6**.

6.5.1.1 Contenido hepático total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados

Como lo señala la **Figura 12**, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales al comparar los niveles hepáticos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

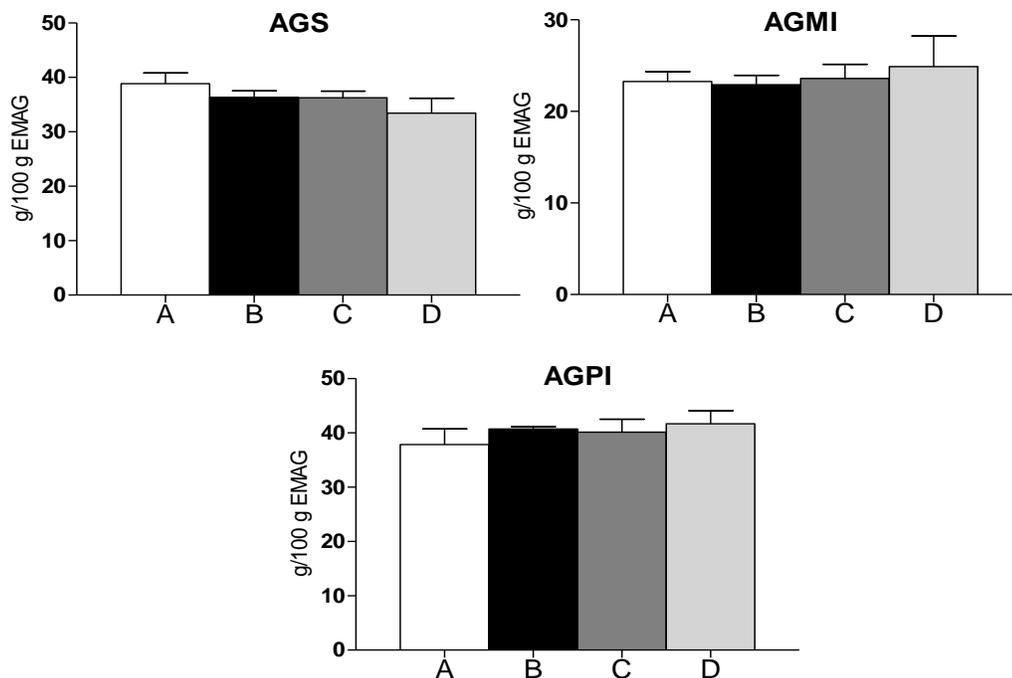


Figura 12. Contenido hepático total de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) en ratones con 8 semanas de tratamiento. Los valores representan el promedio \pm SEM del contenido de AGS, AGMI y AGPI (g) por cada 100g de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.5.1.2 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3

i) Niveles de AGPICL

La **Figura 13** muestra que no se observaron diferencias ($p < 0,05$) al comparar el contenido hepático de AGPICL entre los cuatro grupos de experimentación.

ii) Niveles de AGPI ω -6 y ω -3

En la **Figura 13** se observa que no hubo cambios significativos en los niveles hepáticos de AGPI ω -6 en los distintos grupos experimentales. Sin embargo, al analizar el contenido hepático de AGPI ω -3 hubo una disminución ($p < 0,05$) de un 21% en los ratones alimentados con dieta alta en grasa en comparación con los ratones control; además, los grupos B y D mostraron un aumento ($p < 0,05$) en los niveles de AGPI ω -3 de un 41% y 33%, respectivamente, con respecto al grupo control.

iii) Relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3

Como lo señala la **Figura 13**, en ratones alimentados con dieta control y suplementados con EPA y DHA se evidenció una disminución ($p < 0,05$) de un 33% en la relación ω -6/ ω -3 en comparación con ratones control, siendo significativamente más alta (47%) en los ratones alimentados con dieta alta en grasa. Por el contrario, se observó una disminución ($p < 0,05$) de un 23% en el valor de esta relación en los ratones alimentados con dieta alta en grasa y suplementados con EPA y DHA.

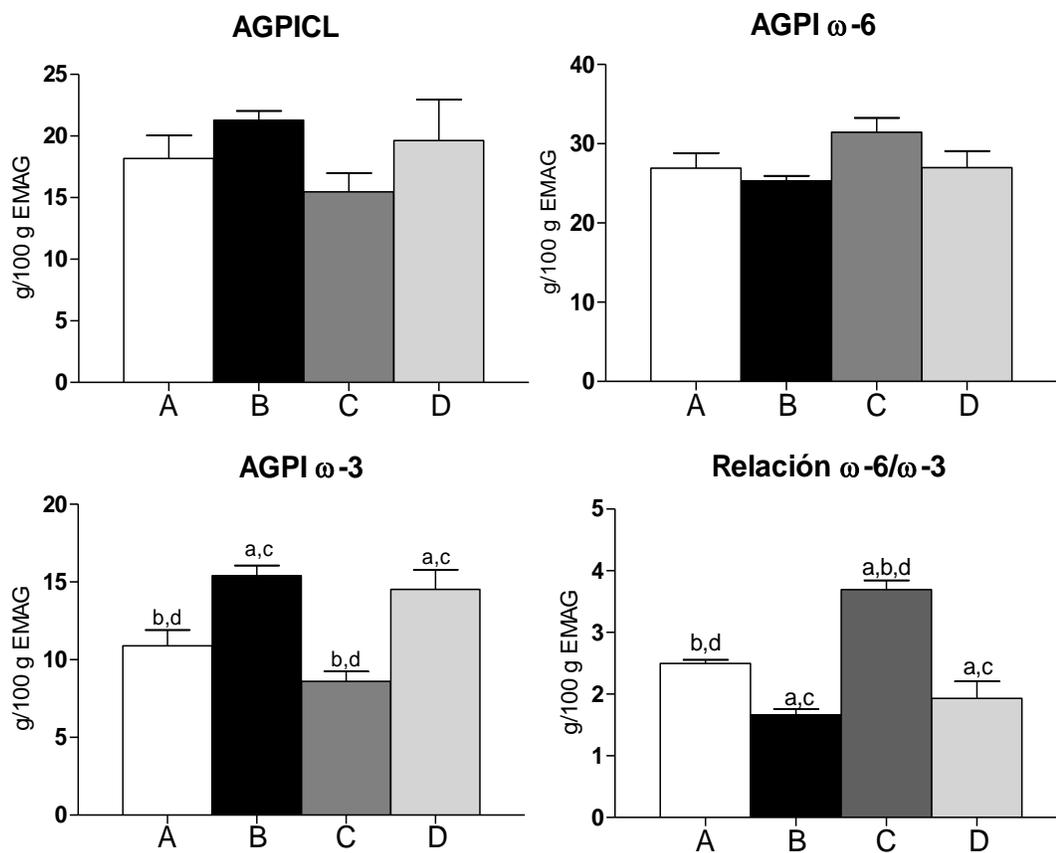


Figura 13. Contenido hepático de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (AGPI ω -6), ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI ω -3) y relación entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 (relación ω -6/ ω -3) en ratones con 8 semanas de tratamiento. Los valores representan el promedio \pm SEM del contenido de AGPICL, AGPI ω -6 y AGPI ω -3 (g) por cada 100g de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.5.1.3 Niveles hepáticos de EPA, DHA y EPA+DHA

i) Niveles de EPA

En la **Figura 14** se muestra que los ratones alimentados con dieta alta en grasa presentaron una disminución ($p < 0,05$) de un 84% en el contenido hepático de EPA al compararlos con el grupo control. Por el contrario, la suplementación con EPA y DHA en ratones alimentados con dieta control y alta en grasa provocó un aumento ($p < 0,05$) en el contenido de EPA de un 266% y 144%, respectivamente.

ii) Niveles de DHA

Como se indica en la **Figura 14**, el grupo alimentado con dieta alta en grasa presentó un 25% menos de DHA a nivel hepático cuando se compara al grupo control, pese a lo cual no resultó una disminución estadísticamente significativa. La suplementación con EPA y DHA aumentó significativamente el contenido hepático de DHA en ratones alimentados con dieta control (142%) pero no así en aquéllos que recibieron dieta alta en grasa.

iii) Niveles de EPA+DHA

La **Figura 14** indica que la suplementación con EPA y DHA en ratones alimentados con dieta control y alta en grasa derivó en un aumento ($p < 0,05$) en el contenido hepático de EPA+DHA de un 61% y 40%, respectivamente, comparado con ratones control. A su vez, los ratones alimentados con dieta alta en grasa presentaron una disminución de un 30% con respecto a los controles, aunque esta diferencia no alcanzó a ser significativa.

