

“Efecto de la suplementación con ácido docosahexaenoico más hidroxitirosol sobre la activación de PPAR y Nrf2 en la reducción de hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en grasa en ratón”.

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

Tesista: Sandra Anakaren Soto Alarcón

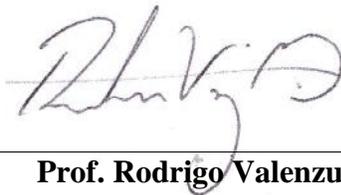
Director de Tesis: Prof. Rodrigo Wladimir Valenzuela Báez MSc. PhD.

Diciembre de 2017

Santiago - Chile

AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Proyecto de Tesis por la estudiante Sandra Anakaren Soto Alarcón ha sido revisado y aprobado por mí como Director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designará el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



Prof. Rodrigo Valenzuela

Santiago de Chile, 18 de diciembre de 2017

ii. Comisión de tesis

Profesor Omar Hugo Porras Espinoza, PhD.

Profesora Cecilia Rojas Baechler, PhD.

Profesora Dra. Pamela Rojas, Msc.

Dedicado a mis padres Sandra y Enrique por entregarme amor y apoyo incondicional, a mi hermano Sebastián por ser mi mejor amigo y a mi familia Jacqueline, Rodrigo, Elizabeth, Cinthia, Martina, Ricardo y Nicolás, por estar siempre junto a mi.

iv. Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar al profesor Rodrigo Valenzuela, por su apoyo y enseñanzas, por su motivación constante a continuar con mi carrera académica y por su comprensión frente a momentos difíciles. Gracias a cada una de las personas que aportaron en el desarrollo de esta tesis, desde el lavado de material, hasta la enseñanza de técnicas de laboratorio desconocidas en un principio para mi.

Un agradecimiento especial para Alicia Corbari, Karla Vásquez, Patricio Muñoz, Romina Vargas, Sra. Rosa y Profesor Luis Videla. Por último gracias a los miembros de mi comisión y al Profesor Fernando Pizarro, por siempre responder a mis miles de interrogantes en este largo proceso de aprendizaje.

Mi mas profundo agradecimiento a todos los que colaboraron en esta aventura, en especial a mis tíos Christian Gyhra, Alberto Gyhra y Maria Imschenetzky, por hacerme sentir cómoda y ayudarme en cada uno de los pasos que he seguido desde que elegí cursar el magíster.

v. Índice de contenidos

2. CUERPO PRELIMINAR

ii. Comisión de tesis.	3
iii. Dedicatoria.	4
iv. Agradecimientos.	5
v. Índice de contenidos.	6
vi. Índice de tablas.	8
vii. Índice de figuras.	9
viii. Índice de anexos.	10
ix. Lista de abreviaturas.	11
3. RESUMEN	12
4. ABSTRACT	13
5. MARCO TEORICO	14
5.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA).	14
5.2. Influencia de la dieta en la patogenia de la EHGNA.	14
5.3. Alteraciones metabólicas en la EHGNA.	15
5.4. AGPICL n-3, DHA y beneficios para la salud general.	15
5.5. DHA y beneficios para la salud hepática.	16
5.6. Hidroxitirosol (HT): Efectos beneficiosos para la salud general y hepática.	18
5.7. Receptor que estimula la proliferación de peroxisomas α (PPAR α).	18
5.8. Factor nuclear derivado de eritroides 2 (Nrf2).	19
5.9. Formulación general del proyecto.	20
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1. Definición de la muestra.	22
7.2. Definición del diseño de investigación.	22
7.3. Definición de variables.	23
7.4. Procedimientos y técnicas a utilizar.	25
7.5. Elaboración del plan de análisis y técnicas estadísticas de análisis.	30
8. RESULTADOS	32
A. Descripción de la muestra	32
8.1. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el peso corporal, peso del hígado y del tejido adiposo de los distintos grupos experimentales.	32
8.2. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la ingesta alimentaria de los distintos grupos experimentales.	32
B. Objetivo a	35
8.3. Efecto de la suplementación con DHA más HT en parámetros de esteatosis y daño hepático de los distintos grupos experimentales.	35

8.4. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el contenido de lípidos hepáticos de los distintos grupos experimentales.	37
C. Objetivo b	43
8.5. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α de los distintos grupos experimentales.	43
8.6. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el porcentaje de actividad de unión al ADN de Nrf2 de los distintos grupos experimentales.	43
D. Objetivo c	45
8.7. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica hepática (ARNm) de PPAR α y Nrf2 de los distintos grupos experimentales.	45
E. Objetivo d	45
8.8 Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica hepática (ARNm) de CPT1a y ACOX1 de los distintos grupos experimentales.	45
8.9. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica hepática (ARNm) de Gclc y GSTa3 de los distintos grupos experimentales.	48
F. Objetivo e	50
8.10. Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles hepáticos de RD1 de los distintos grupos experimentales.	50
G. Objetivo f	51
8.11. Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles séricos y la expresión génica hepática (ARNm) de FGF-21 de los distintos grupos experimentales.	51
H. Objetivo g	53
8.12. Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles hepáticos de colesterol total y la expresión génica hepática (ARNm) de HMGCoA Reductasa de los distintos grupos experimentales.	53
I. Correlaciones	54
9. DISCUSIÓN	56
10. CONCLUSIONES	69
11. REFERENCIAS	70
12. ANEXOS	78

vi. Índice de tablas

Tabla 1	Grupos experimentales.	24
Tabla 2	Variables interviniente e independiente.	24
Tabla 3	Variables descriptivas.	24
Tabla 4	Variables dependientes.	24
Tabla 5	Información nutricional dieta control y dieta alta en grasa.	27
Tabla 6	Perfil de ácidos grasos dieta control y dieta alta en grasa.	28
Tabla 7	Secuencias forward y reverse para los distintos transcritos.	31
Tabla 8	Características generales de los grupos experimentales.	35
Tabla 9	Perfil de ácidos grasos hepáticos destacados por grupos experimental.	43

vii. Índice de figuras

Figura 1	A	Ganancia de peso a las 12 semanas de intervención (g).	34
	B	Ganancia de tejido adiposo a las 12 semanas de intervención (g).	34
Figura 2	A	Histología hepática 40X.	37
	B	Score de esteatosis.	37
Figura 3	A	Aspartato transaminasa (U/L).	38
	B	Alanina transaminasa (U/L).	38
Figura 4		Grasa hepática total (g/100 g hígado).	40
Figura 5		Efecto neto de la acreción hepática de DHA (g/100 g hígado).	40
Figura 6		Triglicéridos hepáticos (mg/g hígado).	42
Figura 7		Ácidos grasos libres hepáticos ($\mu\text{mol/g}$ hígado).	42
Figura 8	A	Porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α .	45
	B	Porcentaje de actividad de unión al ADN de Nrf2.	45
Figura 9	A	Expresión génica hepática de PPAR α (ARNm).	48
	B	Expresión génica hepática de Nrf2 (ARNm).	48
Figura 10	A	Expresión génica hepática de CPT1a (ARNm).	49
	B	Expresión génica hepática de ACOX1 (ARNm).	49
Figura 11	A	Expresión génica hepática de Gclc (ARNm).	50
	B	Expresión génica hepática de Gsta3 (ARNm).	50
Figura 12		Niveles hepáticos de RD1 (pg/mg)	51
Figura 13	A	Niveles séricos de FGF-21 (pg/mL).	53
	B	Expresión génica hepática de FGF-21 (ARNm).	53
Figura 14	A	Niveles hepáticos de Colesterol total ($\mu\text{g/g}$ hígado).	55
	B	Expresión génica hepática HMGCoA Reductasa (ARNm).	55
Figura 15	A	Correlación entre niveles hepáticos de RD1 (pg/mg hígado) y porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α .	56
	B	Correlación entre niveles séricos de FGF-21 (pg/mL) y porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α .	56

viii. Anexos

Anexo 1	Resumen de patogénesis y progresión de la Enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA).	78
Anexo 2	Cantidades de muestra (plasma y tejido hepático) utilizadas para las distintas mediciones.	79
Anexo 3	Clasificación de esteatosis hepática de acuerdo al porcentaje (%) de hepatocitos con vesicular lipídicas.	79
Anexo 4	Evolución del peso corporal de los ratones durante las 12 semanas de investigación (g).	80
Anexo 5	Control de ingesta por grupo experimental.	81
Anexo 6	Ingesta de ácido palmítico (C16:0) por grupo experimental (g/100 g de dieta).	82
Anexo 7	Histología hepática de ratones alimentados con dieta control y alta en grasa con o sin suplementación de DHA + HT (10X).	83
Anexo 8	Perfil de AG hepáticos totales por grupo experimental.	84
Anexo 9	Resumen de los mecanismos protectores de DHA e HT frente a DAG a nivel molecular.	86

ix. Lista de abreviaturas

Abreviación	Significado	Abreviación	Significado
AA	Ácido araquidónico	EO	Estrés oxidativo
ACC	Acetil CoA carboxilasa	EPA	Ácido eicosapentaenoico
ACOX1	Acil-CoA oxidasa	EROs	Especies reactivas del oxígeno
AG	Ácido graso	EVOO	Aceite de oliva extra virgen
AGI	Ácido graso insaturado	FGF-21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
AGL	Ácido graso libre	Gclc	Cistina glutamato ligasa
AGMI	Ácido graso monoinsaturado	GPx	Glutación peroxidasa
AGPI	Ácido graso poliinsaturado	GR	Glutación reductasa
AGPICL	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga	GSTa3	Glutación S-transferasa
AGS	Ácido graso saturado	HMGCoA Reductasa	Hidroximetil glutaril CoA reductasa
ALA	Ácido α -linolénico	HT	Hidroxitirosol
ALT	Alanina transaminasa	IMC	Índice de masa corporal
ARE	Elemento de respuesta antioxidante	MLX	Max-Like Factor X
AST	Aspartato transaminasa	Nrf2	Factor nuclear derivado de eritroides 2.
CAT	Catalasa	PPARα	Receptor que estimula la proliferación de peroxisomas α .
CHO	Carbohidratos	RD1	Resolvina D1
CPT1a	Carnitina palmitoil transferasa 1a	RI	Resistencia a la insulina
DAG	Dieta alta en grasa	RXR	Receptor X retinoide
DC	Dieta control	SM	Síndrome metabólico
DHA	Ácido docosahexaenoico	SOD	Superóxido dismutasa
DM2	Diabetes mellitus tipo 2	TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
ECV	Enfermedad cardiovascular	TG	Triglicéridos
EHGNA	Enfermedad por hígado graso no alcohólico	VCT	Valor calórico total

3. Resumen

Introducción: La enfermedad por hígado graso no alcohólico se caracteriza por una acumulación excesiva y patológica de grasa en los hepatocitos, asociándose con diversas enfermedades crónicas de origen nutricional. Uno de sus enfoques terapéuticos es una dieta rica en AGPICL n3, como el DHA. El alto consumo de AGPICL n3, altamente susceptibles a la lipoperoxidación, pudiera generar además estrés oxidativo, por lo que el consumo de antioxidantes, como el HT pudiera ser de utilidad. Tanto el DHA como el HT, han mostrado activar los factores de transcripción PPAR y Nrf2, aumentando así la β -oxidación y disminuir la lipogénesis de ácidos grasos y el estrés oxidativo, previniendo la aparición y progresión de la EHGNA. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la suplementación con DHA más HT en la activación de PPAR y Nrf2 en la reducción de hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en grasa en ratón. **Métodos:** Ratones machos C57BL/6J fueron alimentados con dieta control (10% grasa) o dieta alta en grasa (60% grasa) por 12 semanas. Los animales fueron suplementados vía oral con DHA (50 mg/kg/día), HT (5 mg/kg/día), o DHA + HT. **Resultados:** La alimentación con DAG por 12 semanas indujo esteatosis hepática, disminución en la actividad de unión al ADN y expresión hepática de PPAR y aumento de Nrf2. La suplementación conjunta de DHA + HT generó un efecto protector sobre la EHGNA, a través: *i*) disminución de la esteatosis hepática; *ii*) menor acumulación de lípidos hepáticos; *iii*) activación de PPAR y β -oxidación peroxisomal; *iv*) activación de Nrf2 y de enzimas antioxidantes; *v*) aumento de AGPICL n3 en el perfil de AG hepáticos; *vi*) aumento en niveles de RD1 hepáticos; *vii*) aumento de la expresión hepática y niveles séricos de FGF-21; *viii*) disminución en los niveles hepáticos de colesterol y expresión hepática de HMGCoA Reductasa. **Conclusiones:** La suplementación con DHA + HT, en esta investigación, logró prevenir la esteatosis hepáticas inducida por DAG en ratones C57BL/6J, por lo que podría considerarse una terapia nutricional para la EHGNA, además activa a los factores de transcripción PPAR y Nrf2, mostrando luces del mecanismo responsable de este efecto.

4. Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by an excessive and pathological accumulation of fat in hepatocytes, associated with various chronic diseases of nutritional origin. One of its therapeutic approaches is a diet rich in n3 LCPUFA, as DHA. The high consumption of n3 long chain polyunsaturated fatty acids (n3 LCPUFA), highly susceptible to lipoperoxidation, could also generate oxidative stress, therefore the consumption of antioxidants, such as HT, could be useful. Both DHA and HT have been shown to activate the transcription factors PPAR and Nrf2, thus increasing β -oxidation and decreasing fatty acid lipogenesis and oxidative stress, preventing the onset and progression of NAFLD. **Objective:** Evaluate the effect of supplementation with DHA plus HT in the activation of PPAR and Nrf2 in the reduction of non-alcoholic fatty liver induced by high-fat diet (HFD) in mice. **Methods:** Male C57BL/6J mice were fed a control diet (10% fat) or a high fat diet (60% fat) for 12 weeks. The animals were supplemented orally with DHA (50 mg/kg/day), HT (5 mg/kg/day), or DHA + HT. **Results:** Feeding with HFD for 12 weeks induced hepatic steatosis, decreased DNA binding activity and hepatic PPAR expression and increased Nrf2. The joint supplementation of DHA + HT generated a protective effect on NAFLD, through: *i*) decreased hepatic steatosis; *ii*) less accumulation of liver lipids; *iii*) activation of PPAR and peroxisomal β -oxidation; *iv*) activation of Nrf2 and antioxidant enzymes; *v*) increase in n3 LCPUFA in the hepatic lipid profile; *vi*) increased levels of hepatic RD1; *vii*) increased hepatic expression and serum levels of FGF-21; *viii*) decrease in hepatic cholesterol levels and hepatic expression of HMGCoA reductase. **Conclusions:** Supplementation with DHA + HT, in this research, succeeded in preventing hepatic steatosis induced by HFD in C57BL/6J mice, so it could be considered as nutritional therapy for NAFLD, further more it activates the transcription factors PPAR and Nrf2, showing lights of the mechanism responsible for this effect.

5. Marco teórico

5.1. Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA).

La EHGNA caracterizada por una acumulación excesiva y patológica de grasa en los hepatocitos (>5% del peso total del hígado) (1,2), requiriendo para su diagnóstico de *i*) evidencia imagenealógica o histológica de esteatosis y *ii*) ausencia de causa secundaria para acúmulo de grasa, como el consumo excesivo de alcohol (> a 20 g/día en hombres y 10 g/día en mujeres) (2). La EHGNA comprende un amplio espectro de patologías incluyendo esteatosis simple (infiltración de grasa), esteatohepatitis (involucrando inflamación) y cirrosis (3); con una prevalencia mundial de 10 a 46% (4,5). En Chile, se ha reportado una prevalencia estimada del 23% usando como método diagnóstico el ultrasonido en sujetos con un IMC de 28,1 kg/mt² (6); por otro lado un estudio del año 2006 realizado en pacientes con obesidad mórbida que optan a cirugía bariátrica revelo una prevalencia de 53,4% (7).

La EHGNA, es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM) (8); entre sus factores de riesgo, destacan la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), resistencia a la insulina (RI) y dislipidemia (6); por otro lado, polimorfismos en genes del metabolismo lipídico, regulación de citoquinas, mediadores fibróticos y estrés oxidativo (EO) han mostrado una posible asociación con el inicio y progresión de la EHGNA (6). Los estilos de vida como la inactividad física y la alimentación poco saludable, son factores de riesgo para la obesidad y alteraciones cardiometabólicas, llevan al desarrollo de SM y de EHGNA, mediante el desarrollo de RI, EO e inflamación (6).

5.2. Influencia de la dieta en la patogenia de la EHGNA:

La dieta occidental caracterizada por una alta ingesta de energía procedente de productos derivados de cereales, hidratos de carbono simple, grasas (principalmente saturada y ácidos grasos (AG) *trans*) y jarabe de maíz alto en fructosa (especialmente en bebidas azucaradas), así como un bajo consumo de frutas, verduras y pescados ricos en AG n3, exacerbando la depleción hepática de los mismos; contribuye al aumento en la prevalencia de la EHGNA (9,10), observándose asociaciones positivas en adolescentes (11). El desbalance producido entre ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) n6 y n3 genera un aumento de productos pro-inflamatorios y pro-coagulantes, derivados del ácido araquidónico (AA,

C20:4 n6) (2), sumado al consumo de AG *trans*, potente inhibidor de la enzima Δ^6 desaturasa (12), lo que se traduce en un aumento en la incidencia de SM, EHGNA e incluso mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) (2). El metabolismo de los nutrientes se ve alterado en sujetos con EHGNA, observándose un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), generando EO, disfunción mitocondrial, estrés de retículo y un estado pro-inflamatorio y pro-lipogénico a nivel hepático (2).

5.3. Alteraciones metabólicas en la EHGNA:

La EHGNA se asocia con los principales factores del SM (8), como la obesidad, caracterizada por adiposidad visceral disfuncional y un estado inflamatorio crónico que induce RI (13). Al respecto, la RI observada tanto en el hígado como en tejidos periféricos (12), favorece un aumento en la lipólisis (14). Esta alta movilización de lípidos, específicamente de ácidos grasos libres (AGL) desde el tejido adiposo hacia el hígado, aumenta la lipogénesis hepática (12) y exacerba el depósito de triglicéridos (TG) en los hepatocitos (13), lo cual conduce a un aumento de la actividad mitocondrial, producción de EROs y EO (12). En este contexto, la teoría de los “dos golpes” de Day y James intenta explicar la patogénesis y progresión de la EHGNA (14). El “primer golpe” es la acumulación hepática reversible de TG, debido a la RI, resultando en alteraciones metabólicas y moleculares, aumentando la susceptibilidad al “segundo golpe” representado por el EO que causa inflamación e injuria tisular (13). En los últimos años ha surgido la teoría de los “múltiples golpes paralelos”, donde la RI es el “golpe central”, haciendo al hepatocito susceptible a: *i*) producción de EROs por oxidación de AGL, *ii*) desregulación en la producción de citoquinas, y *iii*) disfunción mitocondrial (14), llevando a la aparición y progresión de la EHGNA (Ver **Anexo 1**).

5.4. AGPICL n3, DHA y beneficios para la salud general:

Los AGPICL n3 son moléculas orgánicas y componentes dietarios que participan de diferentes procesos fisiológicos, especialmente como parte de las membranas celulares (fosfolípidos) y sustratos para la síntesis de mediadores fisiológicos (12,15). Los principales AGPICL n-3 son derivados metabólicos del ácido α -linolénico (ALA C18:3 n3) (15), el ácido eicosapentanoico (EPA C20:5 n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA C22:6

n3), los que se pueden encontrar en animales de origen marino, especialmente pescados grasos (jurel, atún y salmón) (12,15). El EPA es importante en la homeostasis vascular y respuesta inflamatoria, jugando un rol protector de la salud cardiovascular (16); el DHA es un componente de membranas celulares, especialmente neuronales, participando en el desarrollo cerebral y visual durante la vida intrauterina y los primeros años de vida (16,17). Los AGPICL n3 han mostrado ser eficaces en el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas, ECV, cáncer, dislipidemias, EHGNA, entre otras, gracias a su participación en la modulación de la respuesta inmune, disminuyendo la inflamación e injuria con efecto citoprotector (12,16). Pese a sus beneficios, un exceso en su consumo puede aumentar la peroxidación lipídica y reducir la producción de citoquinas, por lo que la FAO estableció como valor máximo de intervalo aceptable de distribución de nutrientes de EPA más DHA en 2 g/día (15).

Una de las funciones biológicas más importantes de los AGPICL es la formación de eicosanoides (derivados de 20 átomos de carbono) y docosanoides (derivados de 22 átomos de carbono) a través de las rutas metabólicas de las COX y LOX, promoviendo efectos pro-resolutivos de inflamación y citoprotectores (15,18).

5.5. DHA y beneficios para la salud hepática:

La transformación de ALA a DHA es baja (0,05%) tanto en humanos como animales, por lo que su consumo en la dieta es fundamental (15,19). Una vez incorporado a las membranas celulares, el DHA puede aumentar la fluidez y espesor de la membrana (15,19) contribuyendo a una mejor señalización celular e incorporación de receptores.

