

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ROL DE LOS TOCOFEROLES EN LA PREVENCIÓN DE
ALTERACIONES HEPÁTICAS Y DE TEJIDO ADIPOSO
VISCERAL INDUCIDAS POR UNA DIETA ALTA EN
GRASAS EN UN MODELO MURINO**

RUTH ANGÉLICA SEPÚLVEDA SARMIENTO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dra. Gladys Tapia Opazo

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

RUTH ANGÉLICA SEPÚLVEDA SARMIENTO

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día
(día, mes, año)**

Prof. Dr.(a) Gladys Tapia Opazo

Director(a) de Tesis

(lugar)

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Prof. Dr. Prof. Dr.

Prof. Dr.

Presidente Comisión

“Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido”

Marie Curie

DEDICATORIA

A mi inspiración,

Benjamín

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo de mi familia, por la paciencia y amor que me entregan cada día

A mi tutora de tesis Dra. Gladys Tapia, por sus consejos y darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Daniel y David que me apoyaron con los experimentos, consejos y estar siempre disponibles a mis dudas. Muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.2 Estrés oxidativo e inflamación en el desarrollo de resistencia a la insulina	2
1.3 Tocoferoles (Vitamina E) y su rol como antioxidante	6
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVOS	7
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	7
4. METODOLOGÍA	8
4.1 Animales de experimentación	8
4.2 Diseño experimental.....	8
4.3 Determinación de los parámetros generales del estudio	11
4.3.1 Determinación de la ingesta alimentaria.....	11
4.3.2 Determinación de peso corporal, hígado y grasa visceral.....	11
4.3.3 Determinación de glicemia basal, triglicéridos y colesterol total en plasma	11
4.4 Evaluación de la histología del tejido adiposo y hepático	12
4.5 Determinación de ácidos grasos hepáticos totales	12
4.6 Niveles de expresión en tejido hepático y adiposo de <i>TNF-α</i> , <i>IL-1β</i> , <i>IL10</i> y <i>Nrf2</i>	12
4.7 Análisis estadístico.....	13
5. RESULTADOS	14
5.1 Determinación de la ingesta alimentaria	14
5.2 Parámetros generales: Peso corporal, contenido de grasa visceral, colesterol, triglicéridos y glicemia basal.....	14
5.3 Determinación de los tamaños de los adipocitos	17
5.4 Determinación de esteatosis hepática mediante histología y contenido total de ácidos grasos hepáticos.....	19
5.5 Determinación de los parámetros de inflamación, a través de la determinación de la expresión de citoquinas plasmáticas (TNF-alfa, IL-1 β , IL-10) y el factor de transcripción Nrf2 como parámetro de estrés oxidativo	21

6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIÓN	27
REFERENCIAS	28

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional y aporte calórico de la dieta control experimental y la dieta alta en grasa	9
Tabla 2. Ingesta alimentaria e ingesta calórica de los grupos en experimentación	14
Tabla 3 Parámetros generales de los grupos experimentales.	16

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática del diseño experimental	10
Figura 2. Peso corporal y contenido de grasa visceral.	17
Figura 3. Histología tejido adiposo.	18
Figura 4. Área media de los adipocitos	18
Figura 5. Histología hepática	20
Figura 6. Contenido de grasa en el tejido hepático	20
Figura 7. Nivel de expresión de citoquinas en tejido hepático mediante qPCR	21
Figura 8. Nivel de expresión de citoquinas en tejido adiposo mediante qPCR	22
Figura 9. Nivel de expresión ARNm de Nrf2 mediante qPCR	23

ABREVIATURAS

DAG+RM:	Aceite de rosa mosqueta sin tocoferoles
ALN:	Ácido α -linolénico
DHA:	Docosahexaenoico
DAG:	Dieta alta en grasas
DC:	Dieta control
ACOX-1:	Enzima acil-coenzima oxidasa
EPA:	Ácido eicosapentaenoico
NASH:	Esteatohepatitis no alcohólica
EHGNA:	Esteatosis hepática no alcohólica
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa
IL:	Interleuquina
HSL:	Lipasa sensible a hormonas
NO:	Óxido nítrico
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
ONOO-:	Peroxinitrilo
OH:	Radical hidroxilo
O₂:	Radical superóxido
RI:	Resistencia a la insulina
RM:	Rosa mosqueta
TF:	Tocoferoles
TAG:	Triglicéridos

RESUMEN

La obesidad se considera actualmente una de las enfermedades crónicas de mayor importancia a nivel mundial, tanto por su alta prevalencia en la población como por su asociación con múltiples comorbilidades que afectan negativamente la salud de los individuos que las padecen. La etiopatogenia de la obesidad es compleja y multifactorial, pero la malnutrición por exceso de consumo de lípidos y carbohidratos explica la mayor parte de la prevalencia en la población. Se encuentra fuertemente asociada al síndrome metabólico, el cual abarca un conjunto de factores de riesgo que predisponen el desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2, tales como la obesidad visceral, hipertensión arterial, dislipidemia y anormalidades en el metabolismo de la glucosa.

En un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio se probó que el aceite de rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) que se caracteriza por ser una fuente rica de ácido α -linolénico (ALN), precursor que se bioconvierte en ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), y altos niveles de alfa y gamma tocoferoles, polifenoles y fitoesteroles, previene el desarrollo de la obesidad, la resistencia a la insulina, la inflamación hepática y sistémica y la esteatosis hepática en un modelo murino alimentado con dieta alta en grasas (DAG). Sin embargo, los hallazgos encontrados no revelan el papel que juega cada uno de los componentes de la rosa mosqueta (RM), y estudiar los componentes mayoritarios, como los tocoferoles, es primordial para dilucidar el rol en la protección contra los parámetros del síndrome metabólico.

En este trabajo se estudió como los alfa y gama tocoferoles disminuyen el desarrollo de alteraciones del hígado y del tejido adiposo visceral: hipertrofia de los adipocitos, esteatosis hepática, y además la disminución de parámetros de inflamación y estrés oxidativo en ratones machos C57BL/6J inducidos por una dieta alta en grasa. El diseño experimental consistió en ratones divididos en cinco grupos (n=9), alimentados con dieta control (DC) o con DAG, suplementados o no con tocoferoles (TF), durante 12 semanas. Además, un grupo alimentado con DAG y suplementando con aceite de RM sin tocoferoles, DAG+RM(-).

La alimentación con DAG aumentó significativamente el peso corporal, el peso del tejido adiposo y el tamaño de los adipocitos e indujo esteatosis hepática, junto con elevar los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias (*TNF- α* , *IL-1 β*), efectos que disminuyeron significativamente en los animales DAG+T. Entre estos grupos no se observaron cambios en la expresión del factor de transcripción *Nrf2*.

Se concluye que la suplementación alimentaria de una mezcla de alfa y gama tocoferoles (1:5) disminuyó significativamente la hipertrofia del tejido adiposo visceral, la esteatosis hepática, y marcadores de la inflamación en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

ABSTRACT

Obesity is currently considered one of the most important chronic diseases worldwide, both due to its high prevalence in the population and its association with multiple comorbidities that negatively affect the health of individuals who suffer from them. The etiopathogenesis of obesity is complex and multifactorial, but malnutrition due to excess consumption of lipids and carbohydrates accounts for most of the prevalence in the population. It is strongly associated with the metabolic syndrome, which encompasses a set of risk factors that predispose the development of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, such as visceral obesity, hypertension, dyslipidemia and abnormalities in glucose metabolism.

In a recent work carried out in our laboratory it was proved that rosehip oil (*Rosa rubiginosa*) is characterized as a rich source of α -linolenic acid (ALN), a precursor that bioconverts into eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), and high levels of alpha and gamma tocopherols, polyphenols and phytosterols, prevents the development of obesity, insulin resistance, hepatic and systemic inflammation and hepatic steatosis in a murine model fed a high-fat diet (DAG). However, the findings do not reveal the role played by each of the components of the rose hip (MRI), and study the major components, such as tocopherols, is essential to elucidate the role in protecting against the metabolic syndrome parameters.

In this work we studied how alpha and gamma tocopherols decrease the development of liver and visceral adipose tissue alterations: adipocyte hypertrophy, hepatic steatosis, and also the decrease of inflammation and oxidative stress parameters in male C57BL / 6J induced mice for a diet high in fat. The experimental design consisted of mice divided into five groups (n = 9), fed control diet (DC) or with DAG, supplemented or not with tocopherols (TF), for 12 weeks. In addition, a group fed with DAG and supplemented with RM oil without tocopherols, DAG + RM (-).

Feeding with DAG significantly increased body weight, adipose tissue weight and adipocyte size and induced hepatic steatosis, along with raising the levels of expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β), effects that decreased significantly in the DAG + T animals. Among these groups no changes were observed in the expression of the transcription factor Nrf2.