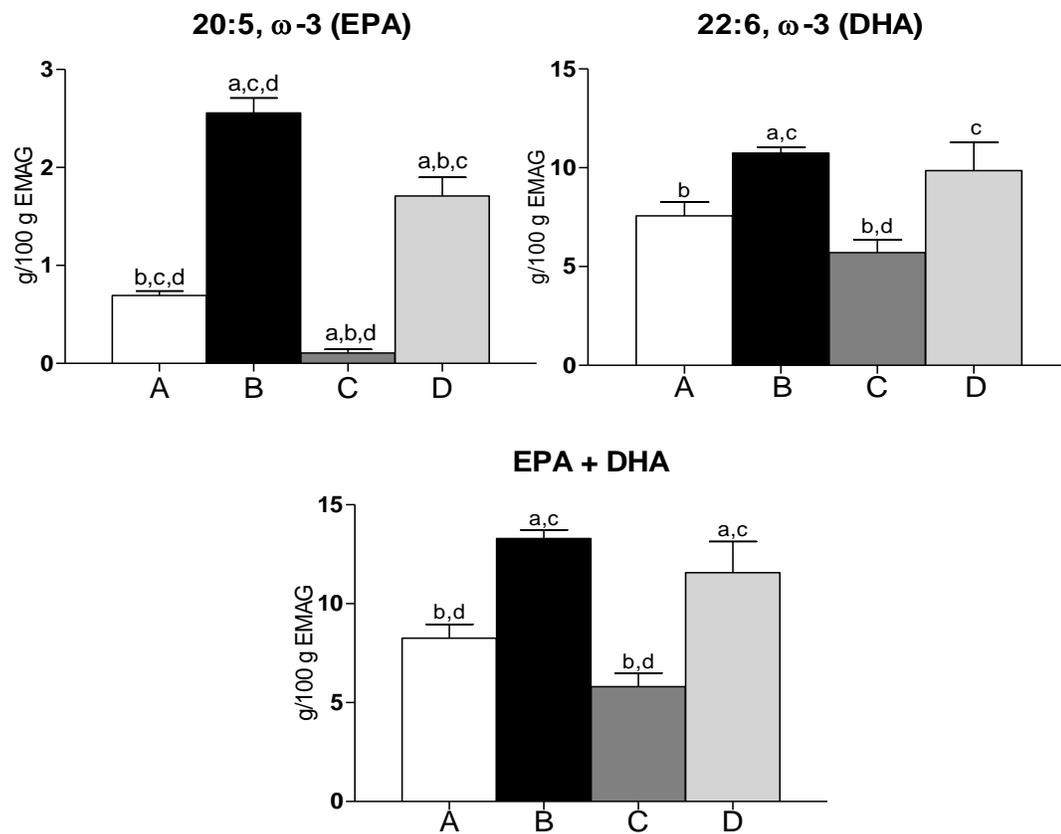


Figura 14. Niveles hepáticos de ácido eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y de EPA+DHA en ratones con 8 semanas de tratamiento. Los valores representan el promedio \pm SEM del contenido de EPA, DHA y EPA+DHA (g) por cada 100g de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.5.2 Tratamiento durante 12 semanas

En la **Tabla 7** se presentan en detalle los valores, expresados en g/100 g EMAG, de los ácidos grasos presentes en el hígado de ratones pertenecientes a los 4 grupos experimentales.

6.5.2.1 Contenido hepático total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados

La **Figura 15** muestra que el grupo alimentado con dieta control y suplementado con EPA y DHA presentó una disminución ($p < 0,05$) de un 28% en el contenido de AGS cuando se comparó con el grupo control. A su vez el grupo alto en grasa mostró un 16% más de AGS ($p < 0,05$) con respecto a los ratones control. No hubo diferencias significativas entre los grupos control y alto en grasa más EPA y DHA. Al comparar los niveles de AGPI se observó una caída de un 31% ($p < 0,05$) en los ratones alimentados con dieta alta en grasa, lográndose una normalización a valores control en el contenido total de AGPI en el grupo alto en grasa suplementado con EPA y DHA. No hubo diferencias significativas en el contenido total de AGMI entre los grupos A, C y D.

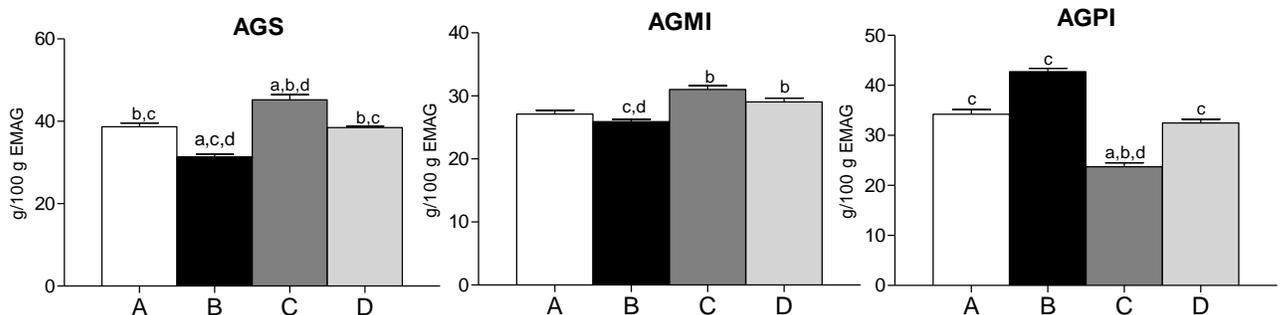


Figura 15. Contenido hepático total de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), en ratones con 12 semanas de tratamiento. Los valores representan el promedio \pm SEM del contenido de AGS, AGMI y AGPI (g) por cada 100g de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.5.2.2 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3

i) Niveles de AGPICL

En la **Figura 16** se observa que los ratones alimentados con dieta control y suplementados con EPA y DHA presentaron niveles hepáticos de AGPICL significativamente más altos (20%) que los ratones controles sin suplementar. El grupo alto en grasa mostró un 38% menos de AGPICL ($p < 0,05$) en comparación al grupo control, lo cual se normalizó a valores control en aquellos ratones alimentados con dieta alta en grasa y suplementados con EPA y DHA.

ii) Niveles de AGPI ω -6 y ω -3

La **Figura 16** muestra una disminución significativa en el contenido hepático de AGPI ω -6 de un 23% y 31% en los grupos control más EPA y DHA y alto en grasa, respectivamente, en comparación con el grupo control. Al analizarse los niveles hepáticos de AGPI ω -3 se encontró un aumento ($p < 0,05$) de un 159% en el grupo control suplementado con EPA y DHA y una disminución ($p < 0,05$) de un 56% en el grupo alimentado con dieta alta en grasa. En ratones que recibieron dieta alta en grasa y suplementación con EPA y DHA se normalizaron los contenidos tanto de AGPI ω -6 como de AGPI ω -3 a valores control.

iii) Relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3

Como se indica en la **Figura 16**, los ratones alimentados con dieta control y suplementados con EPA y DHA mostraron una disminución ($p < 0,05$) de un 70 % en la relación ω -6/ ω -3 al compararlos con ratones control, siendo significativamente más alta (57%) en los ratones alimentados con dieta alta en grasa. Sin embargo, se observó una disminución ($p < 0,05$) de un 36% en el valor de esta relación en los ratones alimentados con dieta alta en grasa y suplementados con EPA y DHA.