En la EHGNA existe: *i*) mayor peroxidación hepática de AGPICL n-3 por aumento de las EROs y susceptibilidad a los radicales libres; *ii*) desaturación defectuosa de ALA, disminuyendo el EPA y DHA, por deficiencia en la actividad de las desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$; *iii*) desbalance dietario (menor consumo de EPA+DHA y alto consumo de AA y AG *trans*) que inhibe la $\Delta 6$ desaturasa (enzima clave en la síntesis de DHA a partir de ALA); lo cual lleve a una depleción hepática de AGPICL n3, disminuyendo alrededor del 50% de los niveles tanto de EPA, como DHA, aumentando así la razón de AG n6/n3 (12,14,19,20,21) tanto en humanos como animales, promoviendo la producción de productos pro-inflamatorios y pro-coagulantes (2).

Diversos estudios humanos y animales han mostrado la capacidad del DHA para promover la oxidación y reducir la síntesis de AG en el hígado, así como su almacenamiento como TG (15); además es capaz de disminuir los niveles de colesterol hepático y sérico, observándose una disminución en la expresión hepática de hidroximetil glutaril CoA reductasa (HMGCoA Reductasa), gen codificante de la enzima clave en la síntesis de colesterol (22). El DHA actúa, además mediante: *i*) sus derivados metabólicos resolviendo la inflamación y previniendo la RI (18,20); siendo un sustrato para la COX-2 y 5-LOX, produciendo docosanoides, como resolvinas de la serie D, protectinas y maresinas (15,18); potentes mediadores lipídicos que participan en la prevención de enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, ECV, determinados tipos de cáncer, DM2, Alzheimer, entre otras (12,18). Una de las moléculas más importantes es la resolvina D1 (RD1), esta se produce por la oxigenación secuencial del DHA por la 5-LOX y 15-LOX; RD1 es capaz de reducir marcadores de inflamación hepáticos, la apoptosis celular y la acumulación de lípidos a través de la vía JNK, de esta forma contribuyendo a la resolución de la EHGNA, tanto en modelos celulares y animales (22,24). *ii*) activación de la expresión de genes del transporte y oxidación de AG en el hígado, especialmente como ligandos de PPAR α (12,15,20,25); *iii*) reducción de la expresión de genes involucrados en la síntesis de *novo* de lípidos (ChREBP)/Max-like factor X (MLX) y SREBP-1c), disminuyendo la lipogénesis (12,15,20), y *iv*) inhibición de la actividad de unión al ADN de NF- κ B, limitando la expresión de genes inflamatorios (26). En modelos animales (de ratón) el DHA ha mostrado gran efectividad en la supresión de la expresión de marcadores hepáticos de inflamación, fibrosis y EO (20,27,28), además de la inhibición de lipogénesis hepática (27); también induce la activación redox de Nrf2 y la activación de PPAR α , favoreciendo así una respuesta antioxidante y antiinflamatoria, sumado a un aumento en la transcripción de CPT1a y ACOX1 (30) en ratas. En humanos, la suplementación con DHA (250 mg/día) ha demostrado ser efectiva en disminuir la grasa visceral, hepática y la RI en niños (28); mejorando incluso el balonamiento (perdida de forma cuboidal del hepatocito por alteraciones estructurales del citoesqueleto) e inflamación (31).

5.6. Hidroxitirosol (HT): Efectos beneficiosos para la salud general y hepática:

El hidroxitirosol (HT) o 3,4-dihidrofénil-etanol (32), es compuesto fenólico derivado de la oleuropeína, siendo considerado uno de los antioxidantes con mayores propiedades citoprotectoras en modelos celulares y animales, (33,34,35,36). La principal fuente de HT es el aceite de oliva extra virgen (EVOO) (32) y las hojas de oliva, en menores concentraciones. El HT es el único fenol reconocido por la EFSA como protector de daño oxidativo de lípidos sanguíneos, recomendando un consumo de 5 mg/día, cantidad fácilmente alcanzable con una dieta balanceada (37). A nivel general es capaz de: *i*) inhibir la oxidación de LDL, disminuir el tamaño de lesiones ateroscleróticas, lo cual previene ECV (38); *ii*) reducción de anión superóxido previniendo el daño al ADN, inducción de apoptosis celular e inhibición de la proliferación suprimiendo la activación de NF- κ B, previniendo enfermedades tumorales (33); *iii*) inhibición de la actividad de la COX y LOX, reduciendo la inflamación y *iv*) inhibición del crecimiento de colonias bacterianas (32,36).

En la EHGNA, el HT ha mostrado reducir el tamaño de gotas lipídicas y acumulación de TG en hepatocitos, mediante la modulación de enzimas claves del metabolismo lipídico (35). Al igual que la oleuropeína el HT es capaz de prevenir la peroxidación lipídica en hígado de ratas (39), reducir la esteatosis, balonamiento, transaminasas hepáticas y el colesterol en ratones y ratas con EHGNA inducida por dieta alta en grasa (40), mejorando parámetros metabólicos de RI, a través: *i*) aumento de la expresión génica de PPAR α , fosforilación de Acetil-CoA carboxilasa (ACC), promoviendo la oxidación de AG en el hígado; *ii*) reducción de la inflamación y el EO, mediante la disminución en la expresión de COX-2, iNOS y NF- κ B (35,41). Además, el HT presenta actividades anti-proliferativas y pro-apoptóticas en células de hepatocarcinoma, vía supresión de NF- κ B (34), y es capaz de eliminar radicales libres y activar al sistema de defensa endógeno mediado por Nrf2, aumentando su translocación al núcleo, lo que se traduce en un aumento en la expresión de enzimas como la Glutatión peroxidasa (GPx), Glutatión reductasa (GR) y Glutatión S-transferasa (GSTa3) en modelos celulares y animales (42,43).

5.7. Receptor que estimula la proliferación de peroxisomas γ (PPAR α):

Los PPARs son factores de transcripción nuclear (44,45) que presentan tres isoformas α , β y γ , son capaces de actuar como sensores lipídicos y modular el metabolismo (46,47). Los

PPARs son activados por diversos ligandos, destacando los AGPICL y eicosanoides (15). Los ligandos al unirse al dominio de PPAR permiten la heterodimerización con el 9-cis-Receptor X Retinoide (RXR) de PPAR α , el dímero se une al elemento de respuesta de PPAR de la zona promotora de genes blancos involucrados en oxidación mitocondrial, cetogénesis, metabolismo de lipoproteínas y transporte de AG (45,48). PPAR α se expresa en células con alta actividad β -oxidante como son los hepatocitos (47,49,50); donde regula la respuesta adaptativa al ayuno, aumentando su expresión en modelo de rata (51), al controlar el transporte de AG, la β -oxidación y cetogénesis (46,51). En la EHGNA, PPAR α disminuye su expresión en el hígado (44) agravando la infiltración de grasa hepática y la inflamación (52). En pacientes con EHGNA, pudiera tener un rol hepatoprotector a través de la disminución de EROs (46) y el aumento en la expresión de genes como acil-CoA oxidasa (ACOX1) y carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a). ACOX1 es una proteína del peroxisoma, clave en la oxidación de AG (53), mientras que CPT1a participa en el transporte de AG dependiente de carnitina a través de la membrana mitocondrial, promoviendo la β -oxidación de AG (46,54). Por otro lado, PPAR α es capaz de inducir la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) en hígado, tanto en humanos como animales (55,56). FGF-21 es capaz de aumentar la captación de glucosa por parte del tejido adiposo; los niveles séricos de FGF-21 se correlaciona positivamente con el contenido hepático de TG y el grado de esteatosis hepática (57); es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar en el hipotálamo, liberando corticosterona, aumentando la gluconeogénesis hepática, manteniendo la euglicemia, aumentando la oxidación de AG y la cetogénesis (56).

5.8. Factor nuclear derivado de eritroides 2 (Nrf2):

Nrf2 es un factor de transcripción que participa en la mantención del estado redox de la célula mediante la modulación de la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores (58,59) frente al EO y electrofílico (58). En condiciones normales está unido a la proteína citoplasmática Keap1, la cual permite su ubiquitinización y degradación proteosomal. Frente a un estímulo, Keap1 se oxida liberando a Nrf2 el cual transloca al núcleo, donde se une a pequeñas proteínas llamadas *Maf*, que le entregan estabilidad, el dímero se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) de sus genes blancos (60,61). Se ha visto un

aumento en la transcripción de sus genes blancos como glutatión S-transferasa en pacientes con esteatohepatitis como un mecanismo compensatorio frente al estrés oxidativo (60). Nrf2 se expresa en diversas células incluidos los hepatocitos (62), donde ha mostrado reprimir la expresión de enzimas claves de la síntesis de AG, con la consecuente disminución de los lípidos hepáticos (63), por lo que se ha considerado como un posible blanco terapéutico para la EHGNA. Dentro de los genes que regula se encuentra la glutatión S-transferasa (GSTa3), que juega un rol importante en la detoxificación celular (64,65,66) y la glutamato-cisteína ligasa (Gclc), enzima clave en la síntesis de glutatión (67). Además, como otro posible mecanismo de acción en EHGNA, se ha observado que Nrf2 es capaz de aumentar la expresión hepática y los niveles plasmáticos de FGF-21 en modelos animales de obesidad, lo que contribuiría a disminuir la esteatosis hepática (68).

5.9. Formulación general del proyecto:

La EHGNA es una patología caracterizada por una acumulación excesiva y patológica de grasa en los hepatocitos, y se asocia a obesidad, DM2, RI y dislipidemia, entre otras patologías. Una de las causas más relevantes para su desarrollo es la dieta, el patrón clásico occidental promueve el desarrollo de RI, EO e inflamación que llevan a la EHGNA. Además, en los sujetos con EHGNA se presenta una depleción hepática de AGPICL n3, lo cual agrava el cuadro patológico. Dentro de los enfoques terapéuticos para prevenir o tratar la EHGNA se encuentra precisamente una dieta rica en AGPICL n3, especialmente EPA y DHA, este último ha mostrado entregar grandes beneficios a la hora de frenar la aparición de la EHGNA. Sin embargo, el consumo excesivo de AGPICL n3, los cuales son altamente susceptibles a la lipoperoxidación y podrían sobrecargar la mitocondria generando EO; por lo que los antioxidantes, como el HT, debería ser de gran utilidad en el tratamiento y/o prevención de la EHGNA. Tanto el DHA como el HT han mostrado activar y/o modular los factores de transcripción PPAR α y Nrf2, lo cuales regulan la expresión de diversos genes aumentando la β -oxidación de AG, disminuyendo la síntesis de AG y el EO. Por lo tanto, en base a la evidencia científica presentada, se pretende evaluar el efecto de la suplementación de DHA junto con HT sobre la reducción de la EHGNA, y observar si existe una activación de PPAR α y Nrf2.

6. Hipótesis y objetivos

6.1. Hipótesis:

Los factores de transcripción PPAR y Nrf2 se activan en un modelo de ratón suplementado con DHA más HT, que reduce el hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en grasa.

6.2. Objetivo general:

Evaluar el efecto de la suplementación con DHA más HT en la activación de PPAR y Nrf2 en la reducción de hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en grasa en ratón.

6.3. Objetivos específicos:

- a) Evaluar los cambios histológicos y el perfil de AG hepáticos en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.
- b) Evaluar los cambios en la actividad de unión al ADN de PPAR y Nrf2 a nivel hepático en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.
- c) Establecer los cambios en los niveles hepáticos del ARNm de los factores de transcripción PPAR y Nrf2 en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.
- d) Determinar los cambios en la expresión génica de genes regulados por los factores de transcripción PPAR y Nrf2; CPT1a y ACOX1 para PPAR y Cisteína-glutamato ligasa y Glutación S-transferasa para Nrf2 en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.
- e) Determinar los cambios en los niveles hepáticos de un docosanoide derivados del DHA, específicamente la Resolvina D1 en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.
- f) Evaluar los cambios en la expresión génica hepática y niveles séricos de FGF-21 en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.
- g) Establecer los cambios en el contenido hepático de colesterol total y la expresión génica hepática de HMGCoA Reductasa en ratones suplementados con DAG y suplementados con DHA más HT.

7. Metodología

7.1. Definición de la muestra: Se utilizaron ratones machos C57BL/6J de 21 días post destete, de 12 a 14 gramos de peso inicial, obtenidos desde el Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Se seleccionó esta cepa debido a su susceptibilidad al desarrollo de alteraciones metabólicas e histológicas similares a los humanos con la EHGNA frente a una dieta alta en grasa (69). El tamaño de muestra se calculó mediante el software estadístico: Primer of Bioestatics: The Program versión 3.02, considerando modelo experimental, tipo de intervención, efecto de 50% de aumento en expresión génica de PPAR α y Nrf2, significancia estadística de valor $p < 0,05$ y poder de 0,8, con un margen de pérdida del 10%. Arrojando un tamaño de 10 ratones por grupo, con 80 ratones en total.

7.2. Definición del diseño de investigación:

7.2.1. Tipo de estudio: Estudio experimental, aleatorio, controlado, en modelo animal de ratón C57BL/6J, el diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Protocolo CBA#CBA0667FMUCH).

7.2.2. Protocolo de intervención: Los ratones C57BL/6J fueron asignados aleatoriamente a uno de los 8 grupos experimentales (Ver **Tabla 1**) por 12 semanas. Vivieron en una habitación con control de temperatura y ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Los animales pertenecientes a cada grupo fueron mantenidos en jaulas separadas, con acceso libre a dieta asignada y agua, con suplementación correspondiente de forma diaria, control de ingesta y peso corporal semanal. Al finalizar el tratamiento, se sometieron a un ayuno de 12 horas y fueron anestesiados con Isoflorano (Lunas better Pharmaceutical, Co., Ltd), por medio de punción cardíaca se obtuvo una muestra sanguínea y posteriormente el tejido hepático, el cual fue congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su análisis, de acuerdo al plan de trabajo de uso de muestras, presentado en el **Anexo 2**.

Tabla 1: Grupos experimentales.

Grupo experimental	Características	Grupo experimental	Características
a	Dieta control (DC)	e	Dieta alta en grasa (DAG)
b	DC+DHA	f	DAG+DHA
c	DC+HT	g	DAG+HT
d	DC+DHA+HT	h	DAG+DHA+HT

7.3. Definición de variables:**Tabla 2:** Variable interviniente e independiente.

	Variable	Tipo de variable	Clasificación	
Dieta	Interviniente	Cualitativa, nominal, dicotómica	- DC:1 - DAG:2	
Efecto de la suplementación	Independiente	Cualitativa, nominal, policotómica	-DC:1 -DC+DHA:2 -DC+HT:3 -DC+HT+DHA:4	-DAG:5 -DAG+DHA:6 -DAG+HT:7 -DAG+HT+DHA:8

Tabla 3: Variables descriptivas.

Variables descriptivas	Tipo de variables	Indicadores	Métodos
Peso corporal inicial y final	Cuantitativa continua	g	Medición de peso en balanza analítica
Peso hígado final	Cuantitativa continua	g	Medición de peso en balanza analítica
Peso tejido adiposo	Cuantitativa continua	g	Medición de peso en balanza analítica
Ingesta de alimentos	Cuantitativa continua	g	Control de ingesta
Ingesta de energía	Cuantitativa continua	kcal	Control de ingesta
Valor calórico total	Cuantitativa continua	%	Control de ingesta

Tabla 4: Variables dependientes.

Variables dependientes	Indicadores	Tipo de variable	Métodos
Esteatosis y daño hepático	% de hepatocitos con vesículas lipídicas	Cuantitativa continua	Tanaka y cols, 2008 (70)
	Presencia de esteatosis (leve=1; moderada=2; severa=3)	Cualitativa, nominal, policotómica	Tanaka y cols, 2008 (70)

Tabla 4: Variables dependientes (Continuación).

Variables dependientes	Indicadores	Tipo de variable	Métodos
Esteatosis y daño hepático	Niveles de transaminasas hepáticas (AST y ALT) (U/L))	Cuantitativa continua	Kit específico espectrofotométrico (Biomerieux SA, Marcy)
Contenido lipídico hepático	Grasa total en el hígado (mg/g)	Cuantitativa continua	Bligh & Dyer, 1959 (71) y gravimetría.
	TG en el hígado (mg/g)	Cuantitativa continua	Kit enzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)
	AGL en el hígado (μ M/g)	Cuantitativa continua	Kit enzimático (Abcam)
	Perfil de ácidos grasos hepáticos (g/100 g hígado)	Cuantitativa continua	Bligh & Dyer, 1959 (71) y Cromatografía líquida- gaseosa.
	Colesterol total el en hígado	Cuantitativa continua	Kit específico colorimétrico (Biovisión)
PPAR en hígado	Actividad de unión al ADN de PPAR α	Cuantitativa continua	Kit comercial de extracción (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Kit Elisa específico para PPAR (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).
	Niveles de ARNm de PPAR α	Cuantitativa continua	qPCR
	Expresión del gen CPT1a (ARNm)	Cuantitativa continua	qPCR
	Expresión del gen ACOX1 (ARNm)	Cuantitativa continua	qPCR
Nrf2 en hígado	Actividad de unión al ADN de Nrf2	Cuantitativa continua	Kit comercial de extracción (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Kit Elisa específico para Nrf2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).
	Niveles de ARNm de Nrf2	Cuantitativa continua	qPCR
	Expresión del gen Cisteína-glutamato ligasa (ARNm)	Cuantitativa continua	qPCR

Tabla 4: Variables dependientes (Continuación).

Variables dependientes	Indicadores	Tipo de variable	Métodos
Nrf2 en hígado	Expresión del gen glutatión S-transferasa (ARNm)	Cuantitativa continua	qPCR
FGF-21	Expresión hepática (ARNm) de FGF-21	Cuantitativa continua	qPCR
	Niveles séricos de FGF-21 (pg/ml)	Cuantitativa continua	Kit Elisa específico para FGF-21 en ratón (Abcam).
HMGCoA Reductasa	Expresión hepática (ARNm) de HMGCoa Reductasa	Cuantitativa continua	qPCR
RD1	Niveles hepáticos de RD1 (pg/mg)		Kit Elisa específico para RD1 (Mybiosource).

7.4. Procedimientos y técnicas a utilizar:

7.4.1. Procedimientos generales: Dieta y suplementación: Para los animales pertenecientes a cada grupo existió acceso libre a comida y agua. Ambas dietas son certificadas, con aporte estandarizado de micro y macronutrientes: Dieta control (Research Diet INC, dieta de ratón con 10% de las calorías provenientes de grasa, producto data S12450B. USA); Dieta alta en grasa (Research Diet INC, dieta de ratón con 60% de la calorías provenientes de grasa, producto data D12492. USA), en esta dieta los hidratos de carbono son reemplazados por grasa, pero sigue siendo suficiente en micronutrientes, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos. La suplementación con DHA (aceite de microalgas DSM Nutritional Products. USA) e HT (extracto de oliva, DSM Nutritional Products. USA) fue administrada por vía oral en dosis de 50 mg/kg de peso y 5 mg/kg de peso, respectivamente (Ver **Tabla 5 y 6**).

Tabla 5: Información nutricional dieta control y dieta alta en grasa.

	Dieta control (DC)		Dieta alta en grasa (DAG)	
	Producto D12450B		Producto D12492	
	g%	kcal%	g%	kcal%
Proteína	19,2	20,0	26	20
Hidratos de carbono	67,3	70,0	26	20
Grasas	4,3	10,0	35	60
Total		100		100
kcal/g	3,85		5,24	
Ingrediente	g	kcal	g	kcal
Caseína, 80 Mesh	200	800	200	800
L-Cisteína	3	12	3	12
Almidón de maíz	315	1260	0	0
Maltodextrina 10	35	140	125	500
Sacarosa	350	1400	68,8	275
Celulosa, BW200	50	0	50	0
Aceite de soya	25	225	25	225
Manteca de cerdo**	20	180	245	2205
Mezcla 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, 1 H2O	16,5	0	16,5	0
Mezcla de vitaminas V10001	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2	0	2	0
Tartrazina (FD7C yellow dye #5)	0,05	0	0	0
Total	1055,05	4057	777,85	4057

**Contenido de colesterol en manteca de cerdo: 72 mg/gramo.

D12492: Colesterol (mg)/4057 kcal= 216,4

D12450B: Colesterol (mg)/4057 kcal= 18

Tabla 6: Perfil de ácidos grasos dieta control y dieta alta en grasa.