It is concluded that dietary supplementation of a mixture of alpha and gamma tocopherols (1:5) significantly decreased visceral adipose tissue hypertrophy, hepatic steatosis, and markers of inflammation in mice fed a high-fat diet.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad y síndrome metabólico

La obesidad se considera actualmente una de las enfermedades crónicas de mayor importancia a nivel mundial, tanto por su alta prevalencia en la población como por su asociación con múltiples comorbilidades que afectan negativamente la salud de los individuos que las padecen. Se ha transformado en un problema de salud pública muy importante en el mundo occidental: En Estados Unidos, por ejemplo, se estima que alrededor del 66% de los sujetos adultos sufren de sobrepeso y un 32% de éstos son obesos (1), encontrándose en Chile valores muy similares de un 67% de sobrepeso, 32,1% de obesidad en hombres y 28,9% de obesidad en mujeres (2). La etiopatogenia de la obesidad es compleja y multifactorial debido a la multitud de factores genéticos, metabólicos, endocrinológicos y ambientales que influyen en su origen y desarrollo, pero la malnutrición por exceso de consumo de lípidos y carbohidratos explica la mayor parte de la presencia de esta condición clínica en la población, estableciéndose además la expansión del tejido adiposo visceral producto de la malnutrición como uno de los factores determinantes en la asociación de la obesidad con las alteraciones fisiopatológicas que la acompañan (3). Se encuentra fuertemente asociada al *síndrome metabólico*, término que abarca un conjunto de factores de riesgo que predisponen el desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2, dentro de los cuales se encuentran la obesidad visceral, hipertensión arterial, dislipidemia y anormalidades en el metabolismo de la glucosa, donde la resistencia a la insulina (RI) juega un rol fundamental como denominador común en la etiopatogenia de este síndrome (4). La RI se define como la respuesta inadecuada de los tejidos periféricos (hígado, tejido adiposo y músculo esquelético) a los efectos fisiológicos de la insulina circulante en sangre, siendo esta disminución en la sensibilidad a la hormona responsable de la reducción en la captación de glucosa a nivel sistémico, falla en la inhibición de la producción de glucosa en hígado e incapacidad de la insulina para inhibir la lipólisis en el tejido adiposo visceral (1). La RI y la obesidad son generalmente provocadas por una condición excesiva de nutrientes atribuible a un desequilibrio entre la ingesta de energía, el

gasto y el almacenamiento. Es importante mencionar que el hígado y el tejido adiposo en forma conjunta participan en la mantención de la homeostasis de la glucosa y de los lípidos a través de la secreción de varios factores humorales y/o neuronales (5). Debido a las importantes funciones que cumple la hormona insulina en la regulación de la homeostasis energética, es primordial estudiar y entender la patogénesis de la RI para guiar el desarrollo de futuras terapias destinadas al tratamiento de las alteraciones que conforman el síndrome metabólico (1).

1.2 Estrés oxidativo e inflamación en el desarrollo de resistencia a la insulina

Muchos de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos que acompañan al desarrollo de RI no se encuentran completamente dilucidados. Sin embargo, hay aspectos generales, y una de sus características más importantes es que está asociada con un aumento en el tamaño del tejido adiposo como evento primario, lo que se acompaña con un aumento progresivo en el estado proinflamatorio y de estrés oxidativo que altera el funcionamiento normal de tejidos periféricos como el hígado y músculo esquelético, dado el alto grado de interacción que existe entre estos tejidos en la regulación de la homeostasis energética. También se ha establecido que la obesidad y resistencia a la insulina se encuentran asociadas al desarrollo de un estado de estrés oxidativo crónico, como consecuencia del desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno, tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrilo ($ONOO^{\cdot-}$) junto con la disminución de las defensas antioxidantes, lo que genera daño de macromoléculas, muerte celular y alteración en la función normal de los tejidos encargados de preservar la homeostasis energética y fisiológica (6). Se ha demostrado incluso, en algunos modelos *in vitro* e *in vivo*, que el aumento en el estado redox celular reflejado en incrementos en la expresión de enzimas implicadas en la generación de especies reactivas de oxígeno a nivel de tejido adiposo y hepático, precede al desarrollo de RI e inflamación sistémica (5).

Inflamación en tejido adiposo visceral y resistencia a la insulina: Con respecto al tejido adiposo visceral, se ha descrito a la inflamación crónica de bajo grado en este tejido como un componente importante en el desarrollo de RI, la cual se gatilla en primer lugar por la expansión del tejido adiposo visceral debido al aumento tanto en el tamaño (hipertrofia)

como en el número (hiperplasia) de los adipocitos. En el tejido adiposo, la desregulación en la producción de adipocinas conduce a un estado de RI que está íntimamente ligado con la obesidad (4). Además, se ha descrito que hay un aumento en la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en expansión, lo que contribuye al aumento en el estado inflamatorio crónico de este tejido al haber una elevación en la producción de citoquinas como: Interleuquina (IL) 1 β , y 6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), resistina, entre otras; adipocinas (adiponectina, leptina), entre otros factores responsables de la inflamación crónica. La presencia de una respuesta inflamatoria acumulativa en el tejido adiposo puede jugar un rol causal en diversas entidades clínicas como RI, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, diabetes tipo 2 y esteatosis hepática no alcohólica (7). Además, las adipocitoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 llegan al hígado a través de la circulación sanguínea y afectarían negativamente la señalización normal del receptor de insulina en los hepatocitos (8). Por otra parte, cambios metabólicos en el funcionamiento de los adipocitos determinan que éstos disminuyan su capacidad para almacenar triglicéridos, por lo que el exceso de ácidos grasos que no puede almacenar los adipocitos se comienzan a acumular en órganos que no están diseñados para almacenar grandes cantidades de éstos, tales como el hígado y músculo esquelético, fenómeno conocido como acumulación ectópica de ácidos grasos. En estas condiciones, cuando se saturan la capacidad de metabolización y almacenamiento de estos órganos se genera una respuesta tóxica conocida como lipotoxicidad, la cual conlleva a la acumulación de metabolitos específicos tales como ceramidas y diacilglicerol, capaces de alterar la función normal de los receptores de insulina (8)

Síndrome metabólico e hígado graso: La RI se definía anteriormente desde una perspectiva glucocéntrica, considerándose la glucotoxicidad como la principal causa de daño, pero se sabe actualmente que elevados niveles de ácidos grasos también contribuyen al desarrollo de esta patología (9). Además, a nivel hepático existe una relación íntima entre RI y el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica (EHGNA), a tal punto que se considera a esta patología como la manifestación del síndrome metabólico en el hígado (10, 11). 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 triglicéridos (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 (12). 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 (13). Por otro lado, elevados niveles de glucosa estimulan por retroalimentación β -pancreática un aumento compensatorio en la secreción de insulina. Como consecuencia de esta hiperinsulinemia, hay un estímulo en la actividad de factores de transcripción de tipo lipogénicos y aumenta tanto la síntesis como la captación de ácidos grasos, redireccionándose el destino de los ácidos grasos libres hacia la síntesis de TAG intrahepática (14). Se ha descrito el desarrollo de RI hepática en ratas alimentados con DAG durante sólo 3 días, lo que se explica porque el aumento en el contenido hepático de diacilglicerol induce la translocación de la proteína quinasa $C\epsilon$ (PKC ϵ) a la membrana plasmática, siendo esta proteína capaz de inhibir la actividad del dominio quinasa intracelular del receptor de insulina, con lo que en consecuencia se reduce la fosforilación de IRS2, disminuye la actividad de PI(3)K y disminuye la fosforilación de Akt2, afectándose la capacidad de la insulina para activar la síntesis de glucógeno e inhibir la gluconeogénesis (10, 15). La sobrecarga de ácidos grasos en el hígado se asocia con tasas altas de β -oxidación a nivel mitocondrial e incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, explicándose de esta forma 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. 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 (16), lo que permite establecer una relación directa entre obesidad y RI.

Existen diversos factores de transcripción rédox-sensibles, cuya modulación incide de forma relevante en la patogénesis de la resistencia a la insulina, entre los cuales se

encuentran NF- κ B, JNK, AP1, p38 MAPK, entre otros factores y citoquinas que insensibilizan la vía de transducción de señales comandada por el receptor de insulina.

En un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio se probó que el aceite de rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) que se caracteriza por ser una fuente rica de ácido α -linolénico (ALN), precursor que se bioconvierte en ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), y altos niveles de Vitamina E (alfa y gamma tocoferoles), polifenoles y fitoesteroles, previene el desarrollo de la obesidad y la esteatosis hepática en un modelo murino alimentado con DAG. Los ratones alimentados con DAG y suplementados con aceite de RM presentaron bajos niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α), bajos niveles de expresión de marcadores de oxidación de ácidos grasos como “receptores de activación de proliferación de peroxisomas (PPAR- α) (33%), la enzima acil-coenzima oxidasa (ACOX1) (50%), el factor de transcripción NRF2 (39%), y bajas concentraciones de proteínas HO-1 (68%). Además de un menor porcentaje de grasa visceral (34%) y glucosa en sangre (29%) comparados con ratones DAG no suplementados con RM. El potencial antioxidante de la RM se le atribuye fundamentalmente a sus componentes como el alto contenido de ácido α -linolénico, precursor de EPA y DHA compuestos con comprobados efectos antioxidantes, antiinflamatorios, insulinosensibilizadores y antiesteatóticos. El aceite de RM posee además un alto contenido de alfa y gama tocoferoles, un potente antioxidante, que podría estar jugando un rol importante en el efecto protector que presenta este aceite. Un estudio realizado en nuestro laboratorio demostró que la administración de aceite de RM sin tocoferoles [RM(-)] en ratones DAG no previno la esteatosis hepática, la hipertrofia de los adipocitos, el estrés oxidativo y el estado inflamatorio en los adipocitos; en contraste a estudios anteriores en ratones DAG suplementados con aceite de RM (17). Lo que hace interesante estudiar el rol de los tocoferoles presentes en el aceite de RM de manera independiente. Por tanto, el presente trabajo consiste en evaluar el mecanismo de protección que poseen los alfa y gama tocoferoles, en un modelo murino, alimentado con una DAG y suplementado con aceite vegetal que presenta alto contenido de tocoferoles comerciales en las concentraciones en que se encuentra en el aceite de la RM.

1.3 Tocoferoles (Vitamina E) y su rol como antioxidante

Los tocoferoles son compuestos orgánicos que presentan varios fenoles metilados los que actúan como vitamina E. Existen 8 formas de vitamina E, de los cuales, cuatro de ellos son tocoferoles. Todos presentan un anillo cromanol, un hidroxilo que puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres y una cadena lateral hidrofóbica que permite la penetración del compuesto en las membranas biológicas. La propiedad fundamental de los tocoferoles es proteger los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y de otras estructuras de la peroxidación lipídica, actuando entonces como antioxidante. La forma preferente que se absorbe y se acumula en el cuerpo humano es el alfa tocoferol (18).