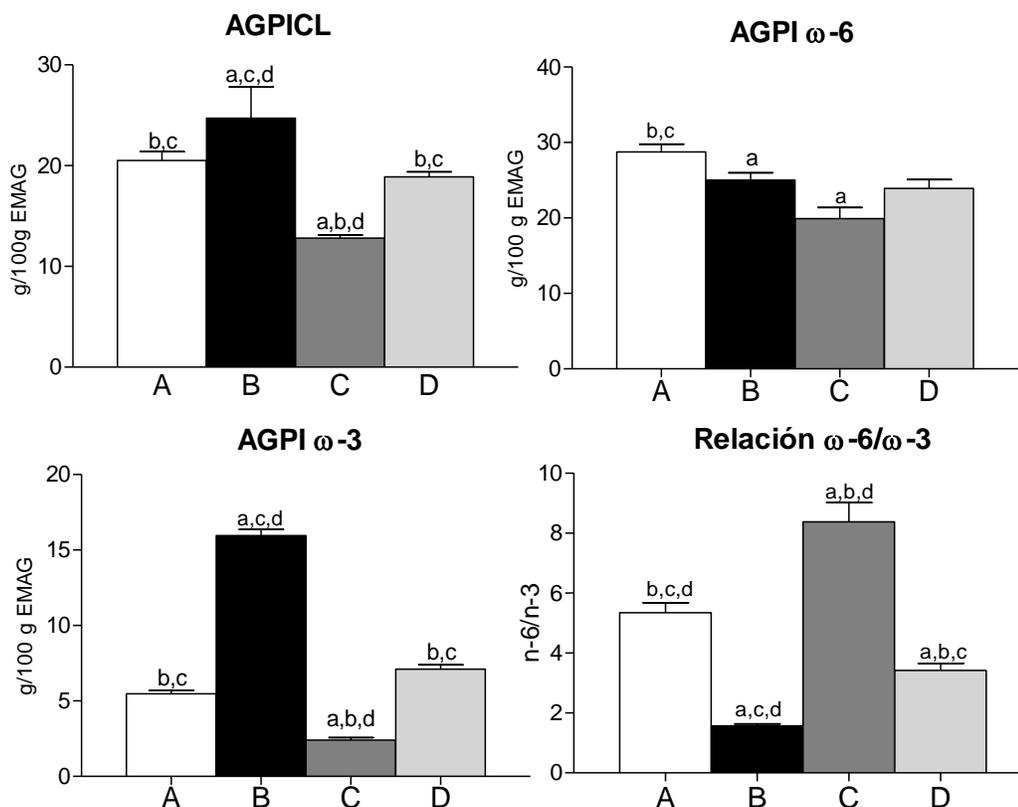


Figura 16. Contenido hepático de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (AGPI ω-6), ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI ω-3) y relación entre los ácidos grasos ω-6 y ω-3 (relación ω-6/ω-3) en ratones con 12 semanas de tratamiento. Los valores representan el promedio ± SEM del contenido de AGPICL, AGPI ω-6 y AGPI ω-3 (g) por cada 100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

6.5.2.3 Niveles hepáticos de EPA, DHA y EPA+DHA

i) Niveles de EPA

En relación a los niveles de EPA indicados en la **Figura 17**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y alto en grasa. Por el contrario, la suplementación con EPA y DHA en ratones alimentados con dieta control y alta en grasa aumentó ($p < 0,05$) el contenido de EPA en un 266% y 144%, respectivamente.

ii) Niveles de DHA

En la **Figura 17** se muestra que el grupo alimentado con dieta alta en grasa presentó una disminución ($p < 0,05$) de un 58% en el contenido de DHA cuando se compara al grupo control. La suplementación con EPA y DHA elevó significativamente el contenido hepático de DHA en ratones alimentados con dieta control (99%), no así en aquéllos que recibieron dieta alta en grasa.

iii) Niveles de EPA+DHA

Como se indica en la **Figura 17**, la suplementación con EPA y DHA en ratones alimentados con dieta control y alta en grasa llevó a un aumento ($p < 0,05$) en el contenido hepático de EPA+DHA de un 217% y 37%, respectivamente, comparado con ratones control. Además, los ratones alimentados con dieta alta en grasa presentaron una disminución ($p < 0,05$) de un 58% al compararlos con los controles.

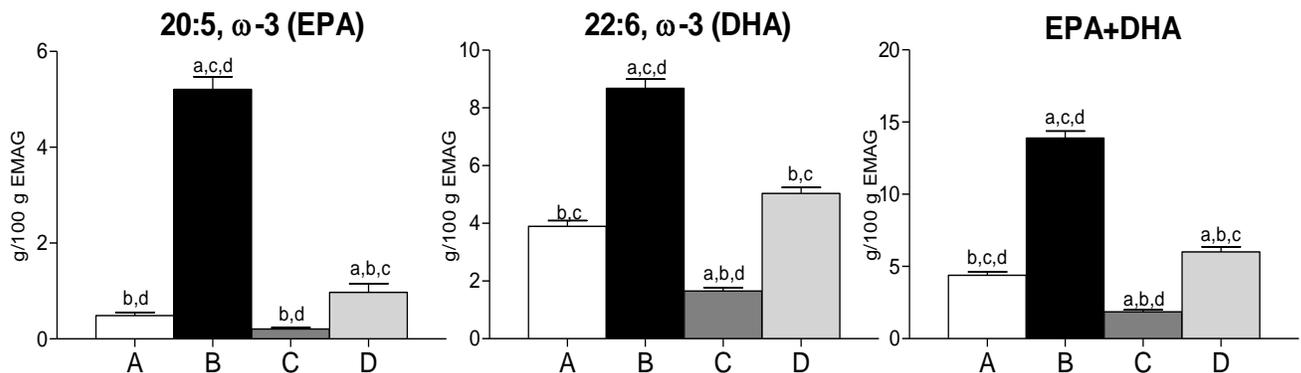


Figura 17. Niveles hepáticos de ácido eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) y de EPA+DHA en ratones con 12 semanas de tratamiento. Los valores representan el promedio \pm SEM del contenido de EPA, DHA y EPA+DHA (g) por cada 100g de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). **A:** Control; **B:** Control + EPA y DHA; **C:** Alto en grasa; **D:** Alto en grasa + EPA y DHA. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados se indica con las letras de los respectivos grupos. $p < 0,05$ (ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

Tabla 6. Composición de ácidos grasos hepáticos en ratones controles y altos en grasa suplementados durante 8 semanas con EPA y DHA. Los valores representan el promedio \pm SEM para 9 ratones por grupo experimental. Los ácidos grasos saturados (AGS) son 12:0, 14:0, 16:0 y 18:0. Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) corresponden al 14:1 ω -7, 16:1 ω -7 y 18:1. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) son el 20:4 ω -6, 20:5 ω -3 (EPA), 22:5 ω -3, y 22:6 ω -3 (DHA). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas mediante letras que identifican cada grupo experimental. (P<0.05; ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