	Dieta control		Dieta alta en grasa	
	% EMAG	g/100g de dieta	% EMAG	g/100g de dieta
Ácidos grasos saturados				
C10:0 Ácido Decanoico	0,000	0,000	0,077	0,024
C12:0 Ácido Dodecanoico	0,159	0,006	0,100	0,031
C14:0 Ácido Tetradecanoico	0,896	0,035	1,221	0,376
C16:0 Ácido Palmítico	16,429	0,635	21,005	6,471
C18:0 Ácido Esteárico	8,193	0,317	11,915	3,671
C20:0 Ácido Eicosanoico	0,299	0,012	0,216	0,067
C22:0 Ácido Docosanoico	0,256	0,010	0,050	0,015
C24:0 Ácido Tetracosanoico	0,000	0,000	0,000	0,000
Total AGS	26,232	1,014	34,584	10,654
Ácidos grasos monoinsaturados				
C14:1 Ácido Tetradecenoico	0,000	0,000	0,000	0,000
C16:1 Ácido Palmitoleico	0,789	0,031	1,471	0,453
C18:1 Ácido Oleico	29,616	1,145	36,476	11,238
C20:1 n9 Ácido Eicosanoico	0,405	0,016	0,598	0,184
C22:1 n9 Ácido Erucico	0,000	0,000	0,000	0,000
C24:1 Ácido Tetracosanoico	0,000	0,000	0,000	0,000
Total AGMI	30,810	1,191	38,545	11,875
Ácidos grasos poliinsaturados				
C18:2 n6 Ácido Linoleico	38,172	1,476	23,830	7,341
C18:3 n6 Ácido γ -Linolénico	0,000	0,000	0,000	0,000
C18:3 n3 Ácido α -Linolénico	4,331	0,167	1,761	0,543
C20:2 n6 Ácido Eicosadienoico	0,341	0,013	0,698	0,215
C20:3 n6 Ácido Di-homo- γ -Linolénico	0,000	0,000	0,091	0,028
C20:3 n3 Ácido 11,14,17 Eicosatrienoico	0,000	0,000	0,125	0,038
C20:4 n6 Ácido Eicosatetraenoico	0,113	0,004	0,216	0,067
C20:5 n3 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	0,000	0,000	0,000	0,000
C22:5 n3 Ácido Docosapentaenoico	0,000	0,000	0,066	0,020
C22:6 n3 Ácido Docosahexaenoico (DHA)	0,000	0,000	0,000	0,000
Total AGPI	42,957	1,661	26,788	8,253

7.4.2. Procedimientos por objetivo específico:

7.4.2.1. Objetivo específico a:

- Evaluación histológica: se realizó una evaluación cuantitativa basada en el porcentaje de hepatocitos con vesículas lipídicas bajo microscopía de luz en secciones de hígado teñidas con hematoxylin-eosina; y una evaluación cualitativa de acuerdo a la presencia de

esteatosis hepática macro y microvesicular clasificada como leve, moderada o severa (Ver **Anexo 3**), la esteatosis hepática se evaluó por tinción con eosina-hematoxilina, realizada por un patólogo ciego a los grupos intervenidos.

- Niveles séricos de transaminasas hepáticas (AST y ALT (UI/L)): fueron medidas a través de un kit específico espectrofotométrico (Biomerieux Sa, Marcy). Los resultados se expresan en U/L.

- Contenido lipídico hepático: La grasa total en muestras hepáticas fueron extraídas a través del método de Bligh and Dyer (71), mediante una homogenización en frío y con extracción cloroformo:metanol (2:1 v/v) y cuantificada por gravimetría.

- Perfil de AG hepáticos: Luego de aplicar el método de Bligh and Dyer (71), se procedió a la preparación de AG metilados, donde aquellos lípidos saponificables fueron derivatizados a ésteres metílicos a través de una hidrólisis en medio alcalino (NaOH saturado en metanol), y luego ácido (BF_3 al 12% en metanol). El perfil de AG hepáticos se realizó mediante cromatografía líquida-gaseosa, utilizando el cromatógrafo HP 7890-A. Los valores se expresan como g de AG/100 g de hígado.

- Cuantificación de TG: fueron medidos a través de un kit enzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI. USA n° 10010303) y normalizado por peso del hígado. Los resultados se expresan en mg/ gramo de hígado.

- Cuantificación de AGL: fueron medidos a través de un kit enzimático (Abcam, cod. Ab65341) y normalizado por peso del hígado. Los resultados se expresan en μmol / gramo de hígado.

7.4.2.2. Objetivo específico b:

- Se realizó extracción nuclear desde el tejido mediante el uso de un kit comercial de extracción (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI. USA n° 10009277). Para la cuantificación se utilizó un kit Elisa específico para PPAR α o Nrf2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI. USA n° 10006915 y n° 600590, respectivamente). Los valores fueron expresados según el porcentaje de unión respecto al control positivo del kit correspondiente.

7.4.2.3. Objetivos específicos c, d, f y g:

- El ARN fue aislado utilizando el kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN). Posteriormente se determino la cantidad de ARN total a través de la medición de absorbancia a 260 y 280 nm (espectrofotómetro), calculando un promedio entre ambas mediciones (Equipo: Epoch). Las muestras fueron sometidas a tratamiento con DNAsa (Ambion); posteriormente se agrego una transcriptasa-reversa (Promega) para formar el cDNA. PCR en tiempo real fue realizado utilizando primers específicos para cada transcrito (ARNm) y β -actina como control endógeno, usando el Brilliant II SYBR Green pPCR Mastermix (Stratagene, Agilent Technologies) con Mx3000P QPCR System (Stratagene, Agilent Technologies). Los primers utilizados (Integrated DNA Technologies, Inc.) se muestran en la **Tabla 7**, las muestras fueron amplificadas en duplicado, según el siguiente protocolo: 25°C por 1 segundo, 95°C por 10 minutos, posteriormente 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 65°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos. Terminando con 1 ciclo a 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 95°C por 30 segundos. El cambio relativo en la expresión fue calculado usando el método 2^{-CT} y normalizado por β -actina.

7.4.2.4. Objetivos específicos e:

- Medición Resolvina D1 en hígado: Se maso 250 mg de hígado, los cuales fueron sometidos a una homogeneización y posterior centrifugación, el sobrenadante se sometió al procedimiento indicado según el fabricante del Kit Elisa para Resolvina D1 (Mybiosource). Los resultados se expresan en pg/mg.

7.4.2.5. Objetivos específicos f:

- Los cambios en la expresión génica fueron medidos de acuerdo a lo expuesto en el punto 7.4.2.3.

- Medición en suero de FGF-21: Se realizó una centrifugación de las muestras sanguíneas obtenidas al momento del sacrificio de los animales, para separar el suero de los glóbulos rojos. Para la cuantificación se utilizó un kit Elisa específico para FGF-21 en ratón (Abcam, cod. ab212160). Los resultados fueron expresados de acuerdo a la curva de estandarización interna del kit en pg/ml.

7.4.2.6. Objetivos específicos g:

- Los cambios en la expresión génica fueron medidos de acuerdo a lo expuesto en el punto 7.4.2.3.

- Cuantificación de colesterol hepático: Se maso 10 mg de tejido hepático y se realizo la extracción con 200 µl de coloroformo:isopropanol: NP-40 (7:11:0,1). La muestra extraída fue sometida al procedimiento indicado según el fabricante del Kit colorimétrico para colesterol total en tejidos (Biovision, Cod. K603-100).

Tabla 7: Secuencias forward y reverse para los distintos transcritos.

Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
PPAR α	AAT GTG GCC AGG ACA TTG GA	AAA AAG TGC CAG CCA GGT TT
CPT1a	CCT CAC CGC CAA TTC CAA AA	AAG TCA AAC GGT GGA GCC TA
ACOX1	AAG CTA CGT GCA GCC AGA TT	TTG CAC GGC TCT GTC TTG AA
Nrf2	AAG CTT TCA ACC CGA AGC AC	TTT CCG AGT CAC TGA ACC CA
Gclc	TTG TCG CTG GGG AGT GAT TT	ATC GAT GGT CAG GTC GAT GT
Gsta3	TGC AGA CCA AAG CCA TTC TC	ACG GTT CCT GGT TTG TTC CT
FGF-21	AAT CCT GGG TGT CAA AGC CT	ATG TTG CAT CCT GGT TTG GG
HMGCoa Reductasa	TTG TGG CCA GCA CTA ACA GA	ACT GCA AAC CCT TCA GGT GT
β -actina	AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT	AAC CGC TCG TTG CCA ATA GT

7.5. Elaboración del plan de análisis y técnicas estadísticas de análisis:

Los resultados se analizaron con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0 para Mac, San Diego, CA, USA. Fueron excluidos aquellos datos que sobrepasaban ± 2 desviaciones estándar de la media, identificados como outliers. Se realizo una evaluación de distribución normal con el Test de Shapiro Wilk, las variables no presentaron una distribución normal, se aplico estadística no paramétrica. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante: i) Test de Kruskal Wallis, seguido por un Test de comparaciones múltiples entre grupos de Dunn's entre los 8 grupos experimentales. ii) Test de Mann

Whitney entre los grupos DC (a) vs. DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) vs. DAG + DHA + HT (h).

Se realizó un análisis de efectos netos entre: DC + DHA (b) vs. DC (a); DC + HT (c) vs. DC (a); DC + DHA + HT (d) vs. DC (a); DAG + DHA (f) vs. DAG (e); DAG + HT (g) vs. DAG (e); DAG + DHA + HT (h) vs. DAG (e). Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante el Test de Kruskal Wallis, seguido por un Test de comparaciones múltiples entre grupos de Dunn's entre los grupos indicados.

Los análisis de correlación se realizaron aplicando el Test de Spearman. La significancia estadística fue determinada con un valor $p < 0,05$. Los resultados están expresados como medianas y rangos intercuatílicos (RI).

8. Resultados

A. Descripción de la muestra.

8.1. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el peso corporal, peso del hígado y del tejido adiposo de los distintos grupos experimentales.

Las características generales de los animales se presentan en la **Tabla 8**. El peso inicial de los ratones en los distintos grupos experimentales no presentó diferencias significativas, observándose diferencias solo en el peso corporal al final de la intervención (12 semanas), donde los ratones pertenecientes al grupo DAG (e) presentaron un peso corporal significativamente mayor que los grupos DC (a), DC + HT (c) y DC + DHA + HT (d); así mismo el grupo DAG + HT (g) tuvo un mayor peso corporal que los animales del grupo DC (a); el resto de los grupos no presentó diferencias entre si. La evolución del peso corporal se observa en el **Anexo 4** y la ganancia de peso corporal a las 12 semanas de intervención se muestran en la **Figura 1A**, se observa una mayor ganancia de peso en la DAG ($p < 0,05$) en comparación con el incremento de los animales alimentados con dieta alta en grasa y suplementado con DHA por si solo y en conjunto con HT. En cuanto al peso del hígado solo se observan diferencias ($p < 0,05$) en el grupo DAG + DHA + HT (h) que presentó un peso menor que los grupos DC + DHA (b), DC + DHA + HT (d) y DAG (e). Los animales de los grupos DAG (e), DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) tuvieron mayor peso de tejido adiposo que los animales alimentados con dieta control con o sin suplementación; así mismo el grupo DAG + DHA + HT (h) tuvo un peso de tejido adiposo menor que los animales alimentados con dieta alta en grasa sin alcanzar significancia estadística, la ganancia de peso de tejido adiposo a las 12 semanas de intervención se muestran en la **Figura 1B**, existe una mayor ganancia de peso del tejido adiposo en los animales alimentados con DAG y suplementados por si solo con DHA e HT, en comparación con aquellos suplementados conjuntamente con DHA + HT ($p < 0,05$).

8.2. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la ingesta alimentaria de los distintos grupos experimentales.

La ingesta alimentaria de los grupos experimentales se presenta en el **Anexo 5**. No se encontraron diferencias significativas en la ingesta en gramos al día de alimento entre los

distintos grupos experimentales. Sin embargo existió una mayor ingesta calórica por parte de los animales alimentados con DAG con o sin suplementación, en comparación con los animales alimentados con DC con o sin suplementación ($p < 0,05$); lo mismo sucede con la ingesta en gramos al día de proteínas, hidratos de carbono (CHO) y lípidos ($p < 0,05$). La ingesta de ácido palmítico (C16:0) (**Anexo 6**), fue significativamente mayor en todos los grupos DAG con o sin suplementación en comparación con todos los grupos control con o sin suplementación.

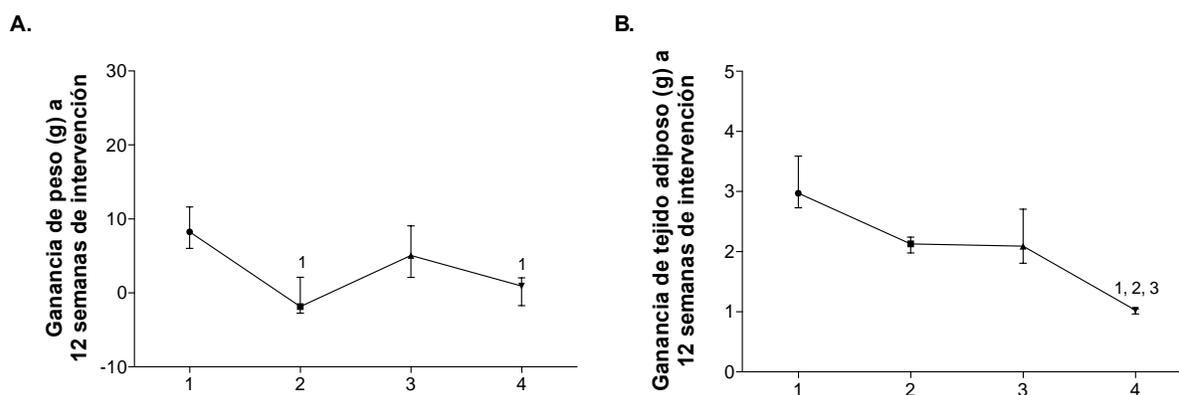


Figura 1: Ganancia de peso (A), Ganancia de tejido adiposo (B) a las 12 semanas de intervención (g). n= 8-10. 1. (DAG) – (DC); 2. (DAG + DHA) – (DC + DHA); 3. (DAG + HT) – (DAG + HT); 4. (DAG + DHA + HT) – (DC + DHA + HT). Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por los números que representan a cada grupo experimental.

Tabla 8. Características generales de los grupos experimentales.

	Grupos experimentales							
	DC (a)	DC + DHA (b)	DC + HT (c)	DC + DHA + HT (d)	DAG (e)	DAG + DHA (f)	DAG + HT (g)	DAG + DHA + HT (h)
Peso corporal inicial (g)	14,75 (13,75 – 15,70)	14,20 (13,30 – 15,10)	14,40 (13,50 – 15,20)	14,20 (13,50 – 15,38)	14,20 (13,30 – 14,70)	13,85 (13,45 – 14,95)	14,30 (13,28 – 15,08)	14,30 (13,35 – 14,55)
Peso corporal final (g)	27,70 (26,90 – 28,70)	30,15 (29,33 – 32,08)	27,85 (26,70 – 29,58)	29,95 (28,03 – 31,83)	35,20 (34,02 – 36,02) ^{a,c,d}	29,30 (27,60 – 33,15)	33,35 (29,32 – 36,42) ^a	30,75 (28,03 – 34,30)
Peso hígado (g)	1,272 (1,157 – 1,439)	1,443 (1,405 – 1,517)	1,305 (1,146 – 1,393)	1,335 (1,212 – 1,508)	1,405 (1,365 – 1,454)	1,260 (1,110 – 1,355)	1,377 (1,270 – 1,400)	1,174 (1,031 – 1,257) ^{b,d,e}
Peso tejido adiposo (g)	0,998 (0,940 – 1,048)	0,942 (0,854 – 1,061)	1,005 (0,978 – 1,088)	0,979 (0,880 – 1,072)	4,095 (3,709 – 4,567) ^{a,b,c,d}	3,025 (2,945 – 3,161) ^{a,b,c,d}	3,125 (2,854 – 3,725) ^{a,b,c,d}	2,004 (1,889 – 2,104)

Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico de peso corporal inicial, peso corporal final, peso hígado y peso del tejido adiposo, en gramos (g). n=8-10. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental: DC (a), DC + DHA (b), DC + HT (c), DC + DHA + HT (d), DAG (e), DAG + DHA (f), DAG + HT (g), DAG + DHA + HT (h).

B. Objetivo a.

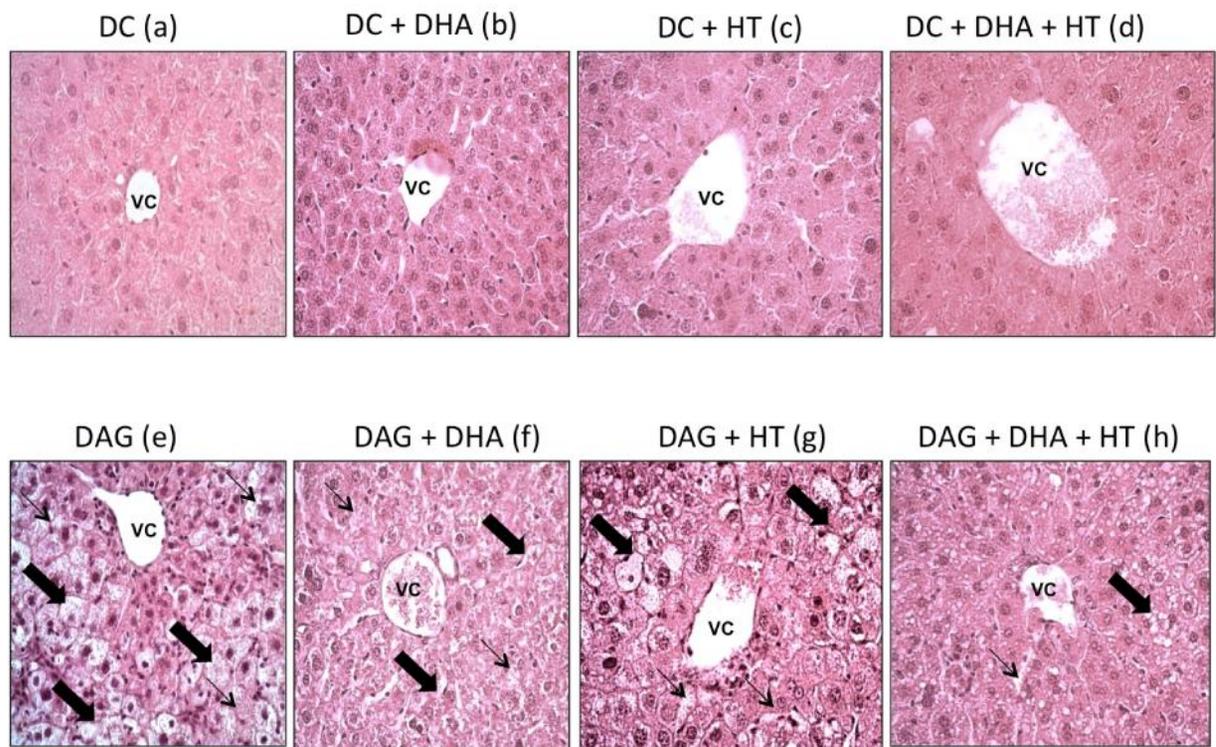
8.3. Efecto de la suplementación con DHA más HT en parámetros de esteatosis y daño hepático de los distintos grupos experimentales.

8.3.1. Esteatosis hepática: En la **Figura 2A** se presentan los resultados de histología 40X en tejido hepático por grupo experimental; en el **Anexo 7** se observa las histologías 10X por grupo experimental. En los ratones alimentados con DC, con o sin suplementación (Grupo a, b, c y d) se logra observar una normal histo-arquitectura celular, sin presencia de focos de inflamación, necrosis o esteatosis hepática. La alimentación con DAG (e) fue capaz de inducir un cuadro de esteatosis hepática moderada (**Anexo 3**) tanto micro como macrovesicular con focos superiores al 60% de los campos estudiados, con una histo-arquitectura alterada. Además en los animales alimentados con DAG se observó un desplazamiento del núcleo a la periferia del hepatocito, situación no observada en los animales alimentados con dieta control. Los grupos DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) presentaron menor cantidad (40 y 50% de los campos estudiados respectivamente) de focos de esteatosis moderada tanto micro como macrovesicular. El grupo DAG + DHA + HT (h) presentó una disminución marcada de los focos de esteatosis tanto micro como macrovesicular leve, encontrándose en un 10 a 20% de los campos estudiados.

El score de esteatosis de la **Figura 2B**, logra mostrar presencia de esteatosis hepática en los grupos alimentados con DAG (e), y una tendencia a la disminución de la misma en los grupos DAG + DHA (f) y DAG + HT (g), lo cual no alcanza significancia estadística respecto al grupo DAG (e). El grupo alimentado con DAG y con suplementación de DHA e HT (h) muestra una tendencia a la baja en el score de esteatosis, estadísticamente significativa al compararlo con el grupo DAG (e).

8.3.2. Transaminasas hepáticas: En la **Figura 3** se presentan los niveles en suero de aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT), **Figura 3A y 3B** respectivamente, para todos los grupos experimentales, sin presentar diferencias significativas para ningún grupo.

A.



40 X

B.

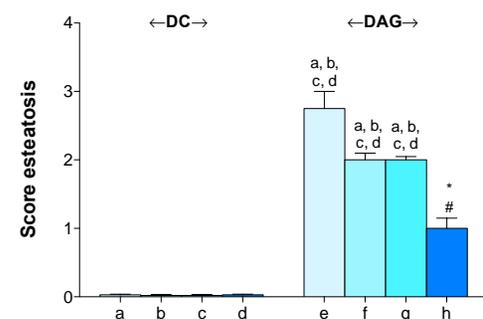


Figura 2: Esteatosis hepática. Histología hepática de ratones alimentados con dieta control y alta en grasa con o sin suplementación de DHA e HT; secciones representativas de tejido hepático (A); n= 8-10. Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina (40X de aumento). VC indica la vena centrolobulillar, → indica esteatosis microvesicular, ➔ indica esteatosis macrovesicular. **Score de esteatosis (B).** n= 8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por los números que representan a cada grupo experimental.