Estudios clínicos han demostrado la acción antioxidante de la vitamina E en pacientes obesos con esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Dentro de ellos se encuentra el estudio PIVENS, un estudio multicéntrico, doble ciego, controlado por placebo; el cual se evaluó la mejoría histológica en 247 pacientes no diabéticos con NASH, los cuales recibieron una dosis diaria de 800 UI de vitamina E, el medicamento mostró una mejoría en los niveles de aminotransferasas, reducción en la esteatosis e inflamación lobular comparada al placebo. La resolución de la NASH en los pacientes que recibieron la vitamina E fue atribuido a la disminución del balonamiento hepatocelular. (19)

En otro estudio, Mota y colaboradores en el año 2011, demostraron la prevención de la obesidad y la disminución de los niveles de producción de citocinas en un modelo murino alimentado con una DAG suplementado con tocoferoles y estimulados con lipopolisacáridos (LPS); los investigadores concluyeron que la vitamina E disminuyó la ganancia de peso en los ratones en un 48%, y redujo los niveles de IL-6 en un 61% en el tejido adiposo epidermal, mientras que los de IL-10 se mantuvieron. Estos resultados demostraron la importancia de la vitamina E en controlar el estado inflamatorio de los adipocitos en ratones alimentados con una DAG (20).

En el presente trabajo se evaluará la acción protectora que podría presentar los tocoferoles al daño oxidativo, la esteatosis hepática y obesidad en un modelo murino alimentado con DAG y suplementado con tocoferoles a las concentraciones en que se encuentra en la RM.

2. HIPÓTESIS

Los alfa y gama tocoferoles comerciales a las concentraciones que se encuentran en el aceite de Rosa Mosqueta disminuyen el desarrollo de alteraciones en el tejido adiposo visceral y hepático y parámetros de inflamación y del estrés oxidativo en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto de los alfa y gama tocoferoles en el desarrollo de alteraciones hepáticas y del tejido adiposo visceral, además de parámetros de la inflamación y del estrés oxidativo inducidos por una dieta alta en grasa, en un modelo murino.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Determinar el efecto de la administración oral de una mezcla de alfa y gama tocoferoles comerciales en ratones alimentados con una dieta alta en grasa en:

1. Alteraciones en el tejido adiposo visceral, mediante histología y medición de tamaño de los adipocitos (hipertrofia).
2. Alteraciones en el tejido hepático, mediante histología y contenido total de triglicéridos hepáticos.
3. Cambios en parámetros de inflamación y estrés oxidativo en tejido hepático y adiposo, a través de la determinación de la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa e IL-1 β), una de acción anti-inflamatoria (IL-10), y la expresión del factor de transcripción Nrf₂ mediante PCR en tiempo real.

4. METODOLOGÍA

4.1 Animales de experimentación

Se utilizaron para cada grupo experimental, elegidos aleatoriamente, ratones machos *Mus musculus* de la cepa C57BL/6J (Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con un peso inicial de 10-12 gr., los que recibieron agua *ad libitum* y se mantuvieron con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas bajo temperatura ambiental controlada. Los protocolos de manejo de animales de experimentación fueron aprobados por el comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (código CBA#0639 FMUCH). Se anexa carta de aprobación en la presente memoria.

4.2 Diseño experimental

El modelo consideró cuatro (5) grupos experimentales, los cuales se asignaron de forma aleatoria, cada grupo presentó un n=9, el cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 (DS)^2}{d^2}$$

Intervalo de confianza = 95%

$Z_{\alpha} = 1,96$ (intervalo de confianza de 95%).

$Z_{\beta} = 1,282$ (poder estadístico del 90%).

DS = 1 (desviación estándar máxima).

d: 1,5 (diferencia en el valor promedio de HOMA-IR entre dieta control y alta en grasa).

Los 5 grupos experimentales, separados según dieta y suplementación dietaria fueron los siguientes:

Grupo A: Dieta control (DC)

Grupo B: Dieta control más administración oral de tocoferoles (DC+TF)

Grupo C: Dieta alta en grasa (DAG)

Grupo D: Dieta alta en grasa más administración oral de aceite de RM sin tocoferoles [DAG+RM(-)]

Grupo E: Dieta alta en grasa más administración oral de tocoferoles (DAG+TF)

Los grupos A y B se alimentaron con una dieta normal certificada, 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. Para los grupos C y D se utilizó una dieta alta en grasa certificada, 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 1**). (Research Diet INC. Rodent Diet whit 60% Kcal% fat. Product data D12492. USA).

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

Macronutrientes	Dieta control		Dieta alta en grasa	
	Total % g	Total % kcal	Total % g	Total % kcal
Proteínas	19,2	20	26,2	20
Carbohidratos	67,3	70	26,3	20
Lípidos	4,3	10	34,9	60
Total		100		100
kcal/g	3,85		5,24	
Ingredientes	G	kcal	G	kcal
Proteínas				
Caseína	200	800	200	800
L-Cistina	3	12	3	12
Carbohidratos				
Maicena	315	1260	0	0
Maltodextrina	35	140	125	500
Sacarosa	350	1400	68,8	275,2
Lípidos				
Aceite de soya	25	225	25	225
Manteca de cerdo	20	180	245	2205
Fibra				
Celulosa	50	0	50	0
Vitaminas y minerales				
Mix de minerales S10026	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato de calcio	5,5	0	5,5	0
Citrato de potasio	16,5	0	16,5	0
Mix de vitaminas V10001	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2	0	2	0
Colorantes				
Tartrazina	0,05	0		
Colorante azul			0,05	0
Total	1055,05	4057	773,85	4057

Los grupos suplementados con aceite de RM(-) y TF (0,07 mg/ml de α -tocoferol y 0,35 mg/ml de γ -tocoferol) recibieron dosis orales diarias de 0,01 ml.

El tratamiento se extendió durante 12 semanas. Al finalizar el experimento se obtuvieron las muestras de sangre, hígado y tejido adiposo visceral para su posterior análisis. Para ello, los animales se anestesiaron mediante inyección intramuscular de 200 μ l de una mezcla de 15 μ l de xilacina y 30 μ l de ketamina más 155 μ l de agua destilada. Posterior a la sedación, se realizó punción cardiaca, utilizando agujas tipo tuberculina recubiertas con una solución de EDTA, para obtener alrededor de 800 μ l de sangre. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente a 600 g por 10 minutos y posteriormente se separó el plasma y se congeló a -20°C . Las muestras de hígado y tejido adiposo visceral, se pesaron en balanza analítica y se almacenaron a -80°C . El diseño experimental se muestra en la **figura 1**.

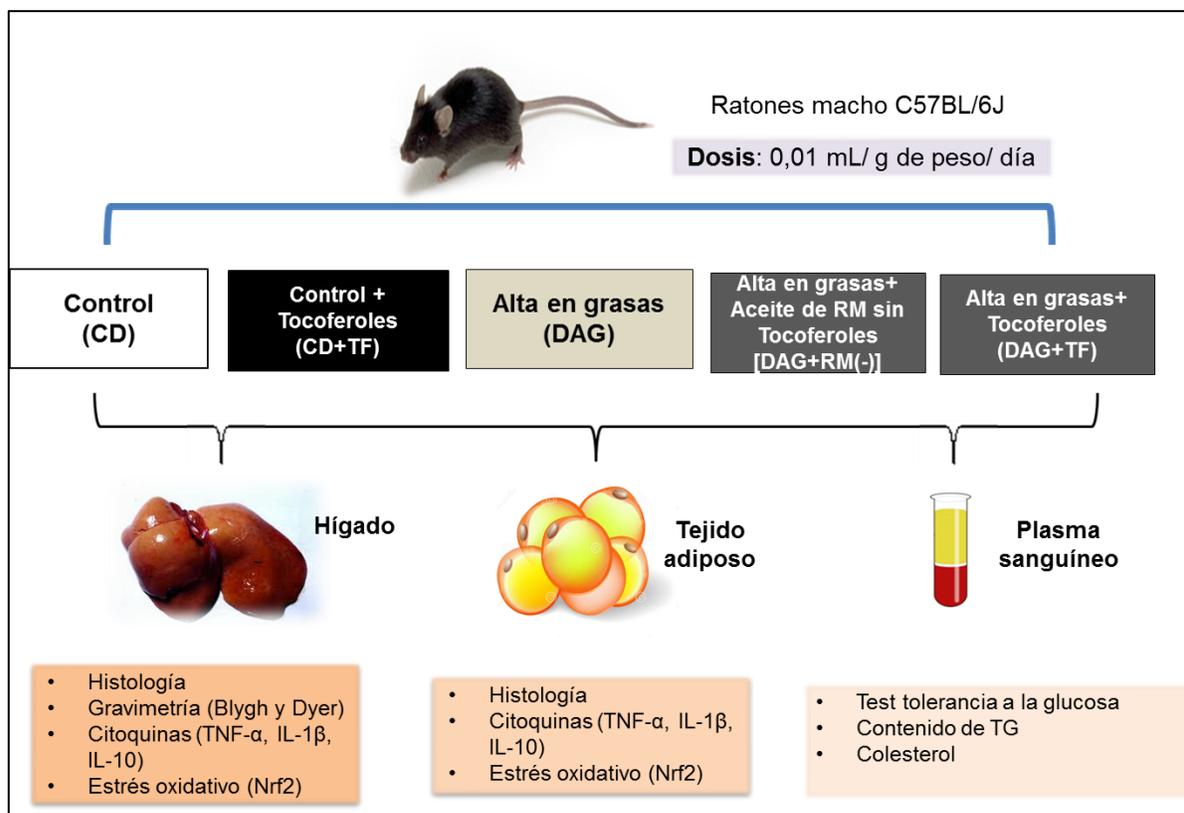


Figura 1 Representación esquemática del diseño experimental utilizada en este estudio

4.3 Determinación de los parámetros generales del estudio

4.3.1 Determinación de la ingesta alimentaria

Durante todo el estudio se evaluó la ingesta alimentaria con el fin de evaluar el nivel de tolerancia a las dietas, así como también determinar posibles variaciones en los niveles de ingesta por parte de los animales de cada grupo.