8 semanas	Composición de ácidos grasos (g/100g EMAG)			
Grupos				
Ácido graso	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
14:0	0,6 \pm 0,07	0,4 \pm 0,09	0,5 \pm 0,08	0,7 \pm 0,3
14:1, ω -7	0,3 \pm 0,1	0,05 \pm 0,03	0,2 \pm 0,06	0,1 \pm 0,06
16:0	26,8 \pm 1,4	26,7 \pm 0,8	26,4 \pm 0,9	23,4 \pm 2,1
16:1, ω -7	3,7 \pm 0,4	3,1 \pm 0,2	1,6 \pm 0,4 ^{a,b,d}	3,2 \pm 0,6
18:0	11,4 \pm 0,7	9,2 \pm 0,7	9,3 \pm 0,5	9,2 \pm 1,3
18:1, ω -9	19,4 \pm 0,6	19,8 \pm 0,8	21,8 \pm 1,1	21,5 \pm 3,0
18:2, ω -6	16,4 \pm 0,7	17,3 \pm 0,8	21,2 \pm 0,9 ^{a,b}	18,6 \pm 1,7
18:3, ω -3	1,7 \pm 0,4	1,3 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	2,5 \pm 1,1
20:4, ω -6	7,6 \pm 0,8	5,2 \pm 0,2	7,7 \pm 0,7	5,9 \pm 1,5
20:5, ω -3	0,7 \pm 0,04 ^{b,c,d}	2,6 \pm 0,2 ^{a,c,d}	0,1 \pm 0,04 ^{a,b,d}	1,7 \pm 0,2 ^{a,b,c}
22:5, ω -3	0,6 \pm 0,4	0,5 \pm 0,5	0,7 \pm 0,06	0,4 \pm 0,4
22:6, ω -3	7,6 \pm 0,7 ^b	10,7 \pm 0,3 ^{a,c}	5,7 \pm 0,7 ^{b,d}	9,9 \pm 1,4 ^c
Total AGS	38,9 \pm 1,9	36,4 \pm 1,2	36,3 \pm 1,2	33,4 \pm 2,8
Total AGMI	23,2 \pm 1,1	22,9 \pm 1,0	23,6 \pm 1,5	24,9 \pm 3,3
Total AGPI	37,9 \pm 2,9	40,7 \pm 0,4	40,1 \pm 2,4	41,7 \pm 2,4
AGPICL	18,1 \pm 1,9	21,3 \pm 0,8	15,5 \pm 1,5	19,6 \pm 3,3
Total ω-6 AGPI	26,9 \pm 1,9	25,3 \pm 0,6	31,4 \pm 1,8	27,0 \pm 2,1
Total ω-3 AGPI	10,9 \pm 1,0 ^{b,d}	15,4 \pm 0,7 ^{a,c}	8,6 \pm 0,6 ^{b,d}	14,5 \pm 1,3 ^{a,c}
Relación ω-6/ω-3	2,5 \pm 0,06 ^{b,d}	1,7 \pm 0,1 ^{a,c}	3,7 \pm 0,2 ^{a,b,d}	1,9 \pm 0,3 ^{a,c}

Tabla 7. Composición de ácidos grasos hepáticos en ratones controles y altos en grasa suplementados durante 12 semanas con EPA y DHA. Los valores representan el promedio \pm SEM para 9 ratones por grupo experimental. Los ácidos grasos saturados (AGS) son 12:0, 14:0, 16:0 y 18:0. Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) corresponden al 14:1 ω -7, 16:1 ω -7 y 18:1. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) son el 20:4 ω -6, 20:5 ω -3 (EPA), 22:5, ω -3, y 22:6, ω -3 (DHA). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas mediante letras que identifican cada grupo experimental. ($P < 0.05$; ANOVA unifactorial y test de Newman-Keuls).

12 semanas	Composición de ácidos grasos (g/100g EMAG)			
	Grupos			
Ácido graso	a) Control	b) Control + EPA y DHA	c) Alto en grasa	d) Alto en grasa + EPA y DHA
14:0	2,2 \pm 0,3 ^{b,d}	1,3 \pm 0,2 ^{a,c}	2,2 \pm 0,2 ^{b,d}	1,4 \pm 0,2 ^{a,c}
14:1, ω-7	0,4 \pm 0,03 ^c	0,4 \pm 0,1 ^c	1,7 \pm 0,1 ^{a,b,d}	0,4 \pm 0,04 ^c
16:0	22,7 \pm 0,07 ^b	15,4 \pm 2,0 ^{a,c}	25,3 \pm 0,5 ^b	22,7 \pm 0,4 ^b
16:1, ω-7	2,3 \pm 0,1 ^{b,c,d}	1,4 \pm 0,2 ^{a,c}	5,2 \pm 0,2 ^{a,b,d}	3,6 \pm 0,1 ^{a,b,c}
18:0	12,7 \pm 0,3 ^b	10,4 \pm 1,3 ^{a,c,d}	14,6 \pm 0,6 ^b	13,5 \pm 0,2 ^b
18:1, ω-9	22,5 \pm 0,6	20,4 \pm 2,6	23,3 \pm 0,5	23,6 \pm 0,5
18:2, ω-6	12,6 \pm 0,5	11,8 \pm 1,5	9,7 \pm 0,6	11,8 \pm 0,5
18:3, ω-3	0,3 \pm 0,02	0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,03	0,3 \pm 0,1
20:4, ω-6	11,9 \pm 0,6 ^{b,c,d}	7,7 \pm 1,0 ^a	8,8 \pm 0,3 ^a	8,1 \pm 0,4 ^a
20:5, ω-3	0,5 \pm 0,1 ^{b,c}	5,2 \pm 0,02 ^{a,c,d}	0,2 \pm 0,03 ^{b,d}	1,0 \pm 0,2 ^{a,b,c}
22:5, ω-3	0,7 \pm 0,1 ^c	1,2 \pm 0,2 ^{a,c,d}	0,3 \pm 0,1 ^{a,b,d}	0,8 \pm 0,1 ^{b,c}
22:6, ω-3	3,9 \pm 0,2 ^{b,c}	7,8 \pm 1,0 ^{a,c,d}	1,7 \pm 0,1 ^{a,b,d}	5,0 \pm 0,2 ^{b,c}
Total AGS	38,7 \pm 0,9 ^{b,c}	27,8 \pm 3,5 ^{a,c,d}	45,2 \pm 1,2 ^{a,b,d}	38,5 \pm 0,4 ^{b,c}
Total AGMI	27,1 \pm 0,6	23,0 \pm 2,9 ^{c,d}	31,0 \pm 0,6 ^b	29,1 \pm 0,6 ^b
Total AGPI	34,2 \pm 0,9 ^c	37,9 \pm 4,8 ^c	23,7 \pm 0,8 ^{a,b,d}	32,5 \pm 0,8 ^c
AGPICL	20,5 \pm 0,9 ^{b,c}	24,7 \pm 3,1 ^{a,c,d}	12,8 \pm 0,3 ^{a,b,d}	18,9 \pm 0,5 ^{b,c}
Total ω-6 AGPI	28,7 \pm 1,0 ^{b,c}	22,2 \pm 2,9 ^a	19,9 \pm 1,5 ^a	23,9 \pm 1,1
Total ω-3 AGPI	5,5 \pm 0,2 ^{b,c}	14,2 \pm 1,0 ^{a,c,d}	2,4 \pm 0,2 ^{a,b,d}	7,1 \pm 0,3 ^{b,c}
Relación ω-6/ω-3	5,4 \pm 0,3 ^{b,c,d}	1,6 \pm 0,1 ^{a,c,d}	8,4 \pm 0,6 ^{a,b,d}	3,4 \pm 0,2 ^{a,b,c}

7. DISCUSIÓN

Dieta alta en grasa como modelo nutricional de esteatosis hepática

El presente estudio relaciona el efecto del consumo de una dieta con alto contenido en grasa sobre una serie de alteraciones asociadas a la esteatosis hepática, enfocándose en el origen nutricional de esta patología. Las dietas altas en grasa han sido utilizadas por décadas como modelos de obesidad, dislipidemia y resistencia a la insulina en roedores, donde las alteraciones metabólicas derivadas del consumo de esta dieta se asemejan a las observadas en el síndrome metabólico en humanos (Aguila & Mandarim-de-Lacerda 2003; Woods *et al.*, 2003). También se ha demostrado que el uso de dietas altas en grasa induce el desarrollo de esteatosis hepática en ratones (Buettner *et al.*, 2006). Se han utilizado otro tipo de dietas para este tipo de estudios pero tienen el inconveniente de ser deficientes en proteínas y/o micronutrientes esenciales (Meghelli-Bouchenak *et al.*, 1989; Kawaguchi *et al.*, 2004; Rinella *et al.*, 2008), lo que es representativo de un estado de desnutrición. En este trabajo se utilizó una dieta con un 60% de sus calorías en forma de grasa pero con cantidades suficientes de proteínas y micronutrientes, diferenciándose a la dieta control sólo en la composición de carbohidratos y grasas. Por lo tanto, permite una mejor interpretación del origen nutricional de la esteatosis acorde a la alimentación en el mundo occidental.