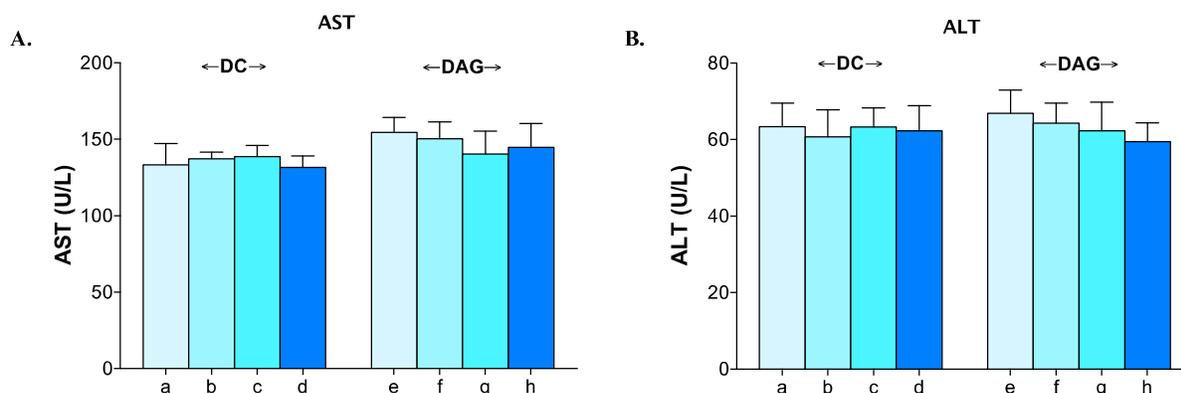


Figura 3: Niveles de aspartato transaminasa (AST) (A) y alanina transaminasa (ALT) (B) en suero (U/L). n= 8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#).

8.4. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el contenido de lípidos hepáticos de los distintos grupos experimentales.

8.4.1. Grasa total en el hígado: En la **Figura 4** se presenta el contenido de grasa total presente en el hígado de los ratones de todos los grupos experimentales. Existe un aumento significativo ($p < 0,05$) de grasa hepática en los grupos DAG (e), DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) respecto a todos los grupos controles con o sin suplementación. El grupo DAG + DHA + HT (h) presenta un aumento significativo en el contenido de grasa total, respecto al grupo DC (a), sin embargo la suplementación conjunta es capaz de disminuir los niveles de grasa total ($p < 0,05$) respecto al grupo DAG (e). El análisis de efectos netos logra mostrar una disminución significativa de la suplementación conjunta con DHA + HT (grupo h), respecto a las suplementaciones en los grupos controles.

8.4.2. Perfil ácidos grasos hepáticos: El perfil de ácidos grasos hepáticos más destacados se presentan en la **Tabla 9**; el perfil de ácidos grasos hepáticos completos se presenta en el **Anexo 8**. El efecto de la suplementación en el perfil de ácidos grasos saturados (AGS) muestra que el grupo DAG + DHA (f) presentó mayor acreción ($p < 0,05$) que los grupos DC (a), DC + HT (c) y DC + DHA + HT (d); por otro lado el grupo DAG + DHA + HT (h) presentó mayor cantidad de C16:0 (ácido palmítico) que los grupos DC (a), DC + HT (c) y

DC + DHA + HT (d). Los grupos DAG + DHA + HT (h) presento niveles de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) mayores ($p < 0,05$) que el grupo DC + HT (c); el grupo DAG + HT (g) presento mayores niveles de C18:1 (ácido oleico) que el grupo DC + DHA (b) ($p < 0,05$). En cuanto a los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) el grupo DAG + DHA (f) presento mayores niveles que los grupos DC (a) y DC + HT (c) ($p < 0,05$); el grupo DAG + DHA + HT (h) presento niveles de AGPI mayores ($p < 0,05$) que todos los grupos con dieta control con o sin suplementación, con mayor acreción de C18:2 n6 (ácido linoleico) y C18:3 n3 (ácido α -linolénico) ($p < 0,05$) en comparación con los grupos controles; así mismo el grupo DAG + DHA + HT (h) presenta una acreción de DHA significativamente mayor que los grupos DC (a), DC + HT (c), DAG (e), DAG + HT (g); también existen diferencias entre los grupos DC (a) y DC + DHA + HT (d), con mayor acreción en este ultimo grupo y el grupo DAG + DHA (b) presento mayores niveles de DHA que los grupos DC (a) y DC + HT (c). En la **Figura 5** se muestra el análisis de efectos netos de la acreción de DHA en el hígado, la mayor acreción se observa en la suplementación conjunta de DHA más HT en los animales con DAG ($p < 0,05$).

8.4.3. Triglicéridos (TG) en el hígado: En la **Figura 6** se observan los niveles de TG hepáticos en todos los grupos experimentales, donde los animales alimentados con dieta control presentan niveles menores ($p < 0,05$) que los animales con dieta alta en grasa con o sin suplementación. Los grupos DAG (e), DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) presentan niveles de TG hepáticos mayores que los grupos DC (a), DC + DHA (b), DC + HT (c) y DC + DHA + HT (d). El grupo DAG + DHA + HT (h) presenta niveles mayores de TG hepáticos en comparación con el grupo DC (a) ($p < 0,05$), la suplementación conjunta con DHA + HT en este grupo logro disminuir significativamente los niveles de TG hepáticos en comparación con el grupo DAG (e). El análisis de efectos netos muestra una disminución ($p < 0,05$) de la suplementación conjunta con DHA + HT (grupo h), respecto a las suplementaciones en los grupos controles.

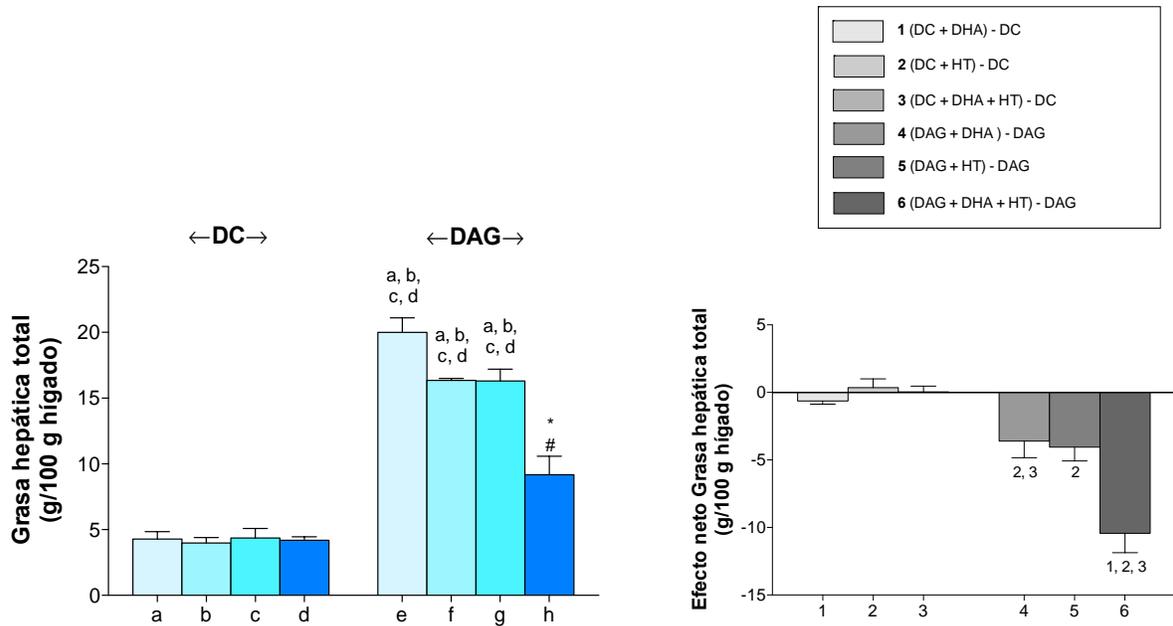


Figura 4: Grasa hepática total (g/100 g hígado). n= 8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

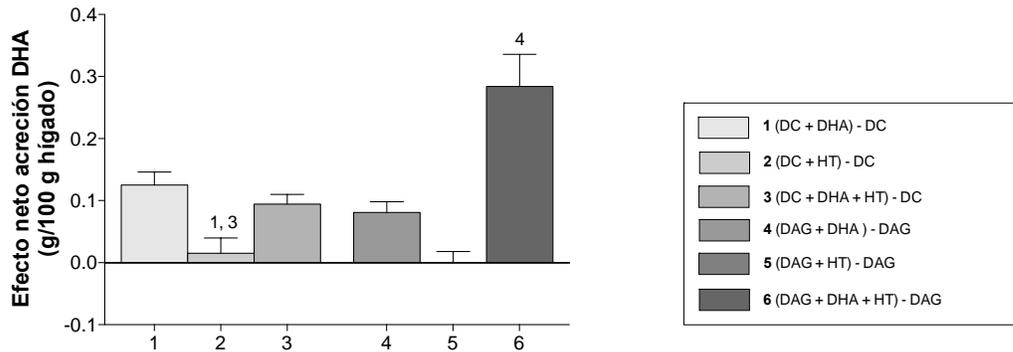


Figura 5: Efecto neto de la acreción hepática de DHA (g/100 g hígado). n= 8-10. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

8.4.4. Ácidos grasos libres (AGL) en el hígado: En la **Figura 7** se observa el nivel de AGL en todos los grupos experimentales, los cuales fueron significativamente mayores en el grupo DAG (e) en comparación a todos los grupos alimentados con dieta control con o sin suplementación. Los grupos DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) presentan mayores niveles que los grupos con dieta control, y una tendencia a disminuir los niveles de AGL en comparación con el grupo DAG (e). El grupo DAG + DHA + HT (h) presenta diferencias significativas con los grupos DC (a) y DAG (e), evidenciando una mayor cantidad de AGL hepáticos en este grupo que el grupo control, pero una disminución significativa con la suplementación conjunta en comparación con el grupo DAG. El análisis de efectos netos evidencia una disminución significativa de AGL hepáticos gracias a la suplementación con DHA (grupo f) y conjunta de DHA + HT (grupo h), respecto a las suplementaciones en los grupos controles.

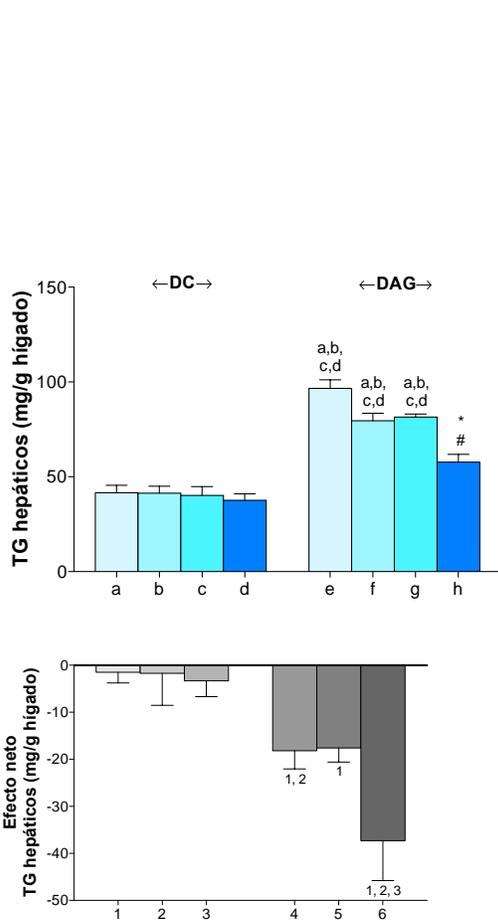


Figura 6: Triglicéridos (TG) hepáticos (mg/g hígado), n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

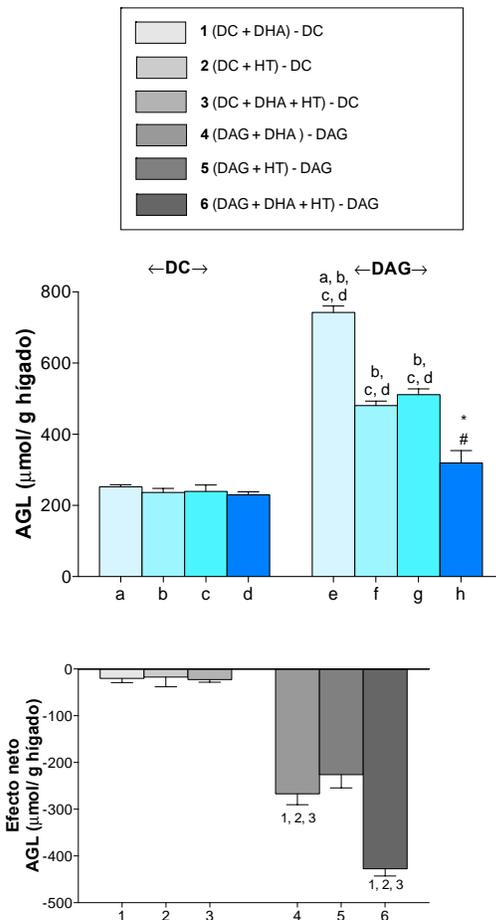


Figura 7: Ácidos grasos libres (AGL) hepáticos ($\mu\text{mol/g hígado}$), n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos hepáticos destacados por grupo experimental.

Ácido graso (g/100 g hígado)	Grupos experimentales							
	DC (a)	DC + DHA (b)	DC + HT (c)	DC + DHA + HT (d)	DAG (e)	DAG + DHA (f)	DAG + HT (g)	DAG + DHA + HT (h)
C16:0 Ácido Palmítico	0,305 (0,296 – 0,314)	0,3525 (0,346 – 0,359)	0,3135 (0,3 – 0,327)	0,32 (0,257 – 0,383)	0,344 (0,294 – 0,394)	0,357 (0,346 – 0,368)	0,336 (0,311 – 0,361)	0,6615 (0,556-0,767) ^{a,c,d}
C18:1 Ácido Oleico	0,2295 (0,217 – 0,242)	0,203 (0,202 – 0,204)	0,239 (0,226 – 0,204)	0,2135 (0,172 – 0,255)	0,278 (0,222 – 0,334)	0,2385 (0,226 – 0,251)	0,2675 (0,265 – 0,27) ^b	0,334 (0,204 – 0,464)
C18:2 n6 Ácido Linoleico	0,2185 (0,203 – 0,234)	0,199 (0,199 – 0,199)	0,204 (0,19,6 – 0,212)	0,235 (0,179 – 0,291)	0,251 (0,216 – 0,286)	0,3 (0,286 – 0,314) ^b	0,295 (0,283 – 0,307)	0,605 (0,503 – 0,707) ^{a,b,c,d}
C18:3 n3 Acido r Linolénico	0,002 (0,00 – 0,004)	0,0015 (0,00 – 0,003)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,007 (0,006 – 0,008)	0,0065 (0,006 – 0,007) ^{c,d}	0,007 (0,007 – 0,007) ^{c,d}	0,01275 (0,0105 – 0,015) ^{a,b,c,d}
C20:4 n6 (AA)	0,1375 (0,136 – 0,139)	0,0995 (0,096 – 0,103)	0,1435 (0,139 – 0,148)	0,104 (0,89 – 0,119)	0,2345 (0,221 – 0,248) ^{b,d}	0,1565 (0,159 – 0,174)	0,2335 (0,215 – 0,252) ^{b,d}	0,358 – 0,296 – 0,42) ^{a,b,d}
C20:5 n3 (EPA)	0,0025 (0,00 – 0,005)	0,0185 (0,018 – 0,019) ^a	0,005 (0,004 – 0,006)	0,0105 (0,00 – 0,021)	0,003 (0,002 – 0,004) ^b	0,0105 (0,008 – 0,013)	0,0025 (0,002 – 0,003) ^b	0,01925 (0,0175 – 0,021) ^{a,e,g}
C22:6 n3 (DHA)	0,12 (0,109 – 0,131) ^d	0,245 (0,235 – 0,255) ^{a,c}	0,135 (0,121 – 0,149)	0,2145 (0,188 – 0,241)	0,136 (0,122 – 0,15)	0,217 (0,214 – 0,22)	0,136 (0,132 – 0,14)	0,42 (0,354 – 0,486) ^{a,c,e,g}
AGS	0,454 (0,437 – 0,471)	0,5005 (0,5 – 0,501)	0,4365 (0,427 – 0,446)	0,4195 (0,344 – 0,495)	0,56 (0,481 – 0,639)	0,5685 (0,541 – 0,596) ^{a,c,d}	0,541 (0,481 – 0,601)	0,4415 (0,355 – 0,528)
AGMI	0,256 (0,241 – 0,271)	0,2295 (0,228 – 0,231)	0,27 (0,254 – 0,286)	0,2415 (0,197 – 0,286)	0,3025 (0,309 – 0,366)	0,2565 (0,245 – 0,268)	0,29 (0,289 – 0,291) ^b	0,43 (0,359 – 0,501)
AGPI	0,5065 (0,499 – 0,514)	0,5925 (0,575 – 0,61)	0,5205 (0,491 – 0,55)	0,5955 (0,483 – 0,708)	0,72 (0,671 – 0,769)	0,737 (0,72 – 0,754) ^{a,c}	0,71 (0,673 – 0,747)	1,488 (1,248 – 1,728) ^{a,b,c,d}
AG totales	1,217 (1,192 – 1,241)	1,322 (1,302 – 1,342)	1,228 (1,172 – 1,283)	1,257 (1,024 – 1,489)	1,583 (1,391 – 1,774)	1,562 (1,506 – 1,618)	1,542 (1,444 – 1,639)	2,936 (2,462 – 3,41) ^{a,b,c,d}

Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico de gramos (g) de ácidos grasos por cada 100 g de hígado; n=8-10. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental: DC (a), DC + DHA (b), DC + HT (c), DC + DHA + HT (d), DAG (e), DAG + DHA (f), DAG + HT (g), DAG + DHA + HT (h). Ácidos grasos saturados (AGS) corresponden al total de: C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 y C24:0. Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) corresponden al total de: C14:1, C16:1, C18:1, C20:1 n9, C22:1 n9, C24:1. Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) corresponden al total de: C18:2 n6, C18:3 n6, C18:3 n3, C20:2 n6, C20:3 n6, C20:3 n3, C20:4 n6 (ácido araquidónico, AA), C20:5 n3 (ácido eicosapentaenoico, EPA), C22:5 n3, C22:6 n3 (ácido docosahexaenoico, DHA).

C. Objetivo b.

8.5. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α de los distintos grupos experimentales.

En la **Figura 8A** se presentan los resultados del % de actividad de unión al ADN de PPAR de todos los grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con dieta control con o sin suplementación. Se observa una disminución ($p < 0,05$) en el grupo DAG (e), respecto de todos los grupos controles; los grupos DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) presentan menor actividad de unión al ADN que los grupos DC + DHA (b) y DC + DHA + HT (d). El grupo suplementado con DAG + DHA + HT (h) presenta un aumento significativo en la actividad de unión al ADN en comparación con el grupo DAG (e) ($p < 0,05$), sin presentar diferencias con ninguno de los grupos controles con o sin suplementación. Respecto a los efectos netos se logra observar que en los grupos con DAG y suplementación existió un aumento en la actividad de unión al ADN de PPAR α ; la suplementación conjunta con DHA + HT en la DAG presenta un aumento significativo ($p < 0,05$) en comparación con las suplementaciones de los grupos controles.

8.6. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el porcentaje de actividad de unión al ADN de Nrf2 de los distintos grupos experimentales.

En la **Figura 8B** se presentan los resultados del % de actividad de unión al ADN de Nrf2 de todos los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dieta control. El grupo DAG (e) presenta mayor actividad de unión al ADN de Nrf2 que todos los grupos controles ($p < 0,05$); el grupo DAG + DHA (f) tiene mayor actividad que los grupos DC (a) y DC + DHA (b). EL grupo DAG + HT (g) no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos controles; y DAG + DHA + HT (h) presenta una actividad de unión al ADN mayor ($p < 0,05$) que le grupo DC (a). Al analizar los efectos netos se observa una disminución significativa con la suplementación en conjunto de DHA + HT, en la actividad de unión al ADN de Nrf2, en animales alimentados con dieta alta en grasa, en comparación con las suplementaciones de los grupos controles.