4.3.2 Determinación de peso corporal, hígado y grasa visceral

Al comenzar el estudio se registraron los pesos corporales de todos los ratones en experimentación. Durante todo el estudio se registró el peso corporal de los ratones diariamente y al finalizar el estudio y después que se sacrificaron los animales se obtuvieron el peso de la grasa visceral e hígado en una balanza analítica. Para la obtención del porcentaje de grasa visceral se calculó la razón tejido adiposo/peso corporal final.

4.3.3 Determinación de glicemia basal, triglicéridos y colesterol total en plasma.

Para la obtención de la glicemia basal, se utilizó el kit comercial Accu-chek active (Roche) que mide glicemia en sangre. Para ello, los ratones en experimentación se mantuvieron en ayuna durante 4-6 horas, luego se obtuvo la muestra de sangre de cada ratón mediante la escisión del extremo de la cola y se colocó una gota de sangre en el centro de la tira reactiva introducida en el monitor de control de glicemia, que arrojó el resultado.

Por otra parte, las mediciones de triglicéridos y colesterol en plasma se realizaron utilizando el kit comercial mediante método enzimático (Wiener) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4 Evaluación de la histología del tejido adiposo y hepático

Se utilizó microscopía óptica para analizar cortes del tejido adiposo e 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. De los cortes de tejido adiposo y hepático se registraron 10 imágenes de cada muestra a 40X. Para la medición del área media de los adipocitos en cortes del tejido adiposo, se utilizó el programa Image J. Mientras que para el conteo de hepatocitos con esteatosis se requirió del análisis de un Tecnólogo Médico.

4.5 Determinación de ácidos grasos hepáticos totales

El contenido de lípidos totales presentes se obtuvo cualitativamente mediante la técnica de Bligh y Dyer modificada (Bligh and Dyer, 1959). Para ello, se homogeneizaron 500 mg de tejido hepático en frío, luego se adicionaron cloroformo y metanol en una relación 2:1 v/v, junto con BHT como antioxidante. Para obtener una mejor separación de las fases orgánica y acuosa, se adicionó $MgCl_2$ 0,5 N. Luego, se centrifugaron las muestras a 1500 g por 5 min. de lo cual se recuperó la fase orgánica (cloroformo), en donde se encuentran solubilizados los lípidos. Esta etapa de recuperación de lípidos se repitió 3 veces. Finalmente, las muestras se concentraron mediante evaporación del cloroformo con nitrógeno gaseoso y se refrigeraron a -20 grados.

4.6 Niveles de expresión en tejido hepático y adiposo de *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL10* y *Nrf2*

La medición de los niveles de expresión de las citoquinas *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL10* y el factor de transcripción *Nrf2* se realizó mediante qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). Para esto, primeramente se realizó la extracción de RNA de las muestras del tejido adiposo y hepático utilizando el kit E.Z.N.A extracción RNA (Omega Bio-tek) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Luego, a partir del aislado de RNA total de las muestras, se procedió a la síntesis de cDNA utilizando el kit SuperScript™ cDNA Synthesis (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente, se realizó la cuantificación relativa de los transcritos de las citoquinas y el factor de transcripción ya mencionados utilizando la sonda Sybr-Green. Los cebadores forward y reverse que se utilizaron son los siguientes: *TNF α* (5'-TATGGCTCAGGGTCCAACCTC-3' y 5'-GCTCCAGTGAATTCGGAAAG-3'), *IL-1 β* (5'-GGGAAACAACAGTGGTCAGG-3' y 5'-GAGCTGTCTGCTCATTCACG-3'), *IL-10* (5'-TGAGGCGCTGTCGTCATCGATTTCTCCC-3' y 5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'), β -actina como gen de referencia (5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' y 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'). Los datos se calcularon como niveles de expresión relativa usando el método comparativo Ct ($\Delta\Delta$ Ct).

4.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar (S.D.). La significancia estadística de los cambios entre los grupos se determinaron por ANOVA unifactorial, junto con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de la ingesta alimentaria

En la tabla 2 se observa la determinación de la ingesta calórica de los grupos de animales en experimentación. No se observan diferencias significativas entre la ingesta alimentaria y la ingesta calórica entre los grupos con dieta alta en grasa

Tabla 2 Ingesta alimentaria a la izquierda e ingesta calórica a la derecha de los grupos en experimentación. Las letras distintas corresponden a las diferencias significativas entre ellos.

Semana	Ingesta alimentaria (g/di)				Semana	Ingesta calórica (kcal/día)			
	Grupos					Grupos			
	CD	CD+TF	HFD	HFD+TF		CD	CD+TF	HFD	HFD+TF
1	2,2±0,3	1,9±0,5	2,3±0,4	2,0±0,3	1	7,0 ± 0,9 a	6,0 ± 1,6 a	12,1 ± 2,1 c	10,5 ± 1,6 b
2	2,4±0,4	2,2±0,4	2,3±0,5	2,2±0,4	2	7,6 ± 1,3 a	7,0 ± 1,3 a	12,6 ± 2,6 b	11,5 ± 2,1 b
3	3,0±0,3	2,4±0,4	2,9±0,1	2,6±0,2	3	9,5 ± 0,9 b	7,6 ± 1,3 a	15,2 ± 0,5 c	13,6 ± 1,0 c
4	3,4±0,4	2,7±0,6	3,0±0,2	2,8±0,5	4	10,7 ± 1,3 b	8,5 ± 1,9 a	15,7 ± 1,0 c	14,7 ± 2,6 c
5	3,5±0,5	3,3±0,3	3,6±0,4	3,2±0,3	5	11,1 ± 1,6 a	10,4 ± 0,9 a	18,9 ± 2,1 b	16,8 ± 1,6 b
6	3,9±0,1	3,6±0,4	3,6±0,2	3,4±0,4	6	12,3 ± 0,3 a	11,3 ± 1,3 a	19,9 ± 1,0 b	17,8 ± 2,1 b
7	4,1±0,6	4,0±0,5	3,7±0,4	3,5±0,2	7	13,0 ± 1,9 a	12,7 ± 1,6 a	20,4 ± 2,1 b	18,3 ± 1,0 b
8	4,4±0,5	4,1±0,3	4,0±0,5	3,7±0,3	8	13,9 ± 1,6 a	13,0 ± 0,9 a	21,0 ± 2,6 b	19,4 ± 1,6 b
9	4,6±0,4	4,3±0,4	4,2±0,6	4,0±0,1	9	14,5 ± 1,3 a	13,6 ± 1,3 a	22,0 ± 3,1 b	21,0 ± 0,5 b
10	4,8±0,3	4,6±0,5	4,5±0,3	4,4±0,2	10	15,2 ± 0,9 a	14,5 ± 1,6 a	23,6 ± 1,6 b	23,1 ± 1,0 b
11	5,0±0,4	4,9±0,3	4,8±0,4	4,6±0,5	11	15,8 ± 1,9 a	15,5 ± 0,9 a	25,2 ± 2,1 b	24,1 ± 2,6 b
12	5,1±0,3	4,9±0,2	5,0±0,3	4,8±0,3	12	16,1 ± 0,9 a	15,5 ± 0,6 a	26,2 ± 1,6 b	25,2 ± 1,6 b

5.2 Parámetros generales: Peso corporal, contenido de grasa visceral, colesterol, triglicéridos y glicemia basal

El presente trabajo abordó principalmente evaluar el rol de los tocoferoles frente a la protección de alteraciones provocadas en la obesidad, tales como hipertrofia de los adipocitos, esteatosis hepática e inflamación. Los tocoferoles se administraron a los animales a las concentraciones en los cuales se encuentran en el aceite de rosa mosqueta, el que ha sido estudiado en nuestro laboratorio y que posee los efectos protectores mencionados anteriormente.

Como se muestra en la tabla 3, para el peso inicial de los animales de todos los grupos no se observan diferencias significativas. Al finalizar el experimento, se registraron los pesos corporales de todos los animales presentando un aumento significativo de los grupos alimentados con DAG con respecto a los alimentados con una DC ($p < 0,05$). Un aumento del 70% para el grupo DAG y para los grupos DAG+RM(-) y DAG+TF de un 50%.

En el registro del peso del tejido adiposo visceral se observó un aumento significativo de los grupos alimentados con DAG con respecto a los alimentados con DC, de un 60% para el grupo DAG, de un 40% para el grupo DAG+RM(-) y un 30% para el grupo DAG+TF aproximadamente. En el caso del peso del hígado no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados del desarrollo de la obesidad y contenido de grasa visceral se muestran en la figura 2C. La razón peso corporal/tejido adiposo mostraron un aumento significativo para los grupos DAG con respecto a los grupos alimentados con DC. Un aumento de un 40% para el grupo DAG y de un 30% para DAG+RM (-). En cambio para el grupo DAG+TF de un 20%.

Tabla 3 Parámetros generales de los grupos experimentales. Los parámetros analizados son: peso corporal (gr) al inicio de los tratamientos; peso corporal al finalizar el tratamiento; peso del tejido adiposo visceral (gr); peso del hígado (gr); razón % tejido adiposo visceral/peso corporal final; colesterol total, triglicéridos y glicemia basal en suero (mg/dl). Los asteriscos indican las diferencias significativas (ANOVA, Test Neuman Keuls, $p < 0,005$), $n=9$. * indica diferencias significativas con los controles y valores con 2 y 3 asteriscos. ** indica diferencias significativas con los controles y valores con 1 y 3 asteriscos; *** indica diferencias significativas con los controles y valores con 1 y 2 asteriscos.