Efecto de la suplementación con EPA y DHA en el peso corporal de los ratones

En este trabajo se observó que, a las 12 semanas de tratamiento, la dieta alta en grasa indujo un alza significativa en el peso corporal de los ratones a pesar de que todos los grupos experimentales consumieron la misma cantidad de alimento (datos no mostrados). A su vez, no hubo diferencias en el peso corporal entre los ratones controles y aquéllos con dieta alta en grasa y suplementados con EPA y DHA. La disminución del peso corporal por efecto de la administración de AGPICL ω -3 se ha evidenciado en estudios realizados en roedores (Ji *et al.*, 2009), lo que estaría relacionada al aumento en

la secreción de adiponectina, citoquina secretada por el tejido adiposo que se asocia negativamente con el porcentaje de grasa corporal y grasa visceral, y positivamente con niveles sanguíneos de leptina e insulina (Ryan *et al.*, 2003; Neschen *et al.*, 2006).

Prevención del desarrollo de esteatosis hepática y alteraciones metabólicas asociadas a un alto consumo de grasa mediante suplementación con EPA+DHA

Los resultados de este trabajo muestran que la suplementación dietaria con EPA y DHA en ratones alimentados con dieta alta en grasa disminuye el contenido de lípidos en los hepatocitos y restablece los niveles normales plasmáticos de insulina, glucosa y TNF- α . Estas evidencias demuestran que tanto EPA como DHA ejercen importantes efectos antiinflamatorios, sensibilizadores a la insulina y preventivos en el desarrollo de esteatosis, siendo tales efectos de gran importancia en la hepatoprotección otorgada por estos AGPICL ω -3. El restablecimiento de los niveles hepáticos de AGPICL ω -3 tiene una importancia fundamental en la hepatoprotección, debido a que actúan como ligandos de señalización que participan en la activación y/o represión de múltiples factores de transcripción implicados en el metabolismo lipídico.

Se sabe que los AGPICL ω -3 reprimen la expresión y procesamiento de SREBP-1c, lo que reduce la síntesis *de novo* de ácidos grasos al disminuir la expresión de enzimas implicadas en esta vía metabólica, tales como la ácido graso sintasa, acetil CoA carboxilasa y estearil-CoA desaturasa-1 (Shimano *et al.*, 1999; Sekiya *et al.*, 2003; Spadaro *et al.*, 2008; Ferré & Fofelle, 2010). Por otro lado, los AGPICL ω -3 también son capaces de estimular el catabolismo de ácidos grasos a través de la activación de PPAR- α , factor de transcripción implicado en la expresión de la carnitil aciltransferasa (CAT), acil-CoA oxidasa (ACOX), enoil-CoA hidratasa/deshidrogenasa y β cetoacil-CoA tiolasa, entre otras enzimas que participan en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de los ácidos grasos (Spadaro *et al.*, 2008).

Estudios recientes han señalado a PPAR- γ como un componente importante en la acumulación dependiente de insulina de ácidos grasos a nivel hepático (Valenzuela &

Videla, 2011), lo que se ha evidenciado en un aumento en la expresión de mRNA de PPAR- γ en hígado de pacientes obesos y resistentes a la insulina (Pettinelli & Videla, 2011), al igual que en ratones con esteatosis inducida por dieta alta en grasa (Inoue *et al.*, 2005). PPAR- γ estaría implicado en la expresión de genes relacionados con la captación, unión e ingreso a los tejidos de ácidos grasos libres provenientes del torrente sanguíneo, entre los cuales se encuentran la lipoproteinlipasa (LPL), translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36), proteína transportadora de ácidos grasos (FATP5) y proteína de unión a ácidos grasos (FABP4/5) (Nielsen *et al.*, 2004). Queda demostrar entonces en este modelo experimental el efecto del consumo de una dieta con alto contenido en grasa en la alteración de la expresión o la actividad hepática de estos factores de transcripción, y si la prevención de la esteatosis hepática debido a la suplementación con EPA y DHA se debe a la activación y/o represión de alguno de estos factores de transcripción, con la consiguiente alteración en los niveles hepáticos de sus enzimas blanco.

En este trabajo se comprueban los efectos antiinflamatorios de EPA y DHA a tenor de la normalización en los niveles plasmáticos de TNF- α en ratones alimentados durante 12 semanas con dieta alta en grasa, junto con la normalización a valores control de las citoquinas IL-6 e IL-1 β (datos no mostrados). Las acciones antiinflamatorias de los AGPICL ω -3 han sido demostradas en diversos estudios y, aunque los mecanismos moleculares no se han dilucidado completamente, las evidencias experimentales otorgan un rol importante a NF- κ B, factor transcripcional involucrado en múltiples procesos inflamatorios (Casillas-Ramírez *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Zúñiga *et al.*, 2010). Se ha demostrado que EPA inhibe la translocación de NF- κ B al núcleo, posiblemente por disminución en la fosforilación de I κ B (Camandola *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2004) o de la subunidad p65 de NF- κ B (Suzuki *et al.*, 2010). Un aspecto interesante hace referencia al efecto antiinflamatorio de PPAR- α asociado a su activación por los AGPICL ω -3 (Clarke, 2004), ya que sería capaz de inactivar a NF- κ B a través de la formación de complejos transcripcionalmente inactivos entre PPAR- α y la subunidad p65 de NF- κ B, además de aumentar la expresión de I κ B (Delerive *et al.*, 1999, 2000). Recientemente, se ha demostrado en ratones transgénicos *fat-1* que la síntesis endógena de altas

concentraciones de AGPICL ω -3 a nivel pancreático disminuye los niveles de citoquinas proinflamatorias a través de la disminución en la expresión de p65 y el aumento en la expresión de I κ B α , lo que se asocia con prevención de la diabetes tipo 1 (Bellenger *et al.*, 2011). Cabría determinar en este modelo si la suplementación con EPA y DHA disminuye los niveles de citoquinas proinflamatorias a través de la inactivación de NF- κ B, como también si el descenso de estas citoquinas tendría efectos sensibilizadores a la insulina como consecuencia de la disminución en la actividad de quinasas tales como JNK, PKC- θ o SAPK, cuya activación por citoquinas proinflamatorias altera las vías de señalización normales de la insulina mediante fosforilación de IRS-1 en sus residuos de serina (Videla *et al.*, 2006; Samuel *et al.*, 2007).