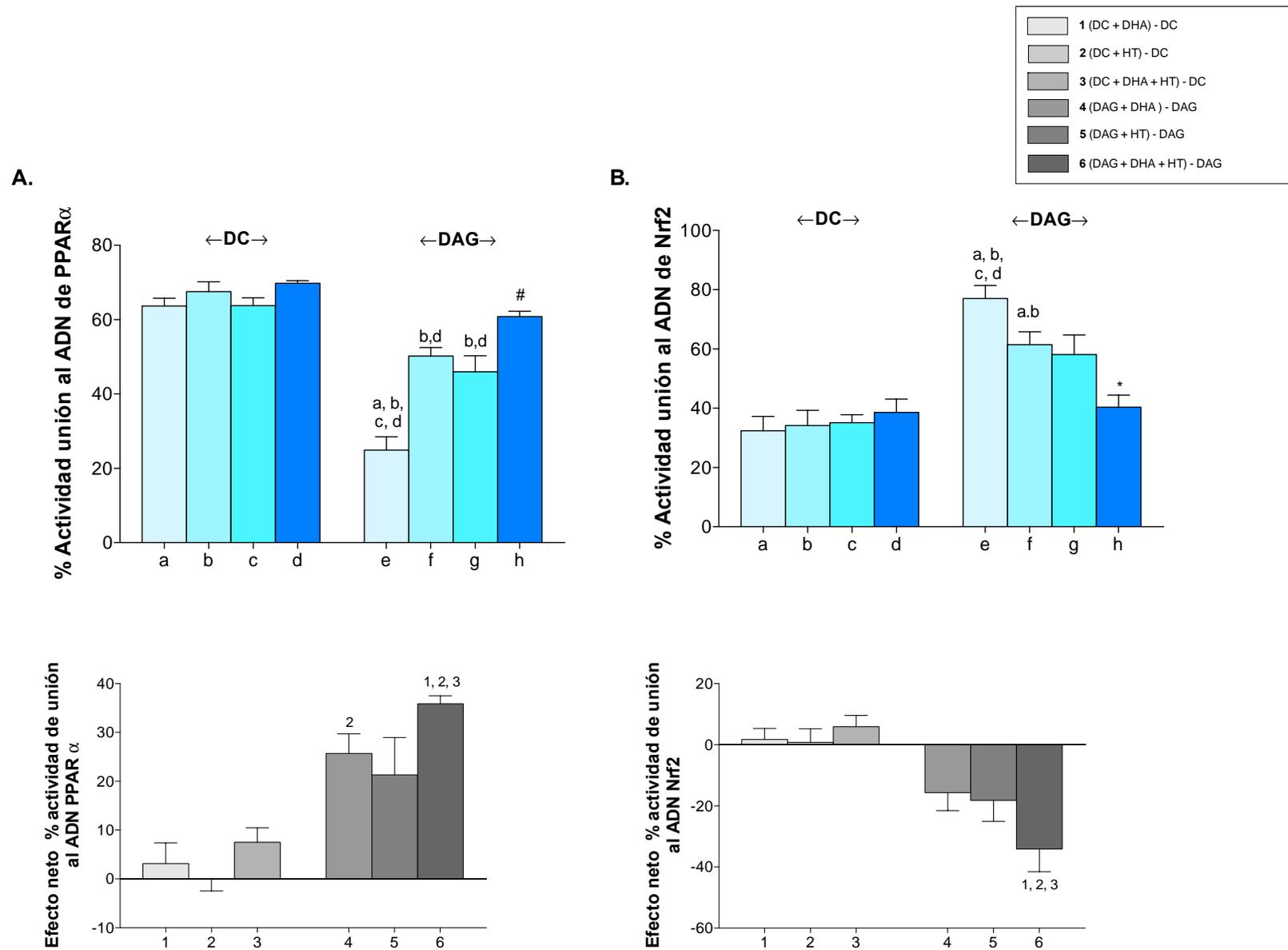


Figura 8: Actividad de unión al ADN de PPAR α (A) y Nrf2 (B) en hígado (%). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por los números que representan a cada grupo experimental.

D. Objetivo c.

8.7. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica hepática (ARNm) de PPAR α y Nrf2 de los distintos grupos experimentales.

La **Figura 9A** muestra los niveles hepáticos de ARNm de PPAR relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Se puede observar que existe un aumento ($p < 0,05$) en los grupos DC + DHA (b), DC + DHA + HT (d), DAG + DHA (f) siendo este grupo el que presenta mayor aumento en la expresión relativa de PPAR (3,7766 veces más que el grupo control) y DAG + HT (g). El grupo DAG + DHA + HT (h), presenta un aumento en la expresión de PPAR, respecto al grupo control ($p < 0,0001$). El análisis de efectos netos evidenció un aumento en la expresión, con todas las suplementaciones en los grupos DAG, en comparación con la suplementación solo de HT en la dieta control.

Los niveles hepáticos de ARNm de Nrf2 de todos los grupos experimentales se muestran en la **Figura 9B** relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a). Se muestra en la figura un aumento de la expresión relativa ($p < 0,05$) en los grupos DC + HT (c), DC + DHA + HT (d), DAG (e), DAG + HT (g), siendo este último grupo el que presenta el mayor aumento (0,834 veces más que el grupo control). En cuanto al grupo DAG + DHA + HT (h), se observa un aumento en la expresión de Nrf2, en comparación con el grupo control ($p 0,0026$). El análisis del efecto neto evidencia una disminución en la expresión en las dietas altas en grasas suplementadas con DHA e HT por separado, en comparación con la suplementación conjunta en la dieta control.

E. Objetivo d.

8.8. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica hepática (ARNm) de CPT1a y ACOX1 de los distintos grupos experimentales.

En la **Figura 10A** se observan los niveles de ARNm de CPT1a relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Se muestra un aumento en la expresión de los grupos DAG (e), DAG + DHA (f) y DAG + HT (g), siendo

mayor el aumento en el grupo con DAG (e) (1,6 veces más que el grupo control). La suplementación conjunta de DHA + HT en el grupo DAG (h) no muestra diferencias significativas con el grupo DC (a). El análisis de efectos netos evidencian un aumento significativo en la expresión de CPT1a en la suplementación de DHA + HT, en los animales controles, en comparación con la suplementación sola de HT; efecto que no se ve en los animales con DAG.

En la **Figura 10B** se encuentran los niveles de ARNm hepático de ACOX1 relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Se observa un aumento ($p < 0,05$) en la expresión de ACOX1 en los grupos DAG + HT (g) y DAG + DHA + HT (h), siendo mayor el aumento en este último grupo (4,4 veces más que el grupo control). No se observan diferencias significativas en el resto de los grupos suplementados. El análisis de efectos neto evidencia un aumento significativo en la expresión hepática de ACOX1 frente a una DAG al suplementarla con DHA + HT, en comparación con la suplementación por separado de DHA e HT en los grupos controles.

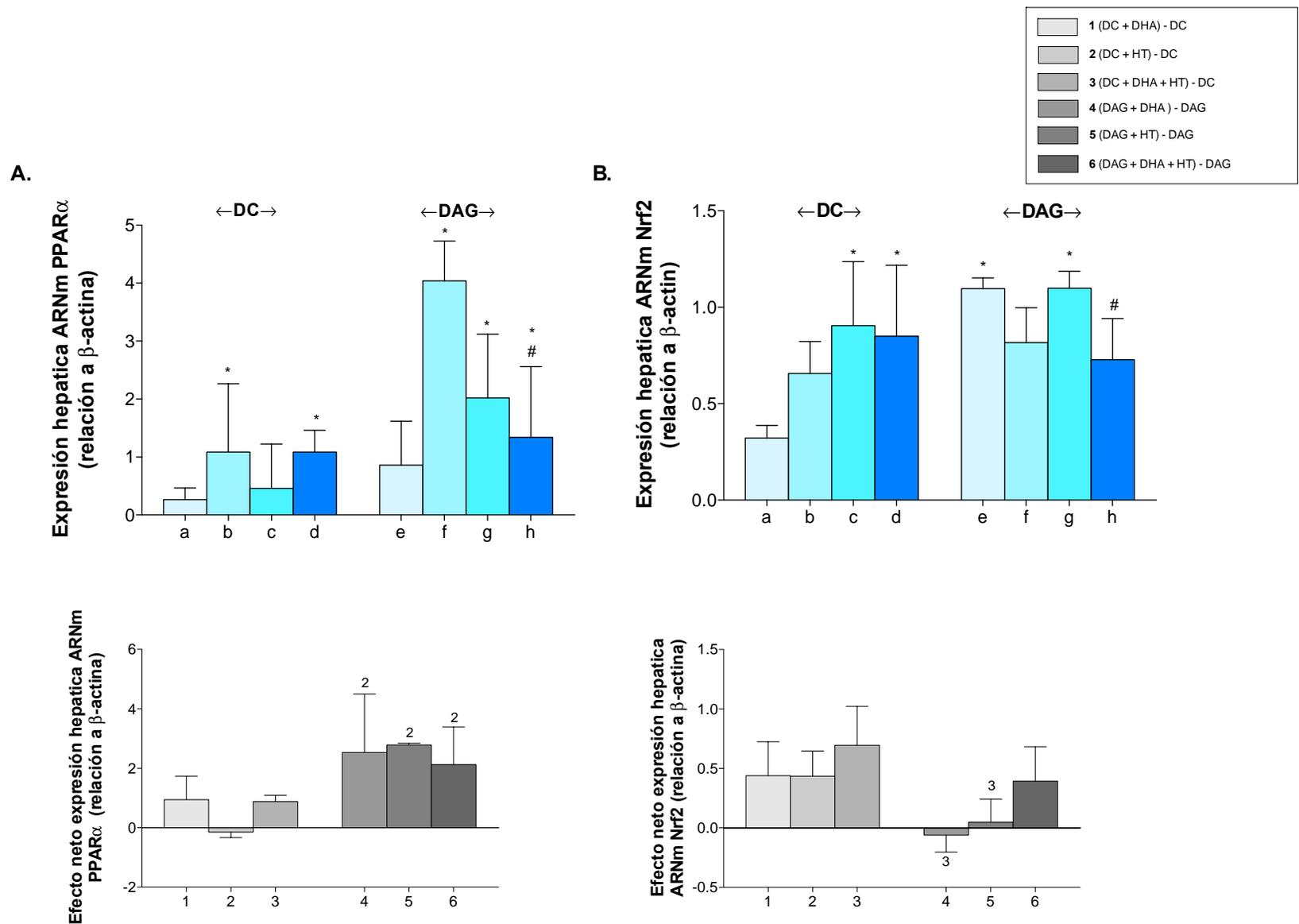


Figura 9: Expresión génica hepática PPAR (A) y Nrf2 (B) (ARNm). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones en relación al grupo DC (a) están indicadas por (*). Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

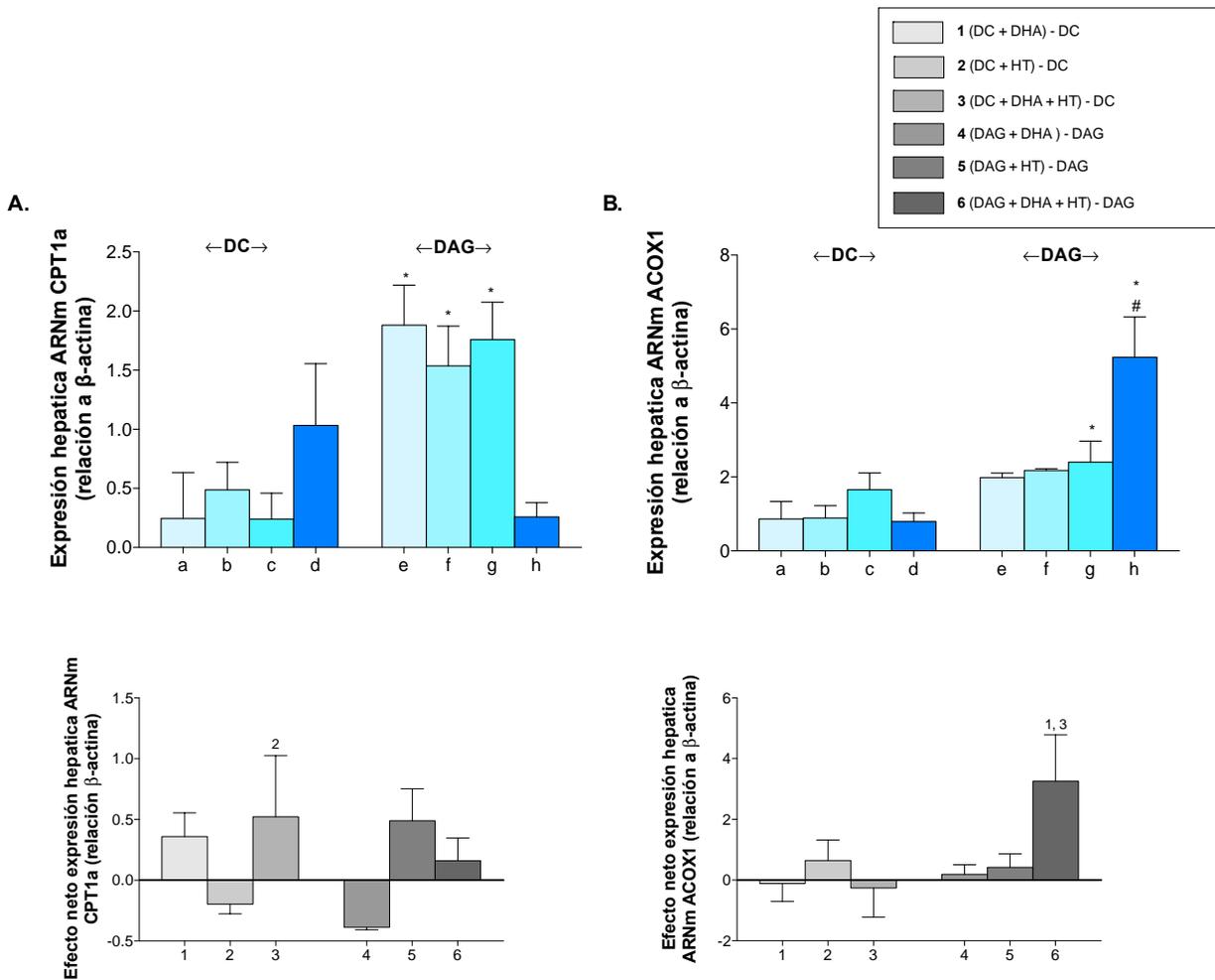


Figura 10: Expresión génica hepática CPT1a (A) y ACOX1 (B) (ARNm). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones en relación al grupo DC (a) están indicadas por (*). Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

8.9. Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica hepática (ARNm) de Gclc y GSTa3 de los distintos grupos experimentales.

La **Figura 11A** muestra los niveles de ARNm hepático de Gclc relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Se observa un aumento en la expresión génica todos los grupos alimentados con DAG con o sin suplementación. El mayor aumento en la expresión relativa se observa en el grupo DAG + DHA + HT (h) (12 veces mayor que el grupo control). El efecto neto de la suplementación conjunta de DHA + HT es mayor en aumentar la expresión relativa de Gclc en comparación con la suplementación por separado en animales alimentados con DAG ($p < 0,05$).

En la **Figura 11B** se observan los niveles de ARNm de GSTa3 relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Existió un aumento relativo en la expresión de los grupos DC + DHA + HT (d), DAG (e), DAG + DHA (f) y DAG + DHA + HT (h); observándose un mayor aumento en el grupo DC + DHA + HT (d) (2 veces mayor que el grupo control). El análisis de efectos netos muestra un aumento en la expresión con cualquiera de las suplementaciones sin llegar a ser significativo en los animales con DAG.

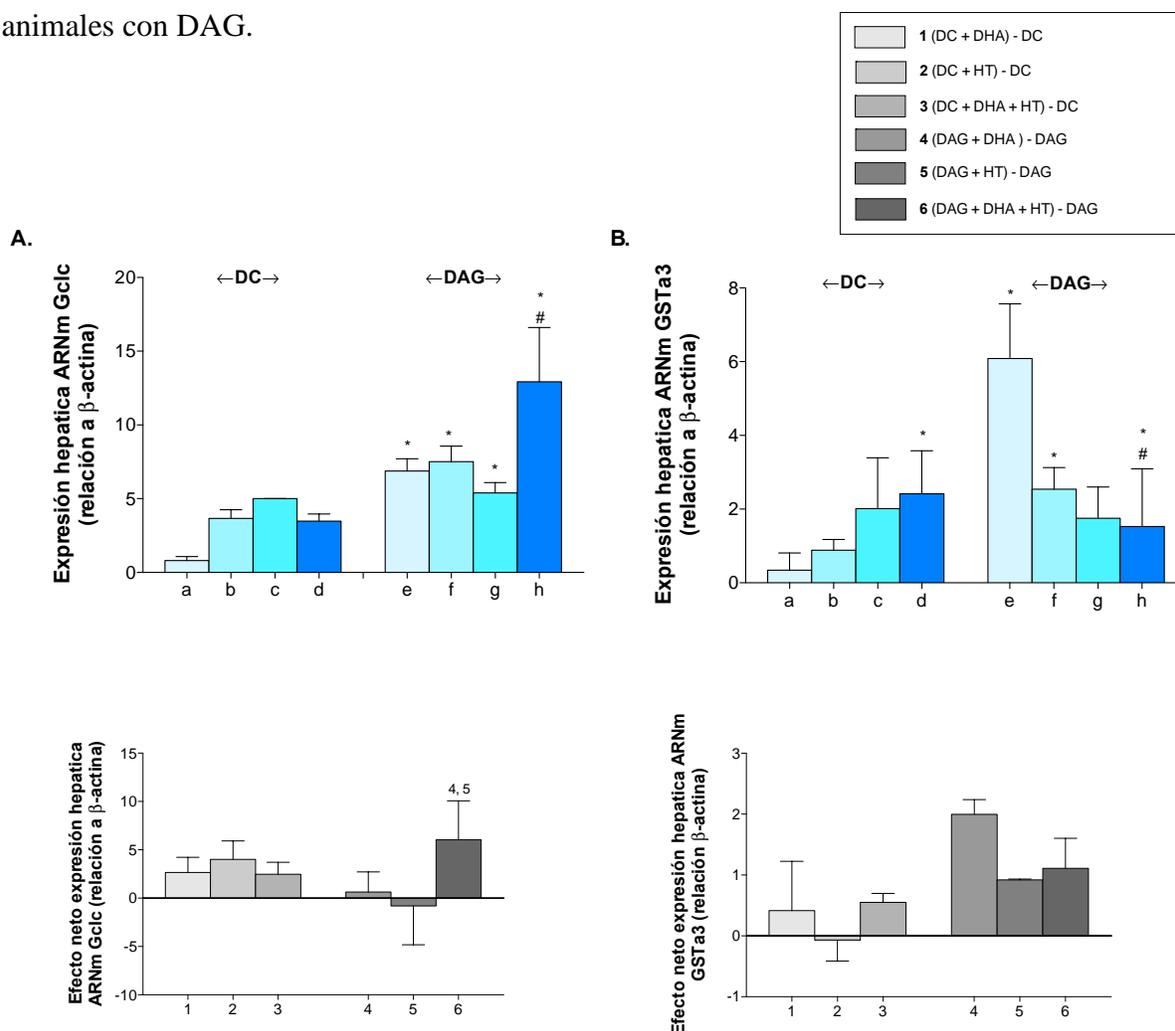


Figura 11: Expresión génica hepática Gclc (A) y GSTa3 (B) (ARNm). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones en relación al grupo DC (a) están indicadas por (*). Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

F. Objetivo e.

8.10. Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles hepáticos de RD1 de los distintos grupos experimentales.

En la **Figura 12** es posible observar los niveles hepáticos de RD1 en los animales de los distintos grupos experimentales. No se observan diferencias significativas entre los animales alimentados con dieta control con o sin suplementación; se observó un aumento ($p < 0.05$) en los niveles de RD1 en los grupos DAG (e) respecto al grupo DC + HT (c); el grupo DAG + DHA (f), respecto a todos los grupos control y DAG + DHA + HT (h) respecto a los grupos DC (a), DC + HT (c) y DAG (e); siendo el mayor aumento ($p < 0.05$) en el grupo DAG + DHA (f). En el análisis de efectos netos se observa un aumento ($p < 0,05$) de los niveles de RD1 en la suplementación con DHA solo o en conjunto con HT, lo cual disminuye con la suplementación con HT por si solo, en los animales alimentados con DAG.