Parámetros	DC	DC+TF	DAG	DAG+RM(-)	DAG+TF
Peso corporal inicial (gr)	15,2 ± 0,6	12,7 ± 1,7	14,3 ± 0,9	13,5 ± 2,1	11,9 ± 0,8
Peso corporal final (gr)	26,9 ± 1,2	23,8 ± 0,9	38,5 ± 2,6***	32,4 ± 2,9*	32,2 ± 5,1*
Peso tejido adiposo visceral (gr)	0,4 ± 0,03	0,3 ± 0,02	2,2 ± 0,2***	1,3 ± 0,2***	1,2 ± 0,4*
Peso hígado (gr)	0,85 ± 0,03	0,94 ± 0,2	1,08 ± 0,2	0,89 ± 0,1	1,05 ± 0,1
%Tejido adiposo/peso corporal final	1,46 ± 0,1	1,45 ± 0,03	5,49 ± 0,8***	5,03 ± 0,6***	3,46 ± 0,4*
Colesterol total (mg/dl)	121 ± 12	129 ± 10	172 ± 10*	187 ± 12*	209 ± 12*
Triglicéridos (mg/dl)	66,8 ± 2,9	64,04 ± 18	145,3 ± 10**	51,8 ± 5,6	64,9 ± 12
Glicemia basal (mg/dl)	152 ± 6,8	198,7 ± 16	183,02 ± 12	196 ± 12	175,7 ± 16,2

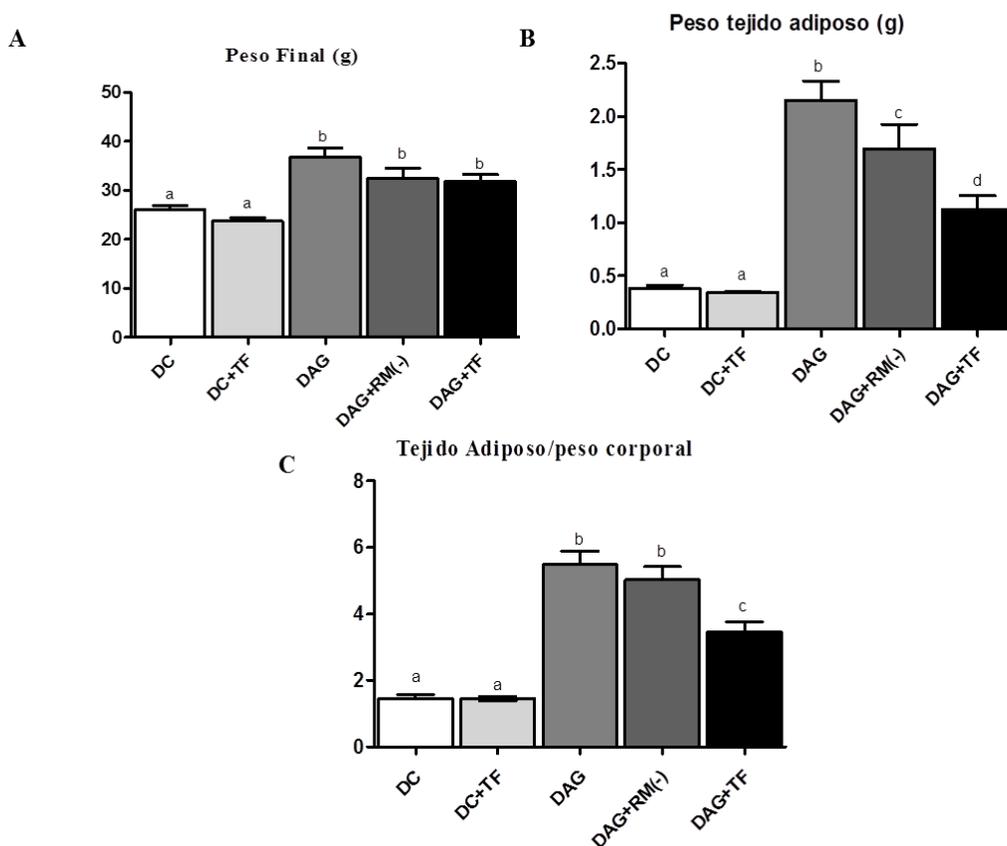


Figura 2. Peso corporal y contenido de grasa visceral. A. Peso corporal de los animales a las 12 semanas de tratamiento. B. Peso del tejido adiposo de los animales al finalizar el tratamiento C. Relación tejido adiposo/peso corporal de los animales al término del tratamiento. Las barras representan el promedio \pm ESM para 9 animales por grupo experimental. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls). Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre los grupos y letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre ellos.

5.3 Determinación de los tamaños de los adipocitos

El tamaño de los adipocitos como se observa en la figura 3, presentaron diferencias significativas de los grupos alimentados con DAG con respecto a los grupos alimentados con DC; los grupos DAG y DAG+RM(-) presentaron adipocitos más grandes (28% y 30% más que los controles respectivamente) y con una morfología hipertrófica comparados a los grupos con dieta control. En cambio el grupo DAG+TF presentó una diferencia significativa aumentada de un 20% con respecto a los controles y se observó una arquitectura de los adipocitos similar a los grupos DC (Fig. 3 y 4).

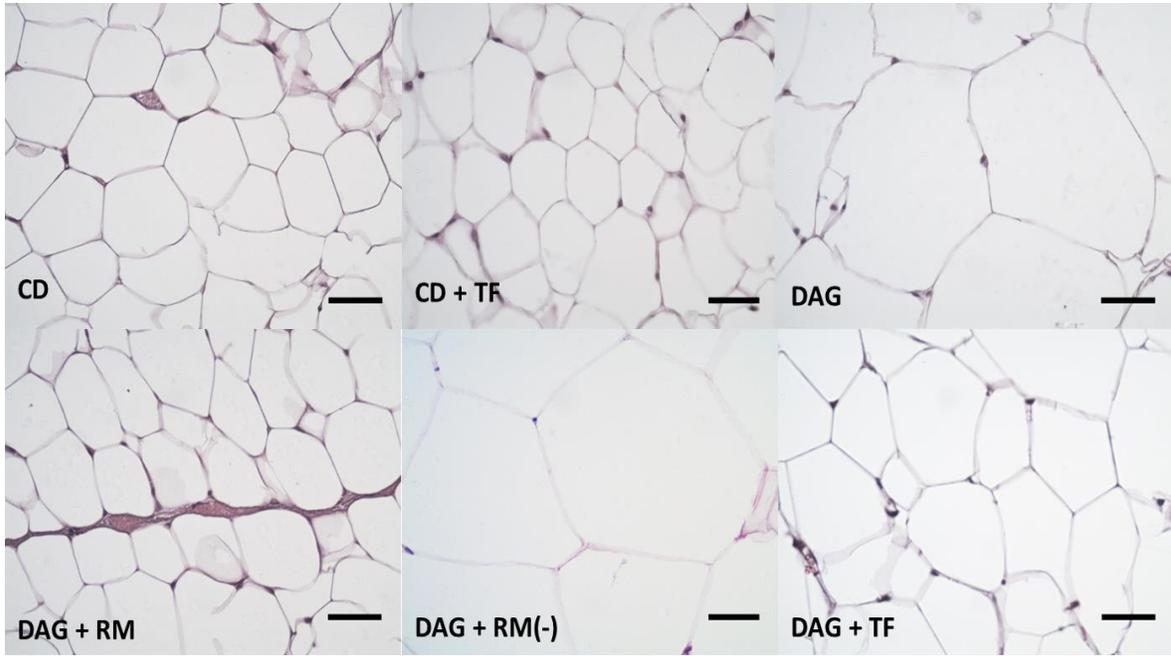


Figura 3. Histología del tejido adiposo. Muestras de cortes de tejido adiposo fijados en formalina y teñidos con hematoxilina-eosina (40X) de todos los grupos en experimentación.

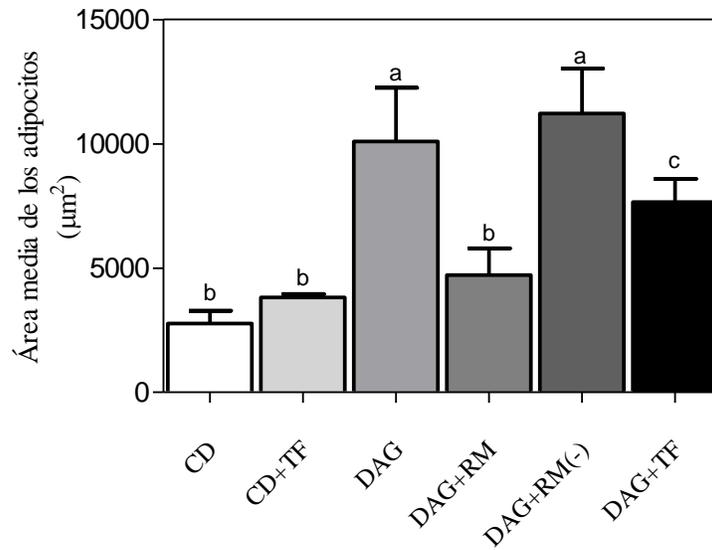


Figura 4. Área media de los adipocitos. Gráfico que muestra el área de los adipocitos de todos los grupos en experimentación. El cálculo del área se realizó con las imágenes de los cortes de tejido adiposo con el programa Image J (7píxeles/micrón). Las barras representan el promedio \pm ESM para 9 animales por grupo experimental. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls). Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre los grupos y letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre ellos.

5.4 Determinación de esteatosis hepática mediante histología y contenido total de ácidos grasos hepáticos

En este estudio se evaluó mediante histología del hígado de los grupos de animales la acumulación de gotas lipídicas en los hepatocitos. Como se observa en la figura 5, tanto en los grupos DAG y DAG+RM (-) se observó esteatosis macro y microvesicular que representan las gotas lipídicas en los citoplasmas de los hepatocitos determinadas por microscopía óptica. El grupo DAG+TF en contraparte presentó una disminución significativa de gotas lipídicas comparadas a DAG y a DAG+RM(-) y no presentaron diferencias significativas con los grupos DC y DC+TF. El conteo de gotas lipídicas/células de cada grupo experimental se representan en el gráfico (Fig. 6A).

El porcentaje de grasa acumulado en el hígado de los animales se midió mediante gravimetría de Bligh and Dyer (separación con cloroformo). Como se observa en la figura 6B los grupos DAG y DAG +RM(-) presentaron un aumento significativo con respecto a los grupos alimentados con DC. Mientras tanto que los grupos DAG+TF no presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos alimentados con DC.