Como se señaló anteriormente en la introducción, la fisiopatología de la esteatosis hepática se encuentra íntimamente ligada a las alteraciones que determinan en conjunto el síndrome metabólico. Al respecto, investigaciones en nuestro laboratorio demuestran que la suplementación con EPA y DHA en ratones alimentados con dieta alta en grasa mejoran considerablemente varios parámetros metabólicos, lo que incluye: i) disminución del colesterol total plasmático, ii) reducción en el tamaño y peso de la grasa visceral, iii) disminución en el contenido de lípidos totales en el tejido hepático y iv) normalización del estado redox hepático, reflejado en la disminución en los niveles de F8-isoprostanos, proteínas oxidadas y aumento en el contenido hepático de glutatión reducido (Dossi *et al.*, 2011; González *et al.*, 2011). En conjunto con los resultados de esta memoria, una importante observación general es que la administración de ácidos grasos omega-3 a través de la dieta ayudaría a prevenir el desarrollo del síndrome metabólico, lo que sin duda aumentaría el espectro de acción de estos ácidos grasos y permitiría que su uso no se circunscriba solamente al tratamiento de la esteatosis, sino que también en el mejoramiento de anomalías metabólicas en general.

Disminución de los AGPICL ω -3 y aumento en la relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3 como fenómenos previos al desarrollo de esteatosis hepática

Interesantemente, a las 8 semanas de alimentación con dieta alta en grasa los ratones presentaron tanto disminución hepática de AGPICL ω -3 como aumento en la relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3, a pesar de que no se observaron cambios significativos en el peso corporal ni en los niveles plasmáticos de insulina, glucosa y TNF- α , además de no evidenciarse acumulación de lípidos en los hepatocitos. Lo anterior se podría explicar por el estrés oxidativo, su íntima relación con el desarrollo de resistencia a la insulina y el complemento de ambas alteraciones tanto en la inducción de la esteatosis como en su evolución a fases más avanzadas de la EHGNA (Videla *et al.*, 2006). Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el aumento en el estado redox, reflejado en incrementos en la expresión de enzimas implicadas en la generación de ERO a nivel de tejido adiposo y hepático, precede al desarrollo de resistencia a la insulina e inflamación sistémica (Houstis *et al.*, 2006; Eriksson, 2007; Matsuzawa-Nagata *et al.*, 2008), lo que sugiere que la acumulación de lípidos en el hígado sería un proceso temporal iniciado por alteraciones a nivel del estado redox del organismo que derivarían en la disminución de AGPICL ω -3 y alteraciones en la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para esclarecer estas relaciones en la esteatosis hepática debida a malnutrición por exceso de grasa.

Uso terapéutico de los AGPICL ω -3 en pacientes con esteatosis hepática

Finalmente, cabe destacar el uso de los ácidos grasos omega-3 como una novedosa alternativa en el tratamiento de pacientes con EHGNA. Actualmente existen diversas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad: **(i) pérdida de peso**, donde el paciente obeso debe modificar su estilo de vida o, en casos más severos, se recurre a la cirugía bariátrica y a medicamentos como Orlistat, Sibutramina o Rimonabant, **(ii) fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina**, como la Metformina o las Tiazolidinedionas (TZD) **(iii) enfoque antioxidante** a través del empleo de Vitamina E o el Probucof y **(iv) uso de antiinflamatorios** como la Pentoxifilina y el Infliximab,

además de enfoques antilipemiantes y antiapoptóticos (Anderson & Borlak, 2008; Masterton *et al.*, 2010), pero aún no existe consenso sobre cuál estrategia es la más efectiva (Moseley, 2008). En este contexto, la ventaja del uso terapéutico de los AGPICL ω -3 por sobre otros enfoques radica en el hecho de ser de fácil administración por vía oral, relativamente económico y de fácil disponibilidad, no invasivo, no presenta contraindicaciones al carecer de efectos secundarios, y combina además los efectos antiinflamatorios, antioxidantes y sensibilizadores a la insulina presentes en los otros tratamientos. A pesar de los múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* (principalmente en roedores) que confirman las acciones beneficiosas de los AGPICL ω -3 en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas, es necesario realizar una mayor cantidad de pruebas clínicas en humanos que comprueben su potencial uso en el tratamiento de las diversas alteraciones que conforman en conjunto la EHGNA (Masterton *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2011).

8. CONCLUSIONES

En razón de que:

- La alimentación con una dieta alta en grasa disminuye los niveles de AGPICL ω -3 y aumenta la relación de AGPICL ω -6/ ω -3 a nivel hepático.
- La suplementación dietaria con EPA y DHA (200 mg/kg/día) previene el desarrollo de esteatosis hepática, resistencia a la insulina e inflamación sistémicas inducidas por una dieta alta en grasa. A su vez, eleva los niveles de AGPICL ω -3 y disminuye la relación de AGPICL ω -6/ ω -3 en el hígado.
- A las 8 semanas de tratamiento la dieta alta en grasa induce disminución hepática de AGPICL ω -3 y aumento en la relación de AGPICL ω -6/ ω -3, a pesar de no haber desarrollo de esteatosis hepática, resistencia a la insulina e inflamación sistémica.

En conjunto, los resultados sugieren que la administración de los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico tendría efectos positivos en el tratamiento de las alteraciones que conforman el síndrome metabólico.

9. ANEXO

9.1 Certificado de aprobación del comité de bioética



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES**

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: ***“Protection with oral n-3 PUFA (EPA + DHA) supplementation against liver injury, inflammation, oxidative stress and insulin resistance induced by a high-fat diet: activation of PPAR-alpha and NF-κB inactivation”*** cuyo investigador responsable es la **Dra. Gladys Tapia Opazo** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0386 FMUCH).

La Dra. Tapia, se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2011.

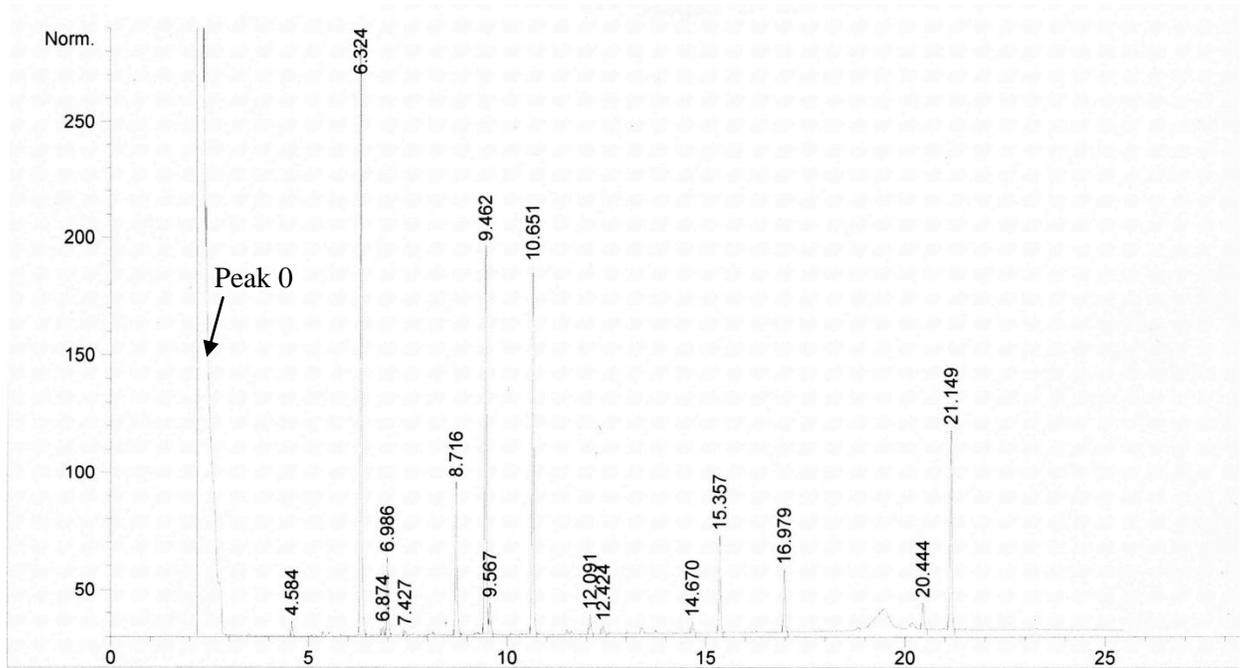
El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” (www.med.uchile.cl/normas/indice.html) después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.