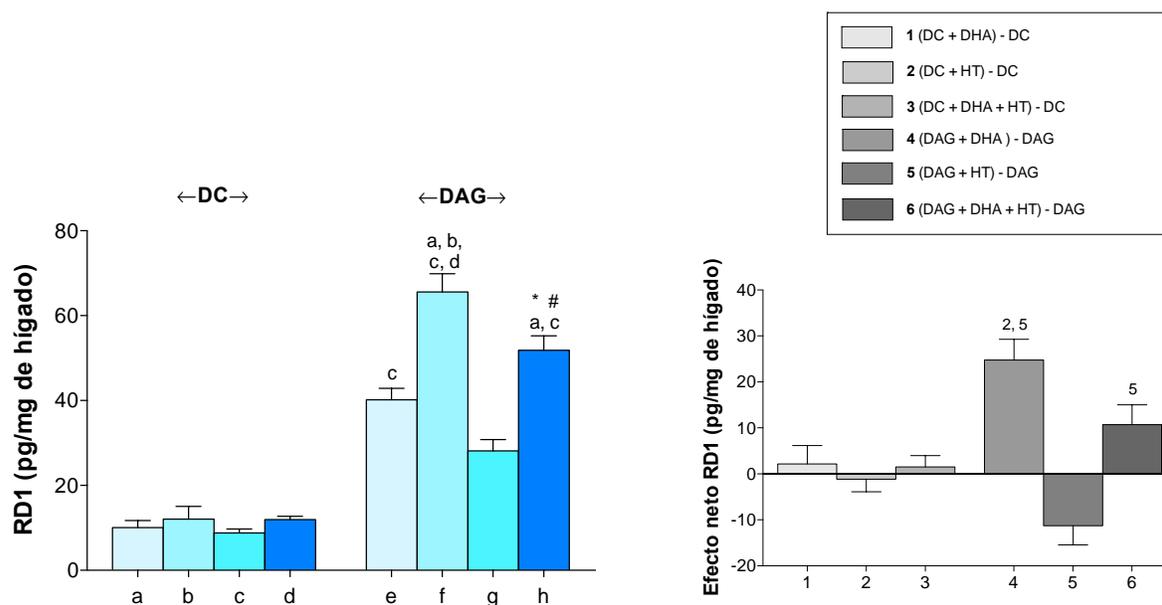


Figura 12: Niveles hepáticos de RD1 (pg/mg). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

G. Objetivo f.

8.11. Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles séricos y la expresión génica hepática (ARNm) de FGF-21 de los distintos grupos experimentales.

Los niveles séricos de FGF-21 se muestran en la **Figura 13A**, no se observan diferencias significativas entre los grupos controles con o sin suplementación. Existe un aumento en los niveles séricos de FGF-21 en el grupo DAG (e) vs. todos los grupos controles con o sin suplementación. Por otro lado se observa un aumento en los niveles en el grupo DAG + DHA (f) en comparación con el grupo DC + DHA (b); el grupo DAG + HT (g) presenta un aumento de FGF-21 en suero vs. los grupos DC + DHA (b) y DC + DHA + HT (d). El grupo DAG + DHA + HT (h) no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos controles con o sin suplementación, y presenta una disminución en los niveles de FGF-21 en comparación con el grupo DAG (e) ($p < 0,05$). El análisis de efectos netos evidencia una disminución de los niveles de FGF-21 con cualquier suplementación en los animales con DAG, siendo significativa en la suplementación conjunta de DHA más HT en comparación con los grupos controles.

En la **Figura 13B** se muestran los niveles de ARNm hepático de FGF-21 relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Se observa un aumento significativo en la expresión hepática en el grupo DAG (e), siendo el mayor aumento observado (5,4 veces mayor que el grupo control); los grupos DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) también presentan un aumento ($p < 0,05$). Se observa un aumento significativo en la expresión de FGF-21 en el grupo DAG + DHA + HT (h) vs. el grupo DC (a) ($p < 0,0002$). Los efectos netos muestran una disminución significativa de la expresión hepática de FGF-21 con las suplementaciones de DHA e HT por si solos o en conjunto en los grupos alimentados con DAG.

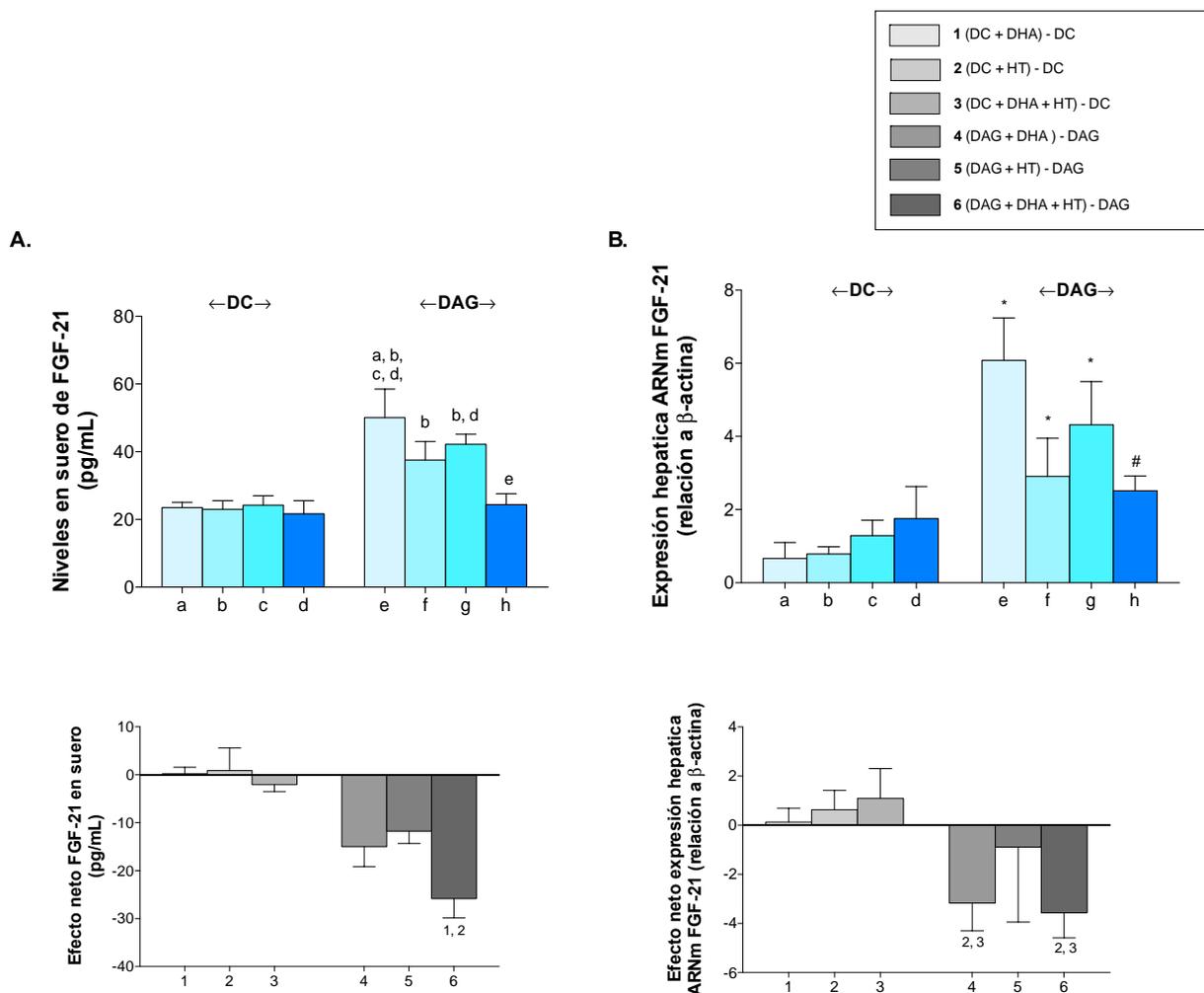


Figura 13: Niveles séricos de FGF-21 (pg/mL) (A). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental. **Expresión génica hepática FGF-21(ARNm) (B).** Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones en relación al grupo DC (a) están indicadas por (*). Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

H. Objetivo g.

8.12. Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles hepáticos de colesterol total y la expresión génica hepática (ARNm) de HMGC_oA Reductasa de los distintos grupos experimentales.

La **Figura 14A** muestra los niveles hepáticos de colesterol total, observándose un aumento significativo en los grupos DAG (e), DAG + DHA (f) y DAG + HT (g) en comparación con los grupos control con o sin suplementación. El grupo DAG + DHA + HT (h) presenta un aumento significativo en los niveles de colesterol hepático vs. grupo control (a) ($p < 0,0001$) y una disminución en comparación con el grupo DAG (e) ($p < 0,0001$). El análisis de efectos netos muestra una disminución significativa de la suplementación DHA e HT por si solos o en conjunto en los animales alimentados con DAG, no así en los grupos alimentados con dieta control.

En la **Figura 14B** se observan los niveles de ARNm hepático de HMGC_oA Reductasa relativo a β -actina en comparación con el grupo DC (a) de todos los grupos experimentales. Se observa un aumento ($p < 0,05$) en los grupos DC + DHA (b), DAG + DHA (f) y DAG + HT (g); el mayor aumento se observa en el grupo DAG (e) (12,9 veces mayor que el grupo control), también se observa un aumento significativo ($p < 0,0002$) de la expresión relativa de HMGC_oA Reductasa en el grupo DAG + DHA + HT (h). El análisis de efectos netos muestran que las suplementaciones con DHA e HT en conjunto o por separado genera una disminución en la expresión de HMGC_oA Reductasa en aquellos animales alimentados con DAG, efecto que no se observa en los grupos control.

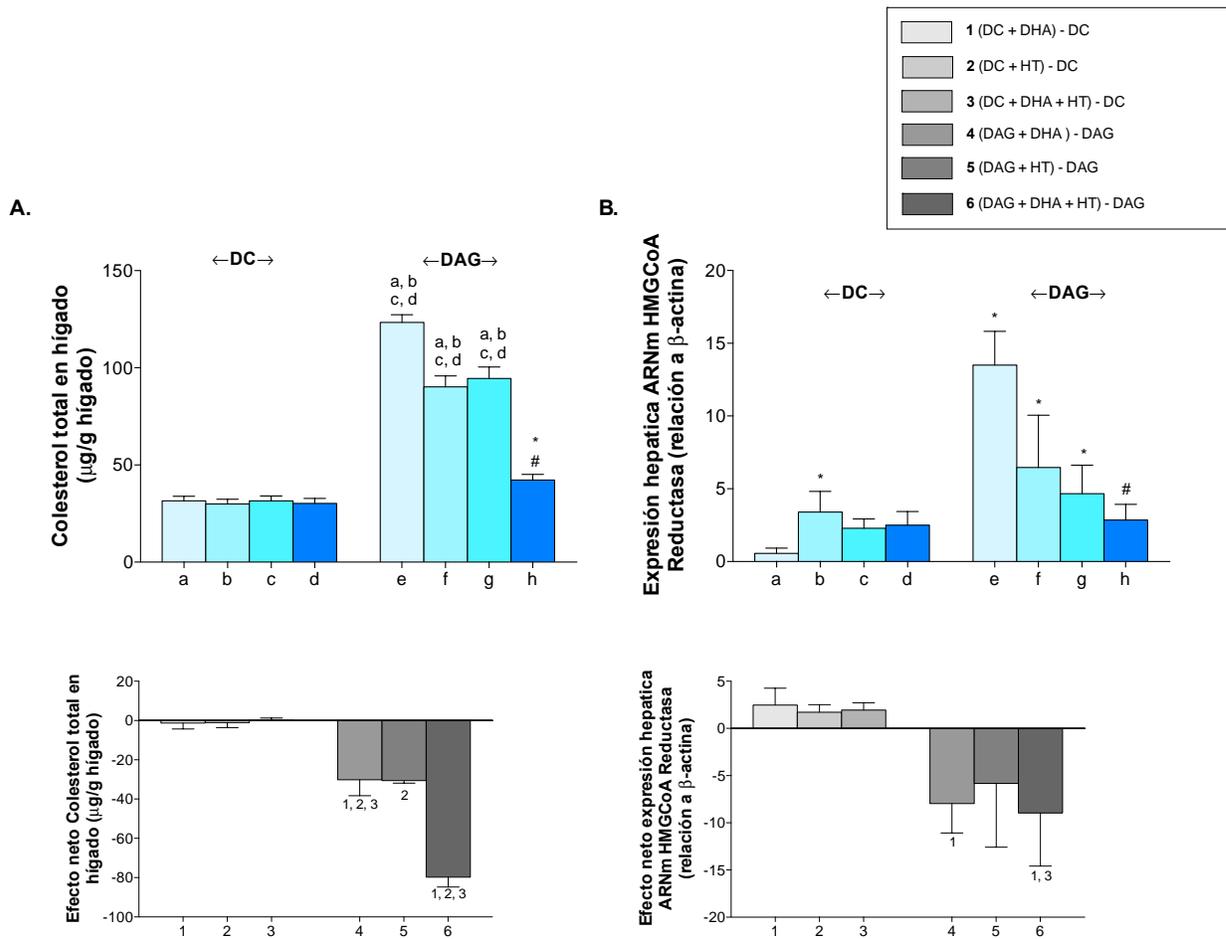


Figura 14: Niveles hepáticos de Colesterol total (~g/g hígado) (A). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental. **Expresión génica hepática HMGCoA Reductasa (ARNm) (B).** Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones en relación al grupo DC (a) están indicadas por (*). Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

I. Correlaciones.

Se encontró una asociación negativa ($p < 0,0001$) entre los niveles hepáticos de RD1 (pg/mg) y el porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α (Figura 15A) y entre los niveles séricos de FGF-21 (pg/mL) y el porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α ($p < 0,0001$) (Figura 15B).

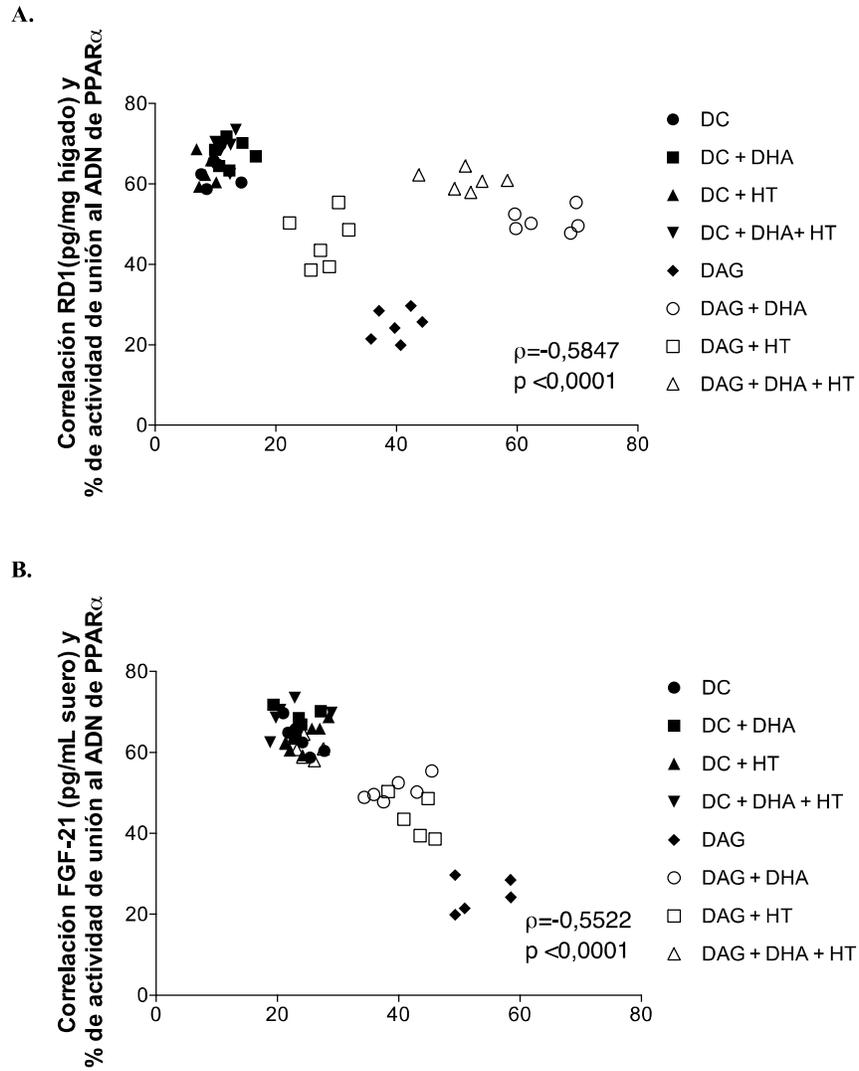


Figura 15: Correlación entre niveles hepáticos de RD1 (pg/mg hígado) y porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α (A). Correlación entre niveles séricos de FGF-21 (pg/mL) y porcentaje de actividad de unión al ADN de PPAR α (B). n=8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Significancia estadística $p < 0,05$. Análisis estadístico: Coeficiente de correlación de Spearman.

9. Discusión

La intervención realizada en modelo animal de esteatosis hepática inducida por DAG, logra mostrar que la suplementación conjunta con DHA más HT es capaz de reducir la enfermedad por hígado graso no alcohólico, y que a su vez, existe una activación de PPAR α y Nrf2 lo cual podría contribuir a los efectos sobre la esteatosis hepática.

La intervención fue llevada a cabo en un modelo animal de ratón macho C57BL/6J sometido a una DAG, con un aporte de 60% de calorías en forma de grasa, que incluyo 10,6 g de AGS/100g dieta, especialmente ácido palmítico (C16:0) aportando 6,5 g/100 g de dieta. La DAG es un método nutricional común para inducir EHGNA en modelos de investigación animal, debido a su similitud con una dieta alta en grasa occidental; siendo capaz de generar un aporte directo de lípidos dietarios al hígado a través de los quilomicrones y su degradación lisosomal (72). En ratones C57BL/6J, la DAG ha logrado inducir obesidad, RI y rasgos histopatológicos similares a los humanos con EHGNA (69), siendo capaz de provocar estrés oxidativo y de retículo, llevando a apoptosis del hepatocito (73), y al desarrollo de esteatosis hepática (73,74).

Efecto sobre características generales y control de ingesta

Diversos autores han reportado que la DAG en modelo de ratón es capaz de inducir la EHGNA asociado a condiciones como la obesidad, sin que existan diferencias significativas en la ingesta de alimento diario (26,69); algo similar sucede en esta intervención, un mayor peso corporal es observado en los animales alimentados con DAG, atribuible preferentemente a una mayor masa de tejido adiposo, representando un 11,6% del peso corporal, mientras que en el grupo control representa solo a un 3,6% (**Tabla 8**). La ingesta en los animales control no presento diferencias en cuanto a la cantidad de alimento, sin embargo existe un mayor consumo calórico y por lo tanto de todos los macronutrientes por parte de los animales alimentados con DAG (**Anexo 5**). Los resultados de la intervención evidencian que la suplementación con DHA o con DHA + HT es capaz de brindar una protección frente a la ganancia de peso total; la entrega de DHA + HT fue capaz de disminuir la masa de tejido adiposo en los ratones alimentados con DAG, representando solo un 6,5% del peso corporal y disminuir el tamaño del hígado a valores

incluso menores que el de los animales controles. Efectos similares se han observado en otras intervenciones que suplementan con AGPI n3 a través del uso de Rosa Mosqueta, donde los ratones alimentados con DAG y Rosa Mosqueta, alcanzaron un peso corporal final 19% menor que los ratones DAG; así mismo la grasa visceral fue 34% menos en la suplementación con Rosa Mosqueta (75).

Efecto sobre la esteatosis y daño hepático

Como se mencionó anteriormente la DAG es un modelo nutricional que refleja correctamente tanto la histopatología y patología de la EHGNA en humanos (69,76), con desarrollo de obesidad, RI, estrés oxidativo y de retículo, llevando a apoptosis del hepatocito (73), y al desarrollo de esteatosis (73, 74). En esta camada los animales alimentados con DAG por 12 semanas desarrollaron un cuadro de esteatosis macro y microvesicular en un 60% de los campos estudiados, además indujo una alteración a la histoarquitectura y desplazamiento del núcleo. Algo similar ocurre en un estudio realizado por Tapia y cols., la dieta alta en grasa indujo esteatosis micro y macrovesicular, alteración de la arquitectura, focos de necrosis e inflamación moderada, situación prevenida con la suplementación con AGPICL n3 (EPA + DHA) donde solo se observaron pequeños focos de esteatosis (26). En este estudio la suplementación conjunta con DHA + HT, logra disminuir de forma significativa los focos de esteatosis hepática tanto macro como microvesicular a un 10 a 20% de los campos estudiados aproximadamente.

Por otro lado, las transaminasas hepáticas son pruebas bioquímicas que informan sobre lesión hepática y representan enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido acetoglutarico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico. Tanto AST y ALT presentan valor clínico, siendo ALT más específica para daño hepático, ya que se localiza exclusivamente en el citosol del hepatocito, no como AST que también se encuentra en el corazón, riñones, entre otros órganos (77). Valores elevados de transaminasas hepáticas se han observado en estudios de esteatohepatitis, Rastogi y cols. reportaron una asociación entre el diagnóstico de esteatohepatitis y mayores niveles séricos de AST y ALT, así como colesterol total y LDL, en 1000 biopsias hepáticas de sujetos diagnosticados con EHGNA (78). En esta investigación el daño hepático observado en las histologías no se refleja en los niveles

séricos de transaminasas, donde AST y ALT no muestran diferencias significativas pese a la DAG y las suplementaciones (**Figura 3**). Estudios de este mismo grupo tampoco reportan elevaciones en los niveles de transaminasas hepáticas, bajo las mismas condiciones experimentales que esta investigación (79). Por lo tanto es presumible afirmar que la intervención dietaria de 12 semanas con DAG en este estudio no indujo una esteatohepatitis, solo una esteatosis hepática moderada, como se observa en las histologías (**Figura 2A**).