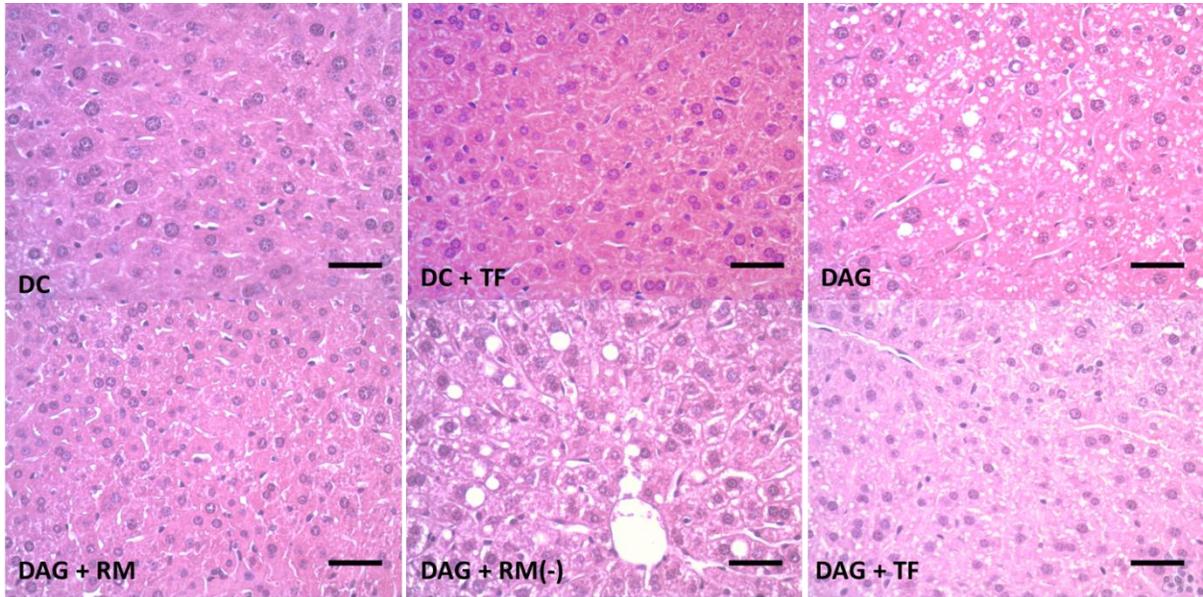


Figura 5. Histología hepática de los grupos de animales en experimentación. Cortes de hígado fijados con formalina y teñidos con hematoxilina-eosina (40X) representando a todos los grupos experimentales. Los focos de vesículas lipídicas intrahepatocelular se observan de formas redondeadas y blancas.

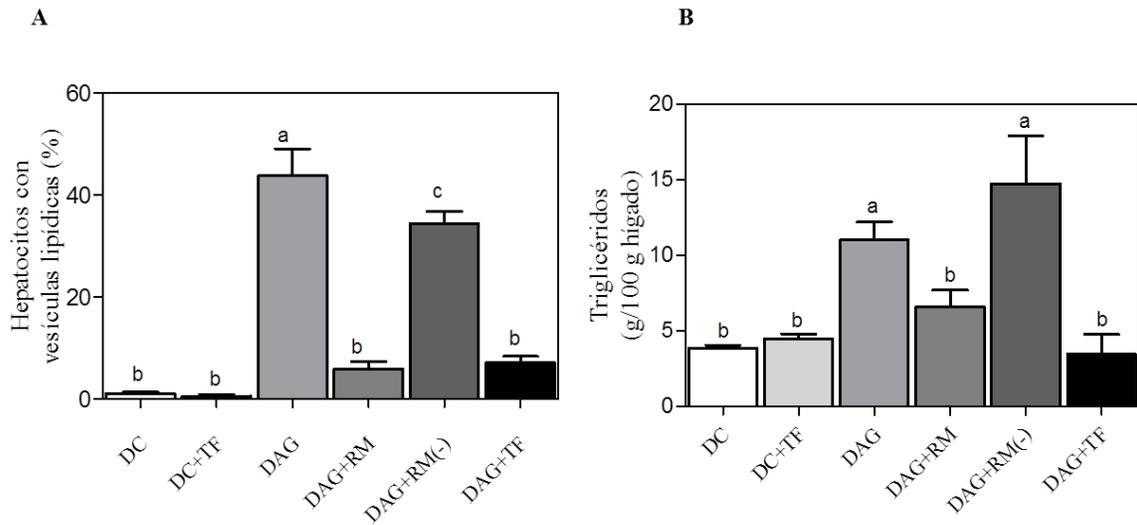


Figura 6. Contenido de grasa en el tejido hepático. **A** Gráfico que muestra el porcentaje de hepatocitos con vesículas lipídicas encontradas en los cortes de hígado de todos los grupos de animales en experimentación. **B** Porcentaje de triglicéridos en 100 gramos de hígado. Gráfico que muestra el porcentaje de grasa en los hígados de los animales de todos los grupos en experimentación mediante la técnica de gravimetría por extracción Bligh and Dyer. Las barras representan el promedio \pm ESM para 9 animales por grupo experimental. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls). Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre los grupos y letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre ellos.

5.5 Determinación de los parámetros de inflamación, a través de la determinación de la expresión de citoquinas plasmáticas (TNF-alfa, IL-1 β , IL-10) y el factor de transcripción Nrf2 como parámetro de estrés oxidativo

En esta tesis, medimos los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL1 β y una de acción antiinflamatoria IL10 por qPCR, tanto en tejido hepático (Figura 7) como en tejido adiposo visceral (Figura 8). Como podemos observar en los gráficos, se encontró un aumento significativo en la expresión de las tres citoquinas en el grupo DAG+RM(-) comparado a los demás grupos. Se observa además, una disminución de la expresión de las citoquinas en el grupo DAG+TF comparados al grupo DAG. La expresión se normalizó con β -actina. ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls).

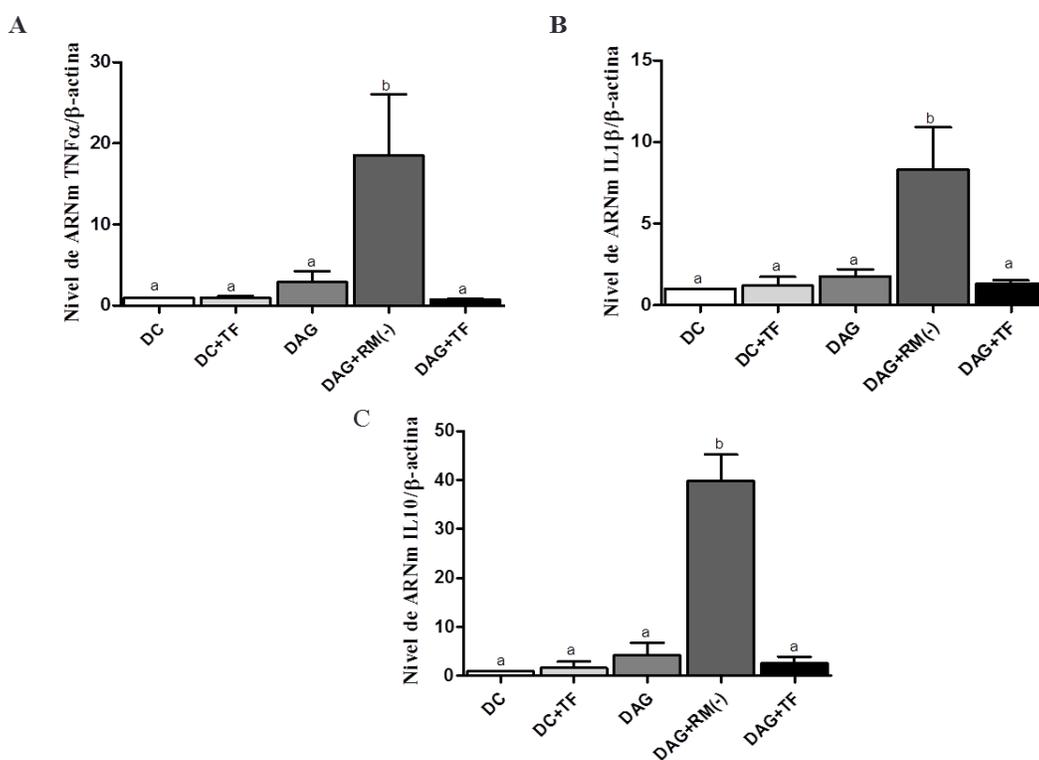


Figura 7. Nivel de expresión de citoquinas en tejido hepático mediante qPCR. A Nivel del ARNm de TNF alfa B. Nivel de ARNm de IL1 β . C. Nivel de ARNm de IL10. La expresión se normalizó con β -actina. Las barras representan el promedio \pm ESM para 9 animales por grupo experimental. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls). Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre los grupos y letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre ellos.