Santiago, 14 de Julio de 2010.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente



9.2 Modelo de cromatograma obtenido a partir de un cromatógrafo de gas-líquido



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.584	PB	0.0291	12.59998	6.35084	0.50034
2	6.324	BB	0.0389	654.86249	255.30296	26.00422
3	6.874	BP	0.0367	8.72205	3.54882	0.34635
4	6.986	VB	0.0382	82.72431	33.05154	3.28494
5	7.427	PB	0.0390	5.29535	1.99552	0.21028
6	8.716	BB	0.0460	194.41583	64.88429	7.72014
7	9.462	BV	0.0469	493.24182	164.77295	19.58635
8	9.567	VB	0.0418	37.12869	13.21837	1.47436
9	10.651	BB	0.0431	457.65778	156.62340	18.17333
10	12.091	PB	0.0452	24.08968	8.22909	0.95659
11	12.424	PB	0.0476	9.94849	3.26317	0.39505
12	14.670	PB	0.0465	13.53310	4.57886	0.53739
13	15.357	BB	0.0432	119.92251	40.96119	4.76205
14	16.979	BB	0.0474	77.52299	26.30104	3.07839
15	20.444	PB	0.0517	37.10663	11.18802	1.47348
16	21.149	BB	0.0508	289.52191	84.86853	11.49675

Totals : 2518.29360 879.13859

Cada **peak** corresponde a un éster de ácido graso presente en la muestra, caracterizado por un tiempo de retención (RetTime) particular y cuya cantidad está determinada por el área (Area) del peak en cuestión. El *peak 0* representa al solvente hexano.

En el caso del cromatograma presentado como modelo, los peaks señalados corresponden a los siguientes compuestos:

Peak	Compuesto	Número lipídico
1	Ácido mirístico	C14:0
2	Ácido palmítico	C16:0
3,4 y 5	Ácido palmitoleico	C16:1
6	Ácido esteárico	C18:0
7 y 8	Ácido oleico	C18:1
9	Ácido linoleico	C18:2
10 y 11	Ácido α -linolénico	C18:3
12	Ácido dihomo- γ -linolénico	C20:3
13	Ácido araquidónico	C20:4
14	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	C20:5
15	Ácido docosapentaenoico	C22:5
16	Ácido docosahexaenoico (DHA)	C22:6

10. REFERENCIAS

Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2003. Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months. *Nutrition*. **19**, 347-52.

Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE. 2009. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. **4**, 445-51.

Anderson N, Borlak J. 2008. Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis. *Pharmacol Rev*. **60**, 311-57.

Angulo P, Lindor K. 2002. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. **17**, S186-90.

Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. 2004. 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*. **106**, 635-43.

Araya J, Rodrigo R, Pettinelli P, Araya AV, Poniachik J, Videla LA. 2010. Decreased Liver Fatty Acid Delta-6 and Delta-5 Desaturase Activity in Obese Patients. *Obesity*. **18**, 1460-3.

Aronis A, Madar Z, Tirosh O. 2005. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med*. **38**, 1221-30.

Bellenger J, Bellenger S, Bataille A, Massey KA, Nicolaou A, Rialland M, Tessier C, Kang JX, Narce M. 2011. High Pancreatic n-3 Fatty Acids Prevent STZ-Induced Diabetes in Fat-1 Mice: Inflammatory Pathway Inhibition. *Diabetes*. **60**, 1090-9.

Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. 2010. Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis*. **28**, 155-61.

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* **37**, 911-7.

Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. 2001. Activation of the nuclear factor-kB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci.* **21**, 4668-77.

Browning JD, Horton JD. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* **114**, 147-52.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* **36**, 485-501.

Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. 2010. Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Pharm Anal.* **16**, 1941-51.

Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. 2008. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Rev Esp Enferm Dig.* **100**, 565-78.

Burr GO, Burr MM. 1930. On the nature and role of fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem.* **86**, 587-621.

Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Parks JK, Parker WD. 1999. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* **31**, 430-4.

Camandola S, Leonarduzzi G, Musso T, Varesio L, Carinia R, Scavazzaa A, Chiarpotta E, Baeuerled PA, Poli G. 1996. Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. *Biochem Res Commun.* **229**, 643-7.

Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, Svegliati-Baroni G, Sofi F, Milani S, Abbate R, Surrenti C, Casini A. 2006. 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.

- Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. 2006. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* **79**, 1881-94.
- Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. 2003. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **95**, 1079-85.
- Cho HP, Nakamura M, Clarke SD. 1999. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem.* **274**, 37335-9.
- Clarke SD. 2004. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol.* **15**, 13-8.
- Das UN. 2006a. Biological significance of essential fatty acids. *J Assoc Physicians India.* **54**, 309-19.
- Das UN. 2006b. Essential fatty acids -a review. *Curr Pharm Biotechnol.* **7**, 467-82.
- Day CP. 2006. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med.* **6**, 19-25.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Berghe WV, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kB and AP-1. *J Biol Chem.* **274**, 32048-54.
- Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. 2000. Induction of I κ B α expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor α activators. *J Biol Chem.* **275**, 36703-7.
- Demoz A, Willumsen N, Berge RK. 1992. Eicosapentaenoic acid at hypotriglyceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defense in mice. *Lipids.* **27**, 968-71.

Dorfman SE, Laurent D, Gounarides JS, Li X, Mullarkey TL, Rocheford EC, Sari-Sarraf F, Hirsch EA, Hughes TE, Commerford SR. 2009. Metabolic implications of dietary trans-fatty acids. *Obesity*. **17**, 1200-7.

Dossi C, D'Espessailles A, Valenzuela R, Tapia G. 2011. Suplementación con ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico y cambios en el estado de estrés oxidativo hepático en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. XXII Congreso Anual Sociedad Chilena De Endocrinología y Diabetes, Antofagasta, Chile.

Eriksson JW. 2007. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation -A hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett*. **581**, 3734-42.

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. 2008. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. **134**, 424-31.

Fedorova I, Salem Jr N. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostag Leukotr Ess*. **75**, 271-89.

Ferré P, Foufelle F. 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*. **12**, 83-92.

Firestone D. 1997. In Official Methods of Analysis of AOAC International (Cunniff, P., Ed.), 963-4, *Assoc. Official Anal. Chem.*, Gaithersburg, MD.

Gibson RA, Makrides M. 1998. The role of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in neonatal nutrition. *Acta Paediatr*. **87**, 1017-22.

González D, Valenzuela R, Dossi C, D'Espessailles A, Poblete I, Cataldo X, Varela P, Tapia, G. 2011. Cambios en los niveles de 8-isoprostanos, proteínas oxidadas y glutatión hepáticos en ratones obesos suplementados dietariamente con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3. II Simposio "Radicales Libres Y Antioxidantes", Free Radicals And Antioxidants Group, Santiago, Chile.

González-Pérez A, Planaguma A, Gronert K, Miquel R, López-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferré N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodés J, Claria J. 2006. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* **20**, 1844-55.

González-Pérez A. 2009. Efectos protectores de los ácidos grasos omega-3 en el hígado y en el tejido adiposo. Memoria para optar al título de Doctora en Biología. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Chzech MP. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 367–77.

Harris WS. 2003. n-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids reduce risk of coronary heart disease death: extending the evidence to the elderly. *Am J Clin Nutr.* **77**, 279-80.