Efecto sobre el contenido y perfil lipídico hepático

En esta investigación los animales alimentados con DC con o sin suplementación no presentan diferencias significativas en cuanto al contenido hepático de grasa total (**Figura 4**), TG (**Figura 5**) y AGL (**Figura 6**); sin embargo la DAG fue capaz de aumentar significativamente los niveles de las tres variables mencionadas; lo mismo se observa en un estudio realizado por Valenzuela y cols. donde la dieta alta en grasa aumenta significativamente la grasa total, TG y AGL en 69 mg/g hígado, 63,4 mg/g hígado y 468,1 μ M/g hígado, respectivamente (80). La suplementación con DHA e HT por separado no logro revertir el alza en los niveles de grasa total hepática, TG y AGL; no así la suplementación conjunta de DHA + HT, la cual logro disminuir de forma significativa los niveles de las tres variables, respecto al grupo DAG, sin alcanzar la normalidad; lo mismo se ha visto con la suplementación conjunta de AGPICL n3 + EVOO en ratones con dieta alta en grasa (80).

Pese al contenido elevado de grasa total en el grupo DAG + DHA + HT en comparación con el grupo control, el perfil de AG hepáticos difiere considerablemente del grupo DC y DAG. Los resultados de esta investigación indican que la alimentación con DAG y sin suplementación es capaz de inducir un perfil de AG donde existe una mayor cantidad de AGPICL n6, especialmente AA (C20:4 n6), mientras que existe una menor cantidad de EPA (C20:5 n3), en comparación con el grupo control con HT, y menor cantidad de DHA (C22:6 n6) sin ser estadísticamente significativo, provocando un desbalance de AGPICL n6/n3, situación bastante común en sujetos con la EHGNA (80) (**Tabla 9**); algo similar observó Pettinelli y cols. en humanos con obesidad, los cuales presentaron una depleción hepática de DHA de un 57% (81).

Por otro lado, la DAG ha mostrado ser eficiente en aumentar el contenido de AGS, principalmente el ácido palmítico, lo que se normaliza con la suplementación de AGPICL n3 + EVOO (80) o con la suplementación solo de EVOO (82). El alto contenido de AG en la dieta ha mostrado llevar a una depleción de AGPI, especialmente AGPICL n3 tanto en ratones como humanos, que va de la mano con una baja actividad de PPAR α y Nrf2 (81); en esta investigación se observa una baja en la DAG de la actividad de PPAR α y no así de Nrf2 que aumento su actividad bajo estas condiciones, presumiblemente debido a la injuria celular producida y la necesidad de resolverla mediante la activación del sistema antioxidante celular (58,59).

El aporte lipídico de la dieta (**Tabla 6**), que muestra una ingesta de ácido linoleico (C18:2 n6) de 1,4 g/100 g dieta control vs. 7,3 g/100g dieta alta en grasa y de ALA (C18:3 n3) de 0,167 g/100g dieta control vs. 0,543 g/100 g DAG, estaría afectando los niveles de AA, EPA y DHA de los ratones en el grupo DAG + DHA + HT, ya que el metabolismo de los AG aportados por la dieta involucra entre otras cosas, la transformación de AG esenciales (ácido linoleico y ALA) en AG fundamentales para el organismo como el AA y DHA. En este contexto la DAG aporta un gran cantidad de ALA y ácido linoleico en comparación con la DC, los cuales en el organismo producen AGPICL de la serie n6, como el AA y de la serie n3, como EPA y DHA, mediante una serie de reacciones que toman lugar en el retículo endoplásmico y comprenden una serie de desaturaciones (insertar dobles enlaces a la cadena hidrocarbonada de los AG), elongaciones (adición de 2 carbonos a la cadena hidrocarbonada de AG) y además retroconversión metabólica gracias a la β -oxidación (acortamiento de la cadena hidrocarbonada) en los peroxisomas (15). Entre las enzimas que participan en estas reacciones encontramos a la Δ 5 y Δ 6 desaturasas, diversos estudios han mostrado que una dieta alta en grasa es capaz de disminuir la expresión hepática de las mismas en comparación con los grupos controles (83), Valenzuela y cols. determino una disminución de 41,6% en la actividad hepática de Δ 5 desaturasa y 61% en la actividad hepática de Δ 6 desaturasa, seguido a una DAG en ratones, lo que produjo depleción hepática de AGPICL n3 (84); lo anterior afecta la acreción de AG en el hígado, situación revertida por la suplementación con EPA o DHA; además debido a que las enzimas Δ 5 y Δ 6 desaturasas participan en las vías metabólicas de ambos AG esenciales, se produce una

competencia entre los AG, al existir una mayor cantidad en dieta de ácido linoleico, se produciría una mayor cantidad de sus derivados (AA); por otro lado el consumo elevado de ALA ha mostrado aumentar la acreción de AGPICL n3 y la actividad y expresión de $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas (82).

La suplementación conjunta de DHA + HT, presento elevados niveles hepáticos de EPA y DHA, debido a que en primer lugar se suplemento DHA de forma directa vía oral y además la dieta aporta ALA, que mediante su metabolización genera EPA. Esto concuerda con otros estudios que determinan que la suplementación con DHA en pacientes con deficiencia en AGPICL n3 resulta en un aumento de EPA y DHA a nivel plasmático (85). Es importante destacar que el grupo DAG + DHA + HT presenta mayor acreción de DHA incluso al compararlo con los otros grupos suplementados con DHA tanto en dieta control y dieta alta en grasa, sugiriendo que la protección antioxidante del HT, mejora la acreción del DHA posiblemente al evitar la alta lipoperoxidación de los AGPICL.

Efecto sobre actividad de unión al ADN y ARNm hepático de PPAR γ y sus genes blancos regulados (ARNm CPT1a y ACOX1)

PPAR α es un factor de transcripción altamente expresado en el tejido hepático de ratón y humano, su expresión en ratones es 10 veces mayor que en el hígado humano (86); puede ser activado por gran variedad de AGS y AGI, incluyendo el ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2 n6), AA (C20:4 n6), EPA (C20:5 n3) y DHA (C22:6 n3) (86). Un estudio que evaluó la administración conjunta de DHA con hormona tiroidea T3 en ratas Sprague-Dawley, fue capaz de elevar significativamente la expresión hepática de PPAR α (71%), y sus genes blancos CPT1a (151%) y ACOX1 (176%) (29). En esta investigación la expresión hepática de PPAR α aumento de forma significativa en todos los grupos suplementados con DHA (DC + DHA; DC + DHA + HT; DAG + DHA; DAG + DHA + HT) y además en el grupo DAG + HT. El grupo alimentado con DAG no presento diferencias significativas con el grupo control en cuanto a la expresión (ARNm), pero la actividad de unión al ADN disminuyo de forma significativa (**Figura 8A y 9A**), concordando con lo observado en diversos estudios que han mostrado que en ratones, la dieta alta en grasa es capaz de disminuir la expresión de PPAR α y actividad de unión al ADN, así como la expresión de sus genes regulados como CPT1a y ACOX1, lo que es

revertido por el DHA, aumentado en un 103% la expresión de ACOX1 y también la de PPAR α (87). Gonzalez-Mañan y cols., en 2017, mostraron que la DAG en ratones regula negativamente la concentración de PPAR α en un 46% (75), la suplementación con Rosa Mosqueta (rico en AGPI n3) disminuye la esteatosis hepática y aumenta la concentración nuclear y actividad de PPAR α hasta llevarlo a valores controles (75), situación similar se observa en esta investigación donde la actividad de unión al ADN de PPAR α , en los ratones suplementados con DHA + HT aumenta sus valores, normalizándolos. El grupo DAG + DHA + HT, muestra un aumento en la expresión de PPAR α respecto al grupo control, lo mismo han reportado otros autores donde ratones C57BL/6J alimentados con DAG y suplementados con AGPICL n3 (200 mg de EPA + DHA), aumentan los niveles de PPAR α y ACOX1 (26).

En cuanto a los genes blanco de PPAR α , la expresión hepática (ARNm) de CPT1a se vio aumentada en todos los grupos DAG, excepto en el grupo suplementado con DHA + HT que presentó una normalización de sus valores (**Figura 10A**). En cuanto a ACOX1 su expresión se vio significativamente aumentada bajo la suplementación conjunta de DHA + HT (**Figura 10B**), concordando con lo reportado por otros autores. Polus y cols. evaluó en 76 mujeres obesas (IMC 30 a 45 kg/mt²) la suplementación con dosis moderadas de AGPICL n3 (1,8 g/día EPA + DHA) por 3 meses, observando un aumento en los niveles de DHA y EPA en eritrocitos, en un 61% y 79% respectivamente y un aumento en la expresión de genes blancos de PPAR α , especialmente aquellos ligados a la β -oxidación (88).

Los niveles normalizados de CPT1a y elevados de ACOX1 bajo la suplementación de DHA + HT en animales alimentados con DAG, en discordancia con la literatura, puede deberse a que la oxidación de ácidos grasos ocurre preferentemente en la mitocondria de las células, para esto se requiere de su entrada a la matriz mitocondrial, función realizada por la enzima CPT1a (15), codificada por el gen CPT1a (54). CPT1a se ubica en la membrana externa de la mitocondria, participando en el transporte de AG desde el citosol a la matriz mitocondrial, aquí ocurre preferentemente la β -oxidación de AG de cadena corta o mediana que se encuentran libres en el citosol para ser oxidados. Frente a la DAG los AGL hepáticos aumentaron de forma significativa (**Figura 7**), por lo tanto CPT1a es requerida y aumenta su expresión, con el fin de sobrellevar esta carga mitocondrial. La suplementación

conjunta de DHA + HT genera dos fenómenos: *i*) disminución significativa de los niveles de AGL hepáticos y *ii*) aumento de la acreción de DHA en los hepatocitos (**Tabla 7**). Por lo tanto disminuye el sustrato para CPT1a y el DHA que es un AGPI de cadena muy larga, se oxida principalmente en el peroxisoma (15). La β -oxidación de AG de cadena muy larga en el peroxisoma requiere de la enzima AcilCoA oxidasa, codificada por ACOX1, justificando la elevación observada en esta investigación de la expresión hepática de ACOX1.

Efecto sobre actividad de unión al ADN y ARNm hepático de Nrf2 y sus genes blancos regulados (ARNm Gclc y GSTa3)

En esta investigación la expresión hepática (ARNm) de Nrf2 aumentó de forma significativa respecto al grupo control en aquellos grupos suplementados con HT con o sin DHA (DC + HT; DC + DHA + HT; DAG + HT y DAG + DHA + HT), además del grupo DAG (**Figura 9B**). Nrf2 es un factor de transcripción encargado de mantener el estado redox celular y es activado frente al estrés oxidativo (58,59), en este modelo experimental la DAG genera una injuria importante en los hepatocitos, pese a que no existen marcadores de estrés oxidativo o inflamación en esta investigación, reportes por este mismo grupo indican que frente a una DAG, se observa un daño en la capacidad antioxidante plasmática, un aumento en la lipoperoxidación lipídica medida mediante los niveles de TBARS, así como disminución total del glutatión (89). Lo anterior generaría que el hepatocito active mecanismos de protección antioxidante, mediante el aumento en la expresión de Nrf2 y el aumento de su actividad de unión al ADN del mismo (**Figura 8B**); otros autores han reportado la misma situación donde la DAG regula negativamente la concentración de Nrf2 en un 38% en comparación con la dieta control (75). También es capaz de disminuir la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), GPx y GR, sugiriendo un daño en el mecanismo antioxidante celular (90). La suplementación conjunta de DHA + HT es capaz de aumentar significativamente la actividad de unión al ADN de Nrf2 y su expresión génica hepática, lo cual se ve reflejado en el aumento significativo de los niveles de ARNm de Gclc y GSTa3, dos genes blancos de Nrf2 (**Figura 11A y B**); similar a lo que sucede en un estudio involucrando ratones alimentados con DAG y suplementados con HT, logró normalizar la actividad de Nrf2 (79). El HT, conocido por su actividad antioxidante es capaz de aumentar los niveles de AKT fosforilada en los hepatocitos, lo cual aumenta la

fosforilación de Nrf2 en los residuos de serina o tirosina, esto permite la disociación del complejo Nrf2/Keap1 que lo mantiene en el núcleo, permitiendo su translocación al núcleo y posterior unión a ARE, aumentando la expresión de enzimas como GPx, GSTa3 y GR (91). Por otro lado, el DHA, ha mostrado ser capaz de activar a Nrf2, mediante derivados de su oxidación, como el isoprostano J3; Gao y cols. determinaron que los elementos oxidados de DHA son capaces de estabilizar y aumentar la expresión de Nrf2 de forma dosis dependiente; el isoprostano J3, ha mostrado reaccionar directamente con los residuos de cisteína de Keap1, generando un cambio conformacional que permite su separación de Cullin3, proteína que juega un rol fundamental en la poliubiquitinización de Nrf2, logrando la separación de Nrf2, su estabilización, acumulación y unión a ARE, aumentando la expresión de enzimas como Gclc (92); por lo que la suplementación conjunta de DHA + HT lograría tener el efecto observado en esta investigación.

Efecto sobre FGF-21

FGF-21 es una hepatoquina, capaz de aumentar la captación de glucosa en adipocitos maduros (57), reducir la acumulación lipídica hepática de forma insulina-independiente, regular la lipólisis, inducir la síntesis y secreción de adiponectina, entre otras acciones (93). Es secretado luego de la acción agonista de AGL en PPAR α (94) principalmente en el hígado, tejido adiposo y páncreas (57); su expresión se ve aumentada en situaciones de ayuno de forma PPAR α dependiente e independiente; además es inducido por dietas cetogénicas, estimulando la lipólisis, cetogénesis y gluconeogénesis (95); sin embargo, en esta investigación es posible observar una correlación negativa, entre la actividad de unión al ADN de PPAR α y los niveles séricos de FGF-21, donde a mayor actividad de unión al ADN de PPAR α , menores fueron los niveles séricos de FGF-21 (**Figura 15B**); situación que pudiera deberse a que los animales no se encontraban en una ayuno prolongado o que la dieta no es cetogénica, ya que se encuentra certificada aportando cantidades suficientes de todos los macronutrientes para este modelo animal (**Tabla 5**); además es posible que frente a una injuria como la DAG, que produce depleción hepática de AGPICL n3 (84), se generaría una disminución en la actividad de unión al ADN de PPAR α , ya sea por falta de ligando o el aumento en la actividad de NF- κ B, el cual es capaz de secuestrar a PPAR α , de

esta forma la actividad de unión al ADN de PPAR α disminuiría y los niveles séricos de FGF-21 aumentarían como una forma de compensación metabólica frente al daño.

En esta investigación no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos y la expresión hepática de FGF-21 entre los grupos controles; por el contrario la DAG fue capaz de aumentar de forma significativa tanto los niveles séricos, como de ARNm de FGF-21, situación que disminuyó ($p < 0,05$) frente a la suplementación conjunta de DHA + HT, en comparación con el grupo DAG (**Figura 13A y B**). Waluga y cols. evaluó a un grupo de 56 mujeres obesas mórbidas sometidas a cirugía bariátrica, donde los niveles séricos y la expresión fue mayor en aquellos sujetos que presentaban mayor grado de esteatosis hepática, inflamación lobular o fibrosis (57); en este estudio los cortes histológicos (**Figura 2A**) del grupo DAG presenta diversos focos de esteatosis moderada que van de la mano con los niveles elevados de FGF-21 en suero y la expresión hepática del mismo. Diversos estudios han mostrado, además que animales deficientes en FGF-21 presentan mayor peso corporal y mayor acumulación de TG hepáticos frente a una dieta cetogénica (96), así como la administración de FGF-21 a ratones, mostró cortes histológicos hepáticos con vacuolas lipídicas de menor tamaño y número, que aquellas imágenes del grupo control, indicando que es capaz de restaurar la morfología hepática casi a su normalidad (94); siendo la autofagia uno de los mecanismos para remover AG de los hepatocitos, frente a un tratamiento de FGF-21, se ven aumentadas proteínas claves de la autofagia *in vitro*, así como los niveles de ARNm de Beclin-1, ATG12, entre otros genes claves del proceso en células HepG2 (94).

En el modelo evaluado en esta investigación la suplementación conjunta de DHA + HT, generó que el DHA aumente la secreción de FGF-21 gracias a la activación de PPAR α (**Figura 8A**) y el HT induzca a Nrf2 (**Figura 8B**), Furusawa y cols. encontró que Nrf2 está ampliamente involucrado en la regulación de FGF-21 en un modelo de ratón diabético; frente a una inducción de Nrf2, mediante el knockdown de Keap1, los niveles séricos y de ARNm hepáticos de FGF-21 aumentan (68).

Efecto sobre derivados metabólicos del DHA (Resolvina D1)

La resolvina D1 (RD1), es un docosanoide formado mediante la oxigenación secuencial del DHA por la 5-LOX y 15-LOX (15,24). En esta investigación se logra observar que los niveles de RD1 se mantienen constante pese a la suplementación con DHA en los grupos controles. Sin embargo, frente a una dieta alta en grasa los niveles de RD1 aumentan significativamente en comparación con el grupo DC + HT; aquí la RD1 probablemente se está produciendo al metabolizar el DHA generado mediante la elongación y desaturación de el ALA gracias a las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas, ya que la dieta alta en grasa carece de DHA (**Tabla 6**) (16). Los mayores niveles de RD1 se presentan en el grupo DAG + DHA, donde este AG está siendo metabolizado para generarla y resolver la injuria generada por la DAG. La suplementación conjunta de DHA + HT en los animales alimentados con DAG también es capaz de aumentar de forma significativa los niveles de RD1 en comparación con el grupo DC y DAG, pero en menor manera que el grupo DAG + DHA, posiblemente debido al efecto antioxidante del HT, que por si mismo es capaz de resolver parte de la injuria (**Figura 12**). Los resultados de esta investigación muestran una correlación negativa entre la actividad de unión al ADN de PPAR α y los niveles hepáticos de RD1, donde a mayor actividad de unión al ADN de PPAR α , menores niveles de RD1 (**Figura 15A**); como se menciona la RD1 es un derivado metabólico del DHA, y este mismo AG es capaz de activar a PPAR α , por lo tanto debido a la fuerte injuria presentada frente a la intervención de DAG, el DHA estaría siendo utilizado para generar RD1 y resolver la inflamación y no entrando al núcleo a activar a PPAR α ; por otro lado, otra posible explicación es que la DAG aumente la actividad de unión al ADN de NF- κ B, lo cual aumentaría la expresión de genes inflamatorios agravando la injuria (89), este factor de transcripción es capaz de unir directamente en su subunidad p65 a PPAR α , formando un dímero no funcional, por lo tanto PPAR α estaría siendo “secuestrado” en este complejo, disminuyendo su actividad de unión al ADN, al tiempo que la RD1 es capaz de ejercer su acción y aumentar sus niveles hepáticos (97), para resolver la injuria. Es relevante mencionar que son pocos los estudios que evalúan el efecto de la DAG y la suplementación de DHA + HT sobre los niveles hepáticos de RD1 en la ENHGNA.

Efecto sobre Colesterol hepático total y HMGCoA Reductasa

El colesterol es una molécula de origen animal con numerosas funciones metabólicas importantes, desde la constitución de membranas celulares, hasta la formación de hormonas (98). El colesterol puede tener dos orígenes, i) exógeno, a través de la dieta, y ii) endógeno, principalmente mediante la síntesis hepática de colesterol, la enzima limitante en este proceso es la hidroximetil Glutaril CoA Reductasa (HMGCoA Reductasa), la cual cataliza la formación de malonil CoA desde HMGCoA (15). Los resultados de esta investigación muestran que no existen diferencias significativas en los niveles de colesterol hepático entre los animales alimentados con DC con o sin suplementación. Por el contrario frente a la DAG los niveles de colesterol hepático aumentan de forma significativa respecto a todo los grupos control con o sin suplementación, dentro de las razones de esto encontramos efectivamente el aporte de colesterol de la dieta alta en grasa (**Tabla 5**) que aporta 216,4 mg por 4057 kcal de aporte dietario, mientras que la dieta control aporta alrededor de 18 mg de colesterol por 4057 kcal. La suplementación con DHA e HT por separado no logra revertir el aumento en el contenido de colesterol total hepático; no así la suplementación conjunta que es capaz de disminuir significativamente los niveles de colesterol hepático respecto al grupo DAG, lo que puede deberse a: *i*) menor absorción intestinal de colesterol o mayor excreción mediante el aumento en ABCG5 y ABCG8, como reporta Suzuki-Kemuriyama y cols. que frente a una DAG en ratones C57BL/6J, suplementados con EPA o DHA al 5% aumenta la expresión de ABCG5 y ABCG8 (83); *ii*) normal exportación de colesterol mediante VLDL, ya que frente a la EHGNA se ha reportado que los sujetos presentan una disminución de la apoB-100, comprometiendo la exportación hepática de VLDL, aumentando la acumulación de lípidos en los hepatocitos (99); *iii*) disminución en la síntesis de colesterol hepático. Respecto a este último punto se puede observar que en este modelo experimental, la expresión hepática de HMGCoA Reductasa aumentan en la DAG, justificando lo observado en los niveles de colesterol hepático (**Figura 14A**), la suplementación conjunta de DHA + HT, logra disminuir la expresión de HMGCoA Reductasa respecto al grupo DAG, pero sigue manteniendo un aumento significativo respecto al grupo control (**Figura 14B**). En este sentido se ha observado que la suplementación con EPA y DHA frente a una dieta aterogénica alta en grasa es capaz de disminuir los niveles hepáticos de ARNm de HMGCoA Reductasa (83). Por lo tanto la

suplementación conjunta de DHA + HT en ratones alimentados con DAG es capaz de disminuir el contenido total de colesterol hepático y mostrar una tendencia a la disminución en la expresión de HMGCoA Reductasa respecto al grupo DAG, lo cual tendría un efecto positivo en el metabolismo lipídico hepático, ya que el colesterol en exceso es capaz de generar lipotoxicidad, que incluso puede bajo condiciones de estrés oxidativo, comunes en sujetos con EHGNA (13), generar productos oxidados de colesterol (oxisterol), que producen mayor injuria hepática (100).