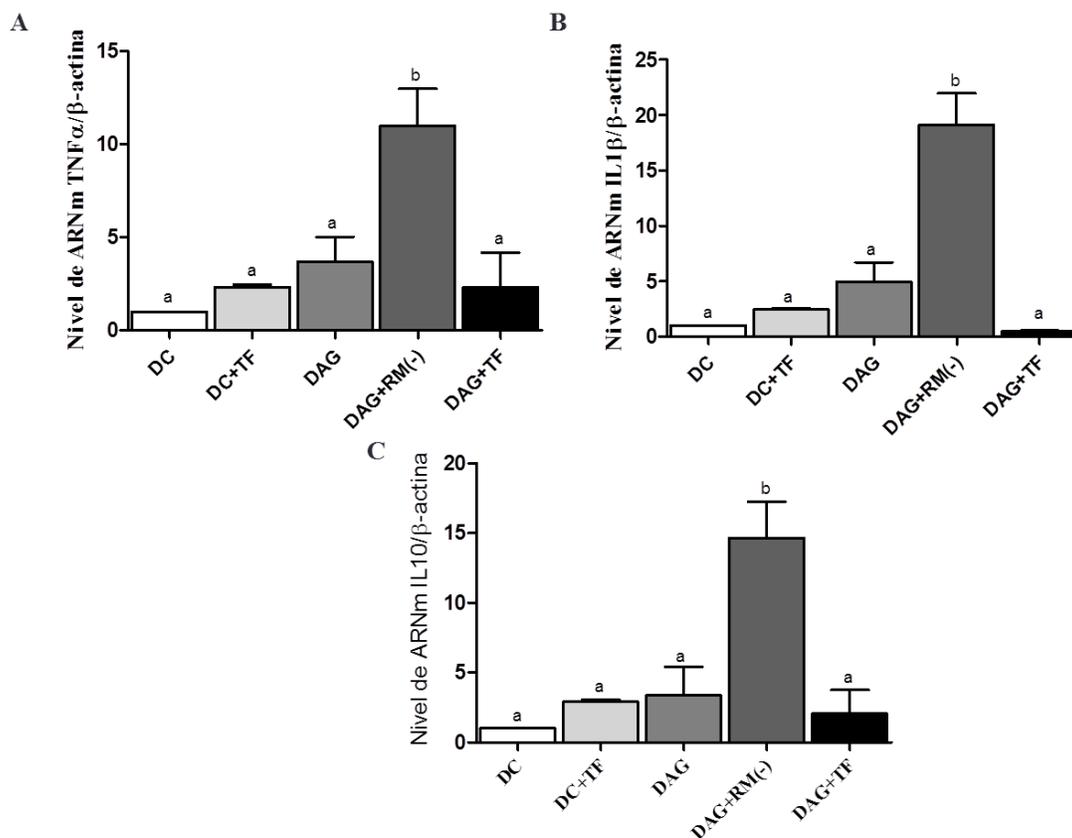


Figura 8. Nivel de expresión de citoquinas en tejido adiposo mediante qPCR. A. Nivel del ARNm de TNF alfa. B. Nivel de ARNm de IL1β C. Nivel de ARNm de IL10. La expresión se normalizó con β-actina. Las barras representan el promedio +/- ESM para 9 animales por grupo experimental. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls). Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre los grupos y letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre ellos

Por otra parte se midió los niveles de expresión del factor de transcripción Nrf2 como parámetro de estrés oxidativo. En la figura 9A se observa un aumento significativo en la expresión de Nrf2, en el tejido hepático, en el grupo DAG+RM(-) comparado a los demás grupos. En el tejido adiposo se encontró una disminución significativa en la expresión de Nrf2 en el grupo DAG+TF comparados a los demás grupos. (figura 9B).

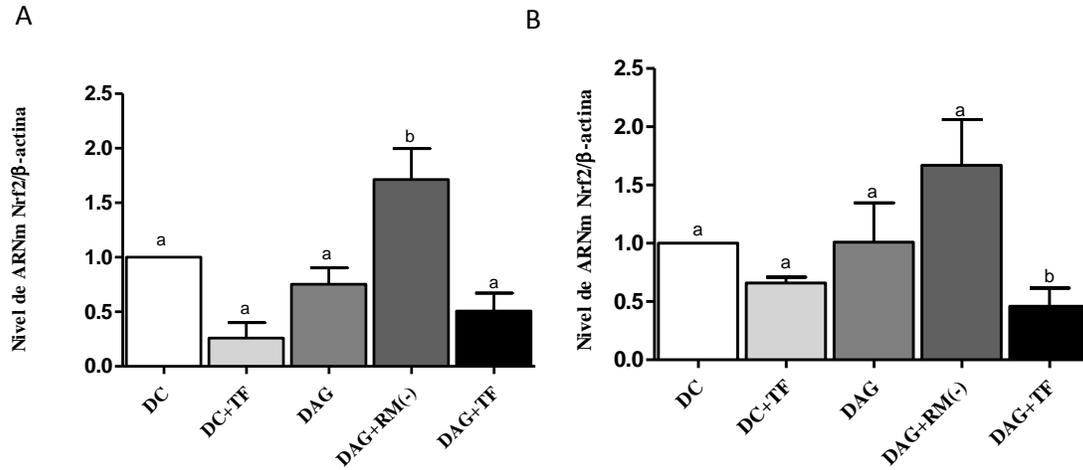


Figura 9. Nivel de expresión hepática, RNAm de Nrf2 mediante qPCR. A. Gráfico que muestra el nivel de expresión del factor de transcripción Nrf2 en tejido hepático **B.** Nivel de expresión de Nrf2 en tejido adiposo. La expresión se normalizó con β -actina. Las barras representan el promedio \pm ESM para 9 animales por grupo experimental. Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ($p < 0,005$, ANOVA Unifactorial, Test de Neuman Keuls). Letras iguales representan que no existen diferencias significativas entre los grupos y letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,005$) entre ellos.

6. DISCUSIÓN

En estudios anteriores en nuestro laboratorio se demostró que la administración de aceite de RM a ratones alimentados con DAG previno el desarrollo de alteraciones en el tejido adiposo visceral y hepático (hipertrofia en los adipocitos y esteatosis hepática respectivamente), junto con la reducción de expresión de marcadores pro-lipogénicos y activación de Nrf2 y factores de transcripción pro-lipolíticos (17, 23, 24, 25).

En este trabajo de tesis se estudió el rol de una mezcla de α y γ -tocoferoles en una proporción 1:5, como se encuentran en el aceite de RM, en la prevención de alteraciones que ocurren en la obesidad y las comorbilidades que conllevan esta patología como la hipertrofia de los adipocitos en el tejido adiposo visceral, esteatosis hepática, e inflamación que forman parte del síndrome metabólico.

En este estudio se demostró que la suplementación de TF a ratones alimentados con DAG disminuyó la acumulación de grasa visceral (tabla 1 y figura 1), la hipertrofia de los adipocitos (figura 2), la esteatosis hepática (figura 5), y el estado pro-inflamatorio (figura 7 y 8).

Y por contraparte la administración de RM(-) no tuvo efectos preventivos a tales eventos. Además de no tener efectos preventivos el grupo DAG+RM(-), sorprendentemente presentó alteraciones del tejido adiposo e hígados comparados a DAG y la expresión de citoquinas pro y anti-inflamatorias aumentadas significativamente a todos los grupos. Este hallazgo, nos estaría indicando que los componentes del aceite de RM que se encuentran en gran proporción (DHA y EPA) se estarían lipoperoxidando provocando el aumento de estas alteraciones. Se ha reportado estudios en humanos inconsistentes a la suplementación de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) con respecto a la peroxidación lipídica; que este no cambia (26, 27), incrementa (28, 29) o decrece (30, 31). En otro estudio, DHA protegió frente a la peroxidación lipídica dependiendo de la dosis (32, 33). Del mismo modo, estudios *in vitro* también se han encontrado inconsistencias, unos reporta aumentos de la lipoperoxidación y en otros que disminuye (34).

Nuestros estudios anteriores, promueven un rol importante a DHA y EPA en la prevención de las alteraciones provocadas con una DAG, ya que la suplementación de aceite de RM presenta una mejor prevención que solo usando como suplemento los TF, lo que nos estaría

indicando que los TF tendrían un rol fundamental en la prevención y un componente infaltable en la dieta, por la protección que les confiere a los ácidos grasos poliinsaturados (DHA y EPA) frente a la peroxidación lipídica; por tanto, en conjunto estarían participando en esta prevención.

La prevención de los eventos relacionados con el síndrome metabólico por parte de los tocoferoles se puede explicar por su acción antioxidante frente a los radicales libres como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Así como también de los efectos biológicos que poseen los metabolitos de cadena larga (LCM) derivadas de la vitamina E mediante citocromo P450 y tocoferil fosfato. Estudios demuestran que estos metabolitos son señalizadores y reguladores génicos de rutas asociados al metabolismo lipídico y a respuestas inflamatorias e inmunes (35, 36, 37).

Además, otros estudios demuestran que los tocoferoles puede prevenir la peroxidación lipídica y hepatotoxicidad frente a la exposición de agentes generadores de radicales libres. Lo que explicaría la no protección del aceite de RM sin tocoferoles. Se ha documentado que el α -tocoferol, el que se encuentra en mayor contenido en los tejidos, son los que poseen mayor capacidad antioxidante que otras formas de vitamina E (37), pero γ -tocoferoles es superior en destoxificación de componentes electrófilos como NO_2 y peroxinitritos por la formación de 5-nitro- γ -tocoferol (38,39). En sistemas biológicos *ex vivo* se ha demostrado que γ -tocoferol disminuye la generación de anión superóxido, la lipoperoxidación y la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en ratas trombóticas (40). En otro estudio se demostró que el pre-tratamiento de aceite de argan (rico en α y γ -tocoferoles) en células musculares de ratones L6 alimentadas con glucosa durante 5 semanas previno la hipertensión arterial, la hiperglicemia, RI, disminuyó la producción de O_2^- y la actividad de NADPH oxidasa (41).

En un estado inflamatorio producto de la obesidad, los adipocitos de gran tamaño poseen una mayor síntesis y liberación de productos (adipoquinas) que deterioran el metabolismo lipídico y glucídico, tener efectos pro-inflamatorios, etc. Existen muchas adipoquinas cuya secreción se encuentra aumentada en los adipocitos hipertróficos, entre las que destacan las citoquinas pro-inflamatorias y quemoquinas (22). En este estudio comprobamos que la mezcla de α y γ -tocoferoles previno la inflamación y este particular hallazgo se observó en los niveles de expresión aumentadas de las citoquinas proinflamatorias, tanto en el tejido

hepático como en el tejido adiposo. Pero también se observó un aumento significativo de la citoquina IL-10.

IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que desempeña un papel importante en la regulación del sistema inmune, que conduce a disminuir las citocinas, reduce la expresión del factor tisular, inhibe la metaloproteínasa degradadora de matriz y promueve el cambio fenotípico de linfocitos al fenotipo Th2 (42). Estudios en pacientes obesos con diabetes mellitis tipo 2 (DM2) mostró un aumento de TNF- α junto con un aumento de IL-10 (42). Otros estudios en ratones alimentados con DAG también mostraron un aumento de IL-10 a las 40 semanas de tratamiento y otro estudio a la semana 8, junto con un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β (43, 44). Estos resultados demuestran que IL-10 aumenta su expresión como resultado de una respuesta compensatoria contra las elevaciones de las citoquinas pro-inflamatorias.