Hellemans K, Kerckhofs K, Hannaert JC, Martens G, Van Veldhoven P, Pipeleers D. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-retinoid X receptor agonists induce beta-cell protection against palmitate toxicity. *FEBS J.* **274**, 6094-105.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* **13**, 944-8.

Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosokia Y, Miyoshia S, Suzukia Y, Saitoa H, Kohgoa Y, Okumura T. 2005. Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Bioph Res Co.* **336**, 215-22.

Ji S, Hardy RW, Wood PA. 2009. Transgenic Expression of n-3 Fatty Acid Desaturase (fat-1) in C57/BL6 Mice: Effects on Glucose Homeostasis and Body Weight. *J Cell Biochem.* **107**, 809-17.

- Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. 2004. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Bioph Res Co.* **315**, 187-95.
- Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. 2002. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr.* **22**, 325-46.
- Lee SA, Kim HJ, Chang KC, Baek JC, Park JK, Shin JK, Choi WJ, Lee JH, Paik WY. 2009. DHA and EPA Down-regulate COX-2 Expression through Suppression of NF- κ B Activity in LPS-treated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* **13**, 301-7.
- Lelliott CJ, Ljungberg A, Ahnmark A, William-Olsson L, Ekroos K, Elmgren A, Arnerup G, Shoulders CC, Oscarsson J, Lindén D. 2007. Hepatic PGC-1beta overexpression induces combined hyperlipidemia and modulates the response to PPARalpha activation. *Arterioscl Throm Vasc.* **27**, 2707-13.
- Lombardo YB, Chicco AG. 2006. 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.
- Mardones M, Valenzuela R, Romanque R, Covarrubias N, Anghileri F, Fernández V, Videla LA, Tapia G. 2011. Prevention of liver ischemia reperfusion injury by a combined thyroid hormone and fish oil protocol. *J Nutr Biochem.* (Article in press).
- Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. 2010. Review article: omega-3 fatty acids-a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* **31**, 679-92.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. 2008. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. **57**, 1071-7.

Matthews DR, Hosker JR, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. **28**, 412-9.

McGuinness J, Neilan TG, Sharkasi A, Bouchier-Hayes D, Redmond JM. 2006. Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **132**, 72-9.

Meghelli-Bouchenak M, Belleville J, Boquillon M. 1989. Hepatic steatosis and serum very low density lipoproteins during two types of protein malnutrition followed by balanced refeeding. *Nutrition*. **5**, 321-9.

Moseley RH. 2008. Therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. **42**, 332-5.

Musso G, Gambino R, Cassader M. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid R*. **48**, 1-26.

Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, Farooq S, Ravikumar R, Mohan V, Balasubramanyam M. 2010. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clin Biochem*. **43**, 815-21.

Neschen S, Morino K, Rossbacher J, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, Gillum M, Shulman GI. 2006. Fish Oil Regulates Adiponectin Secretion by a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Dependent Mechanism in Mice. *Diabetes*. **55**, 924-8.

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. 2003. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology*. **37**, 1202-19.

Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. 2004. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. **113**, 1582-8.

Obara N, Fukushima K, Ueno Y, Wakui Y, Kimura O, Tamai K, Kakazu E, Inoue J, Kondo Y, Ogawa N, Sato K, Tsuduki T, Ishida K, Shimosegawa T. 2010. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *J Hepatol*. **53**, 326-34.

Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, Csendes A, Gutierrez L, Rojas J, Korn O, Maluenda F, Diaz JC, Rencoret G, Braghetto I, Castillo J, Poniachik J, Videla LA. 2009. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta*. **1792**, 1080-6.

Pettinelli P, Obregón AM, Videla LA. 2011. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp*. **26**, 441-50.

Pettinelli P, Videla LA. 2011. Up-Regulation of PPAR- γ mRNA Expression in the Liver of Obese Patients: an Additional Reinforcing Lipogenic Mechanism to SREBP-1c Induction. *J Clin Endocrinol Metab*. **96**, 1424-30.

Piro S, Spadaro L, Russello M, Spampinato D, Oliveri CE, Vasquez E, Benigno R, Brancato F, Purrello F, Rabuazzo AM. 2008. Molecular determinants of insulin resistance, cell apoptosis and lipid accumulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. **18**, 545-52.

Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. 2008. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J Gastroenterol*. **14**, 185-92.

Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. 2008. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res.* **49**, 1068-76.

Ryan AS, Berman DM, Nicklas BJ, Sinha M, Gingerich RL, Meneilly GS, Egan JM, Elahi D. 2003. Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care.* **26**, 2383-8.

Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang X, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI. 2007. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* **117**, 739-45.

Schmocker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX. 2007. Omega-3 Fatty Acids Alleviate Chemically Induced Acute Hepatitis by Suppression of Cytokines. *Hepatology.* **45**, 864-9.

Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N, Shimano H. 2003. Polyunsaturated Fatty Acids Ameliorate Hepatic Steatosis in Obese Mice by SREBP-1 Suppression. *Hepatology.* **38**, 1529-39.

Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3 derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids.* **39**, 1125-32.

Sesti G. 2002. Apoptosis in the beta cells: cause or consequence of insulin secretion defect in diabetes? *Ann Med.* **34**, 444-50.

Shapiro H, Tehilla M, Attal-Singer J, Bruck R, Luzzatti R, Singer P. 2011. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr.* **30**, 6-19.

Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest.* **99**, 846-54.

Simopoulos AP. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.* **233**, 674-88.

Simopoulos AP. 2010. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Exp Biol Med.* **235**, 785-95.

Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F. 2008. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Digest Liver Dis.* **40**, 194-9.

Sun C, Wei ZW, Li Y. 2011. DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver. *Mol Biol Rep.* **38**, 731-7.

Suzuki M, Noda K, Kubota S, Hirasawa M, Ozawa Y, Tsubota K, Mizuki N, Ishida S. 2010. Eicosapentaenoic acid suppresses ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis.* **16**, 1382-8.

Valenzuela R, Tapia G, González M, Valenzuela A. 2011. Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev Chil Nutr.* **38**, 356-67.

Valenzuela R, Videla LA. 2011. 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.

Valenzuela R, Gormaz JG, Masson L, Vizcarra M, Cornejo P, Valenzuela A, Tapia G. 2012. Evaluation of the hepatic bioconversion of α -linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed with oils from chia (*Salvia hispánica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*). *Grasas aceites.* **63**, 61-9.

- Van der Heide JJH, Henk JM, Donker J. 1993. Effects of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. *N Engl J Med.* **329**, 769-73.
- Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernández V, Tapia G, Quiñones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz JC, Smok G, Thielemann L, Poniachik J. 2004. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Clin Sci.* **106**, 261-8.
- Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. 2006. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med.* **12**, 555-8.
- Wang H, Storlien LH, Huang XF. 2002. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282**, 1352-9.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* **133**, 1081-7.
- Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 9116-21.
- Yang B, Saldeen TGP, Nichols WW, Mehta JL. 1993. Dietary fish oil supplementation attenuates myocardial dysfunction and injury caused by global ischaemia and reperfusion in isolated rat hearts. *J Nutr.* **123**, 2067-74.
- Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, Oren R. 2007. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol.* **47**, 711-7.
- Zhao Y, Swati JB, Shirish B, Chen LH. 2004. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. *J Am Coll Nutr.* **23**, 71-8.

Zhong Z, Thurman RG. 1995. A fish oil diet minimizes hepatic reperfusion injury in the low-flow, reflow liver perfusion model. *Hepatology*. **22**, 929-35.

Zúñiga J, Venegas F, Villarreal M, Núñez D, Chandía, M, Valenzuela R, Tapia G, Varela P, Videla LA, Fernández V. 2010. Protection against in vivo ischemia-reperfusion injury by n-3 long chain polyunsaturated fatty acid in the rat. *Free Radical Res*. **44**, 854-63.