La disminución de la expresión de las citoquinas en el grupo suplementado con TF demuestran las propiedades anti-inflamatorias de los tocoferoles, no precisamente por su acción directa como antioxidante sino también de la modulación de blancos moleculares ligados a los procesos inflamatorios (45). Se ha reportado que γ -tocoferol disminuye la producción de ácido araquidónico (AA)-derivado de prostaglandinas E₂ (PGE₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄) regulando río abajo la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y 5-lipoxigenasa (5-LOX) (34). Además, se ha comprobado la inhibición de la fosforilación de Akt por α -tocoferoles que inhibió la proliferación de células inflamatorias por inhibición de ERK 1/2, p38 MAPK y la unión de Akt a NF- κ B (46, 47), que es un importante regulador que aumenta la expresión de citoquinas inflamatorias, tales como IL-6, IL-1 β y TNF- α y moléculas de adhesión por estímulo inflamatorio (45).

7. CONCLUSIÓN

Se concluye que:

La suplementación alimentaria de una mezcla de alfa y gama tocoferoles (1:5) disminuyó significativamente la hipertrofia del tejido adiposo visceral, la esteatosis hepática, y marcadores de la inflamación en ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

En resumen, se sugiere que la administración oral de tocoferoles tendría efectos benéficos en el tratamiento de alteraciones tanto en el tejido adiposo como en el hepático producidas por una dieta alta grasa. Y como prospecto futuro, sería interesante abordar estudios para dilucidar los mecanismos de acción de los tocoferoles y/o omega 3 presentes en el aceite de rosa mosqueta.

REFERENCIAS

1. Capurso C, Capurso A. (2012) From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascular pharmacology* 57(2-4):91-7.
2. Cabieses B, Espinoza M, Zitko P. (2011) ¿ Como enfrentar el aumento de conductas individuales de riesgo para la salud en Chile? *Revista médica de Chile* 139(5):685-7.
3. Aroor AR, DeMarco VG (2014) Oxidative stress and obesity: the chicken or the egg? *Diabetes* 63(7):2216-8.
4. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International journal of molecular sciences* 12(5):3117-32.
5. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. (2008) Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57(8):1071-7.
6. Acosta García E. (2012) Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina; Obesity, adipose tissue and insulin resistance; Obesidade, tecido adiposo e resistência à insulina. *Acta bioquím clín latinoam.* 46(2):183-94.
7. Huh J, Park Y, Ham M, Kim J. (2014) Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Molecules and cells.*
8. Medina-Gómez G, Vidal-Puig A. (2009) Tejido adiposo como diana terapéutica en la obesidad. *Endocrinología y nutrición.* 56(8):404-11.
9. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. (2009) Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 14(12):1484-95.
10. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. (2014) The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 510(7503):84-91.
11. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Manan D, et al. (2014) N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR-alpha upregulation and NF-kappaB DNA binding abrogation. *Molecular nutrition & food research.* 58(6):1333-41.
12. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 9(5):367-77.
13. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella M, Marchesini G. (2010) Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current pharmaceutical design.* 16(17):1941-51.
14. 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 Radical Biology and Medicine.* 38(9):1221-30.
15. Samuel VT, Liu Z-X, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, et al. (2007) Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation.* 117(3):739-45.
16. Hellemans K, Kerckhofs K, Hannaert JC, Martens G, Van Veldhoven P, Pipeleers D. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor α -retinoid X receptor agonists induce beta-cell protection against palmitate toxicity. *FEBS journal.* 274(23):6094-105.

17. Tapia G, Silva D, Romero N, Pettinelli P, Dossi C, de Miguel M, Gonzalez D. (2018) Role of dietary α - and γ -tocopherol from Rosa mosqueta oil in the prevention of alterations induced by high-fat diet in a murine model. *Nutrition*. (53) 1-8.
18. Jack Challem, Melissa Block. (2008) *Antioxidantes naturales*, Ediciones Nowtilus S.L. 69.
19. Jhonathan Ferney Vélez M., Gustavo Amador Crespo H., Juan Carlos Restrepo G. MD. Esp. MSc. PhD. (2014) Tratamiento con vitamina E en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica. *Rev Col Gastroenterol* 29 no.4.
20. Min-YuChung¹Steven F.Yeung¹Hea Jin Park¹Jeff S.Volekb Richard S.Brunoa. (2010) Dietary α - and γ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related responses in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 12(21):1200-1206.
21. Jeffrey D. Browning¹ and Jay D. Horton. (2004) Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of Clinical Investigation* 114 no.2.
22. Carrasco F. Galgani JE. Reyes M. (2013) Síndrome de resistencia a la insulina. Estudio y manejo. *Rev clinica Las Condes* 24(5) 827-837.
23. González-Mañán D, D'Espessailles A, Dossi CG, San Martín M, Mancilla RA, Tapia GS. (2017) Rosa Mosqueta Oil Prevents Oxidative Stress and Inflammation through the Upregulation of PPAR- α and NRF2 in C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet. *The Journal of Nutrition*. 147:579-88.
24. Dossi CG, Cadagan C, San Martín M, Espinosa A, González-Mañán D, Silva D, et al. (2017) Effects of rosa mosqueta oil supplementation in lipogenic markers associated with prevention of liver steatosis. *Food & Function*. 8:832-41.
25. Despessailles A, Dossi C, Espinosa A, González-Mañán D, Tapia G. (2015) Dietary Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oil prevents high diet-induced hepatic steatosis in mice. *Food & Function*.
26. Shoji H, Franke C, Campoy C, Rivero M, Demmelmair H, Koletzko B. (2006) Effect de docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid supplementation on oxidative stress levels during pregnancy. *Free Radic Res*. 40: 379-384.
27. Heather C, Hanwell C, Kay W, Lampe B, Holub A. (2009) Acute fish oil and soy isoflavone supplementation increase postprandial serum (n-3) polyunsaturated fatty acids and isoflavones but do not affect triacylglycerols or biomarkers of oxidative stress in overweight and obese hypertriglyceridemic men. *The Journal of Nutrition*.139: 1128–1134.
28. Harats D, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Schwartz R, Berry M, Stein O, Stein Y. (1991) Fish oil ingestion in smokers and nonsmokers enhances peroxidation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis*. 90:127-139.
29. Egert S, Somoza V, Kannenberg F, Fobker M, Krome K, Erbersdobler H & Wahrburg U. (2007) Influence of three rapeseed oil-rich diets, fortified with α -linolenic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid on the composition and oxidizability of low-density lipoproteins: results of a controlled study in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 61:314-325.
30. Trevor A, David W, Valerie B, Kevin D, Jennifer H, Lawrence J, Ian B. (1999) Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non—insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 48: 1402-1408.
31. You Jung Kim Hae Young Chung. (2007) Antioxidative and anti-Inflammatory actions of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in renal epithelial cells and macrophages. *Journal of Medicinal Food*. 10: 2.

32. Catherine C, Romain C, Nicolas G, Michel G, Martin L, Evelyn V, Michel L. (2010) Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis*. 208: 467-472.
33. Nicolas G, Emilie C, Martine L, Catherine C, Michel L, and Evelyne V. (2009) Increasing intakes of the long-chain ω -3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *The FASEB Journal*. 23: 2909-2916.
34. Shaliba B, Madeleine D, Zury D, Aurora G, Georges N, Michel L, Annie France P. (1999) Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*. 57: 1021-1030.
35. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28:412-9.
36. Bligh EG, Dyer WJ. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 37:911-7.
37. Francesco Gallia, Angelo Azzib, Marc Birringerc, Joan M. Cook-Millsd, Manfred Eggersdorfer, Jan Frankf, Gabriele Crucianig, Stefan Lorkowskih,i, Nesrin Kartal Özerj, (2017) Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*. 102: 16–36.
38. Jiang Q. (2014) Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and 414 anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*. 72:76-416 90.
39. Chung M-Y, Yeung SF, Park HJ, Volek JS, Bruno RS. (2010) Dietary α - and γ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related responses in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 21:1200-6.
40. Saldeen T, Li D, Mehta JL. (1999) Differential effects of α - and γ -tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*. 34:1208-15.
41. Midaoui A, Haddad Y, Couture R. (2016) Beneficial effects of argan oil on blood pressure, insulin resistance, and oxidative stress in rat. *Nutrition*. 32:1132-7.
42. Kathryn F, Nathalia T, Adriana A, Fernanda M, Valéria C, Karina B. (2017) IL-6, TNF- α , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. 61: 438-446.
43. Roel Heijden¹, Fareeba S, Martine C, Pascal H, Danny K, Niels J, Nanda G, Sameh A, Alain de Bruin, Marten H, Robert K, Debby P, and Peter H. (2015) High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *AGING*. 7: 256-267.
44. Marina C, Zelia M, Milene H, Frederico M, Vanessa P, Ana F, Andrezza F, Denise C, Danielle G, Mauro M and Adaliene F. (2013) Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*. 21:396-401.
45. Reiter E, Jiang Q, Christen S. (2007) Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Molecular aspects of medicine*. 28:668-91.
46. Jiang Q, Ames BN. (2003) γ -Tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *The FASEB Journal*. 17:816-22.

- 47.** Kempná P, Reiter E, Arock M, Azzi A, Zingg J-M. (2004) Inhibition of HMC-1 Mast Cell Proliferation by Vitamin E Involvement of the protein kinase B pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 279:50700-9.
- 48.** Egger T, Schuligoi R, Wintersperger A, Amann R, Malle E, Sattler W. (2003) Vitamin E (alpha tocopherol) attenuates cyclo-oxygenase 2 transcription and synthesis in immortalized murine BV-2 microglia. *Biochemical Journal*. 370:459-67.