Limitaciones

Como todo estudio en modelo animal, esta investigación restringe sus resultados al modelo murino, siendo necesarios estudios clínicos controlados en humanos, con el fin de esclarecer los efectos mencionados en los resultados de la suplementación conjunta de DHA + HT en la EHGNA y observar si son replicables en el ser humano y que dosis son necesarias para alcanzar los efectos beneficiosos esperados. Los estudios en animales son valiosas herramientas de investigación que permiten comprender procesos fisiopatológicos y efectos beneficiosos de diversas sustancias dentro de un modelo que no solo ha sido ampliamente utilizado, sino que además es fácil de manipular experimentalmente, presenta similitud biológica con el desarrollo de la EHGNA en el humano y una caracterización a nivel genético, molecular y enzimático bastante detallada, que permite un entendimiento profundo del desarrollo y progresión de la enfermedad (101). Otra limitación del estudio está dada por el modelo nutricional utilizado para inducir esteatosis (DAG certificada), ya que si bien esta ampliamente descrito en la literatura su uso para el desarrollo de injuria hepática, simplificar la dieta humana occidental como una solo alta en grasas podría generar un sesgo por no considerar aspectos tan relevantes de la dieta como el consumo de bebidas azucaradas altas en fructosa, consumo indiscriminado de productos altamente procesados, carnes rojas, embutidos, entre otros, además de las influencias ambientales como el sedentarismo y la predisposición genética.

En futuras investigaciones que contemplen el efecto del DHA + HT en la EHGNA se debe tener en consideración la evaluación factores como NF- κ B, SREBP-1c, entre otros; con el fin de comprender de mejor manera como funciona el mecanismo molecular que previene la EHGNA. Por otro lado sería importante incluir dentro del diseño experimental la

evaluación de la masa proteica y la actividad de los factores de transcripción y las enzimas que codifican sus genes blancos.

En definitiva al observar los resultados en su totalidad, se observa que la suplementación con DHA + HT es capaz de disminuir la esteatosis hepática en ratones alimentados con DAG por 12 semanas, y además en este modelo se observa una activación de PPAR α y de Nrf2, que genera: *i*) normalización de la expresión hepática de CPT1a; *ii*) aumento en la expresión hepática de ACOX1; *iii*) aumento en los niveles séricos y la expresión de FGF-21; *iv*) aumento de los niveles de RD1 en el hígado; *v*) aumento de la expresión hepática de Gclc; *vi*) aumento de la expresión hepática de GSTa3; *vii*) aumento en la expresión de HMGC α Reductasa y *viii*) cambios en la cantidad y perfil lipídico del hígado. Todas estos efectos generarían: *i*) aumento de la β -oxidación, lipólisis y disminución de la lipogénesis hepática que frenarían la esteatosis hepática; *ii*) la producción de derivados metabólicos (RD1) que resolverían la inflamación y *iii*) el aumento en la producción de enzimas antioxidantes, poniendo un freno al estrés oxidativo; todas estas situaciones llevarían a frenar la progresión de la EHGNA y mejorar la esteatosis (**Anexo 9**).

10. Conclusiones

En esta investigación se evaluó la suplementación conjunta de DHA + HT y su efecto protector sobre el hígado frente a una dieta alta en grasa capaz de gatillar la enfermedad por hígado graso no alcohólico en ratón, mediante la evaluación de parámetros que incluyeron esteatosis hepática y mecanismos moleculares de protección. La DAG fue capaz de provocar el desarrollo de la EHGNA en los animales, observándose que la suplementación conjunta de DHA + HT, logro: *i*) prevenir la esteatosis hepática provocada por la DAG, reflejado por una baja en la cantidad de grasa total hepática, TG, AGL y colesterol total. *ii*) activación de los factores de transcripción PPAR y Nrf2, medido a través de un aumento en su actividad de unión al ADN y de su expresión en el hepatocito. *iii*) aumento en la expresión hepática de genes regulados por estos factores de transcripción como ACOX1, Gclc, GSTa3, FGF-21. *iv*) aumento en el contenido hepático de resolvinas (RD1) con el fin de resolver la inflamación.

Todo esto pone en manifiesto que la administración conjunta de DHA + HT podría ser una terapia a considerar para una intervención nutricional en el manejo de la EHGNA. Por lo tanto esta investigación abre una puerta a futuras intervención que busquen valorar los efectos en el ser humano, tanto en sujetos sanos, con el fin de promover la salud y en sujetos enfermos para prevenir la progresión de la patología y tratarla; así como buscar dosis adecuadas en fuentes alimentarias asequibles para todos.

11. Referencias

1. Poniachik J. Enfermedad por hígado graso no alcohólico. En: Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades digestivas, Sociedad Chilena de Gastroenterología ed. Santiago de Chile, 2013:321-25.
2. Tiniakos D, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010;5:145-71.
3. Caldwell S, Crespo D. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 2004;40:578-84.
4. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases* 2010;28(1):155-61.
5. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2010;140(1): 124-31.78.
6. López J, Silva K, Ponciano G, Chávez N, Arrese M, Uribe M, et al. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol* 2014;13:166-78.
7. Csendes A, Smork G, Burgos AM, Csendes P. Hallazgos ecográficos e histológicos del hígado de 414 pacientes con obesidad mórbida. *Rev Chilena de Cirugía* 2006;58(3):187-193.
8. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: mayo Clinic experience with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434.
9. Hernandez-Rodas MC, Valenzuela R, Videla L. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2015;16: 25168-25198.
10. Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, Lopes C, Moura MC, Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients?. *Clin Nutr* 2006;25:816-823.
11. Oddy WH, Herbison CE, Jacoby P, Ambrosini G, O'Sullivan TA, Ayonrinde OT, et al. The Western Dietary Pattern Is Prospectively Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adolescence. *Am J Gastroenterol* 2013;108:778-785.
12. Valenzuela R, Videla L. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct* 2011; 2: 644.
13. Abenavoli L, Milic N, Di Renzo L, Preveden T, Medi -Stojanoska M, De Lorenzo A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22(31): 7006-7016.
14. Anderson N, Borlak J. Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008;60:311-357.
15. FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. 2008:1-204.

16. Morales J, Valenzuela R, Gonzalez D, Gonzalez M, Tapia G, Sanhueza J, Valenzuela A. New dietary sources of alpha-linolenic acid: a critical view. *Rev Chil Nutr* 2012;39(3):79-87.
17. Judge MP, Cong X, Harel O, Courville AB, Lammi-Keefe CJ. Maternal consumption of a DHA-containing functional food benefits infant sleep patterning: an early neurodevelopmental measure. *Early Hum Dev* 2012;88:531-537.
18. Serhan C, Petasis N. Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution. *Chem Rev* 2011; 111(10): 5922–5943.
19. Valenzuela R, Morales J, Sanhueza J, Valenzuela A. Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid at the brain. *Rev Chil Nutr* 2013;40(4):383-390.
20. Delarue J, Lallés JP. Nonalcoholic fatty liver disease: Roles of the gut and the liver and metabolic modulation by some dietary factors and especially long-chain n-3 PUFA. *Mol Nutr Food Res* 2016;60(1):147-59.
21. Araya J, Rodrigo R, Videla L, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachiks J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n – 6/n – 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 2004;106:635-643.
22. Vaidya HB, Gangadaran S, Cheema SK. An obesogenic diet enriched with blue mussels protects against weight gain and lowers cholesterol levels in C57BL/6 mice. *Nutr Res* 2017;46:31-37.
23. Rius B, Titos E, Morán-Salvador E, López-Vicario C, García-Alonso V, González-Pérez A, Arroyo V, Clària J. Resolvin D1 primes the resolution process initiated by calorie restriction in obesity-induced steatohepatitis. *FASEB J* 2014;28(2):836-48.
24. Jung TW, Hwang HJ, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, Choi KM. Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2014;391(1-2):30-40.
25. Jump D, Depner CM, Tripathy S, Lytle KA. Impact of dietary fat on the development of non-alcoholic fatty liver disease in *Ldlr*^{-/-} mice. *Proc Nutr Soc* 2016;75(1):1–9.
26. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Mañan D, Videla L, D'Espessailles A. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR upregulation and NF-κB DNA binding abrogation. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1333–1341.
27. Deng X, Dong Q, Bridges D, Raghov R, Park EA, Elam MB. Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(2):1521–1529.
28. Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic Acid Attenuates Hepatic Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis without Decreasing Hepatosteatosis in a *Ldlr*^{2/2} Mouse Model of Western Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Nutr* 2013;143(3):315-23.

29. Videla L, Fernandez V, Vargas R, Cornejo P, Tapia G, Varela N, et al. Upregulation of rat liver PPAR α -FGF21 signaling by a docosahexaenoic acid and thyroid hormone combined protocol. *Biofactors* 2016;42(6):638-646.
30. Pacifico L, Bonci E, Di Martino M, Versacci P, Andreoli G, Silvestri LM, Chiesa C. A double-blind, placebo-controlled randomized trial to evaluate the efficacy of docosahexaenoic acid supplementation on hepatic fat and associated cardiovascular risk factors in overweight children with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015;25(8):734-41.
31. Nobili V, Carpino G, Alisi A, De Vito R, Franchitto A, Alpini G, Onori P, Gaudio E. Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2014;9(2):e88005.
32. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 2005;18(1):98-112.
33. Zhao B, Ma Y, Xu Z, Wang J, Wang F, Wang D, et al. Hydroxytyrosol, a natural molecule from olive oil, suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells via inactivating AKT and nuclear factor-kappa B pathways. *Cancer Lett* 2014;347:79–87.
34. Pérez-Bonilla M, Salido S, van Beek TA, Altarejos J. Radical scavenging compounds from olive tree (*Olea europaea* L.) wood. *J Agric Food Chem* 2013;62(1):144–151.
35. Pirozzi C, Lama A, Simeoli R, Paciello O, Pagano TB, Mollica, MP, et al. Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *J Nutr Biochem* 2016;30:108-15.
36. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr* 1997;127:286-292.
37. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639,1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011;9(4):2033.
38. Vilaplana-Perez C, Auñon D, Garcia-Flores LA, Gil-Izquierdo A. Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Front Nutr* 2014;27:1:18.
39. Ruiz-Gutiérrez V, De La Puerta R, Catala A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 2001;217(1-2):35-41.

40. Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, Sayadi S. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 2008;56(8):2630-6.
41. Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Gonzalez-Benjumea A, Fernandez-Bolaños JG, Lubberts E, Alarcón de la Lastra C. Preventive effects of dietary hydroxytyrosol acetate, an extra virgin olive oil polyphenol in murine collagen-induced arthritis. *Mol Nutr Food Res* 2015;59:2537–2546.
42. Martín MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodríguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L, Goya L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res* 2010;54:956–966.
43. Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Hydroxytyrosol and cytoprotection: A projection for clinical interventions. *Int J Mol Sci* 2017;18(5):930.
44. Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, Reddy JK. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res* 2010: 250-126.
45. MacLaren L, Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) expression in cultured bovine endometrial cells and response to omega-3 fatty acid, growth hormone and agonist stimulation in relation to series 2 prostaglandin production. *Domest Anim Endocrinol* 2006;30(3):155-69.
46. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(1):36-49.
47. Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla L. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016;114:28-34.
48. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;20:649–688.
49. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994:7355–7359.
50. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 1994;137:354–366.
51. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. *Endocrinology* 2001;142(10):4195-202.
52. Marino J, Stechschulte L, Stec D, Nestor-Kalinoski A, Coleman S, Hinds T. Glucocorticoid receptor induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) . *J Biol Chem* 2016;291(50):25776-25788.

53. ncbi.nlm.nih.gov (Internet). USA: NCBI; 1988(actualizado 3 Dic 2016; citado 9 Dic 2016). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11430>.
54. ncbi.nlm.nih.gov (Internet). USA: NCBI; 1988(actualizado 26 Nov 2016; citado 9 Dic 2016). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12894>.
55. Huang Z, Xu A, Cheung BMY. The Potential Role of Fibroblast Growth Factor 21 in Lipid Metabolism and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2017;19(4):28.
56. Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* 2017;S1550-4131(17):30487-4.
57. Waluga M, Kukla M, Zorniak M, Kajor M, Liszka L, Dyzczynski M, Kowalski G, Zadlo D, Waluga E, Olczyk P, Buldak RJ, Berdowska A, Hartleb M. Fibroblast growth factor-21 and omentin-1 hepatic mRNA expression and serum levels in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *J Physiol Pharmacol* 2017;68(3):363-374.
58. Kensler TW, Wakabayashi NW, Biswal S. Cell survival responses to environmental stress via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.
59. Rodriguez-Ramiro I, Vauzour D, Minihane M. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2016;75(1):47-60.
60. Lee D, Han DH, Nam KT, Park JS, Kim SH, Lee M, et al. Ezetimibe, an NPC1L1 inhibitor, is a potent Nrf2 activator that protects mice from diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2016;99:520-532.
61. Taguchi H, Motohashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Celles* 2011;16:123-140.
62. Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, et al. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol* 1996;16:6083e6095.
63. Wang X, Li C, Xu S, Ishfaq M, Zhang X. NF-E2-related factor 2 deletion facilitates hepatic fatty acids metabolism disorder induced by high-fat diet via regulating related genes in mice. *Food Chem Toxicol* 2016;94:186-96.
64. Chambel S, Santos-Goncalves A, Duarte T. The Dual Role of Nrf2 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Regulation of Antioxidant Defenses and Hepatic Lipid Metabolism. *Biomed Res Int* 2015;2015:597134.
65. Mitchell AE, Morin D, Lakritz J, Jones AD. Quantitative profiling of tissue- and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse. *Biochem J* 1997;325:207-216.
66. ncbi.nlm.nih.gov (Internet). USA: NCBI; 1988(actualizado 31 Oct 2016; citado 10 Dic 2016). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14857>.
67. ncbi.nlm.nih.gov (Internet). USA: NCBI; 1988(actualizado 6 Dic 2016; citado 10 Dic 2016). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2729>.
68. Furusawa Y, Uruno A, Yagishita Y, Higashi C, Yamamoto M. Nrf2 induces fibroblast growth factor 21 in diabetic mice. *Genes Cells* 2014;19(12):864-78.

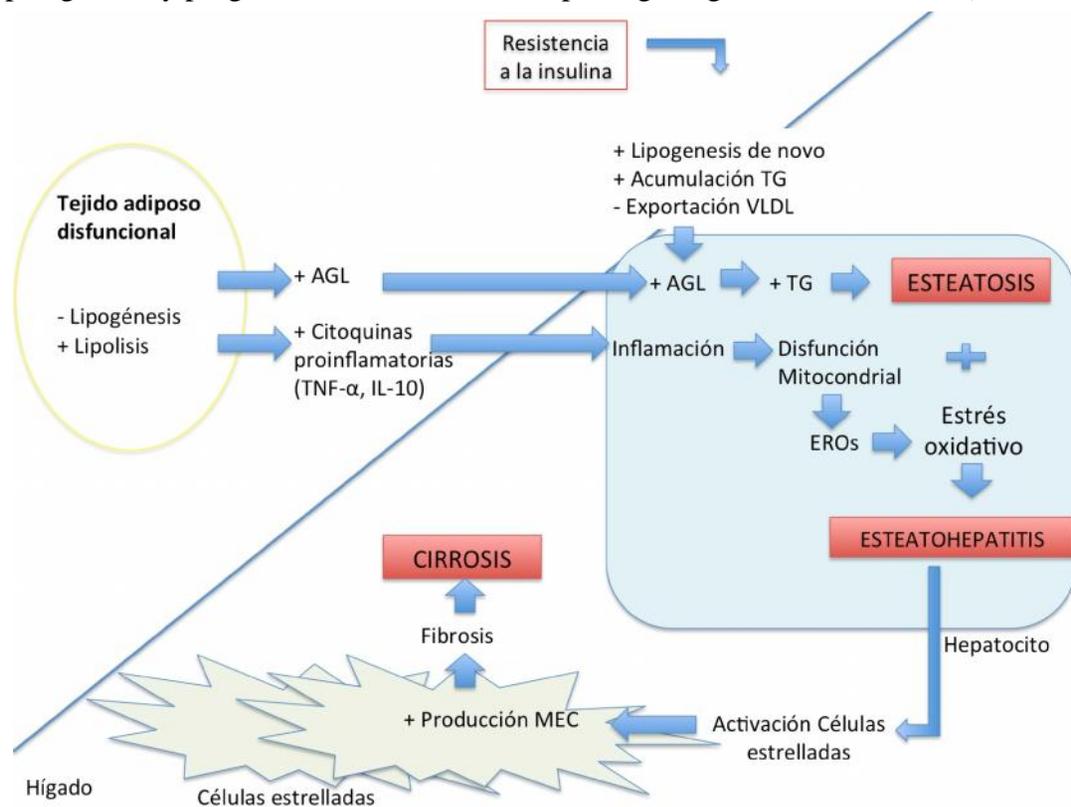
69. Ibrahim S H, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci* 2016;61(5):1325–1336.
70. Tanaka Y1, Aleksunes LM, Yeager RL, Gyamfi MA, Esterly N, Guo GL, Klaassen CD. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325(2):655-64.
71. Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 1959;37(8):911-17.
72. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, et al. Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int. J Mol Sci* 2013;14: 21833-21857.
73. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* 2013;52(1):165–174.
74. Toshimitsu K, Matsuura B, Ohkubo I, Niiya T, Furukawa S, Hiasa Y, et al. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition* 2007;23(1):46-52.
75. Gonzalez-Mañán D, D'Espessailles, Dossi CG, San Martín M, Mancilla RA, Tapia GS. 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. *J Nutr* 2017;147(4):579-588.
76. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci* 2013;14:21240-21257.
77. García-Martín M, Zurita-Molina A. Transaminasas: Valoración y significación clínica. En: *Protocolo Diagnostico-terapéuticos de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica*, ed. ERGON, 2010:267-275.
78. Rastogi A, Shasthry SM, Agarwal A, Bihari C, Jain P, Jindal A, Sarin S. Non-alcoholic fatty liver disease - histological scoring systems: a large cohort single-center, evaluation study. *APMIS* 2017;125(11):962-973.
79. Valenzuela R, Illesca P, Echeverría F, Espinosa A, Rincón-Cervera MÁ, Ortiz M, Hernandez-Rodas MC, Valenzuela A, Videla LA. Molecular adaptations underlying the beneficial effects of hydroxytyrosol in the pathogenic alterations induced by a high-fat diet in mouse liver: PPAR- and Nrf2 activation, and NF- κ B down-regulation. *Food Funct* 2017;8(4):1526-1537.
80. Valenzuela R, Espinosa A, Llanos P, Hernandez-Rodas MC, Barrera C, Vergara D, Romero N, Pérez F, Ruz M, Videla LA. Anti-steatotic effects of an n-3 LCPUFA and extra virgin olive oil mixture in the liver of mice subjected to high-fat diet. *Food Funct* 2016;7(1):140-50.
81. Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- ratio and steatosis in obese patients: Correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(11):1080-6.

82. Rincón-Cervera MA, Valenzuela R, Hernandez-Rodas MC, Marambio M, Espinosa A, Mayer S, et al. Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of desaturation capacity in mice fed a high-fat diet: Effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues. *Nutrition* 2016;32:1254–1267.
83. Suzuki-Kemuriyama N, Matsuzaka T, Kuba M, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Isaka M, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Miyajima K, Nakae D, Yahagi N, Nakagawa Y, Sone H, Yamada N, Shimano H. Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS One* 2016;11(6):e0157580.
84. Valenzuela R, Barrera C, Espinosa A, Llanos P, Orellana P, Videla LA. Reduction in the desaturation capacity of the liver in mice subjected to high fat diet: Relation to LCPUFA depletion in liver and extrahepatic tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2015;98:7-14.
85. Song JH, Miyazawa T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis* 2001;155(1):9–18.
86. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
87. Shang T, Liu L, Zhou J, Zhang M, Hu Q, Fang M, et al. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids Health Dis* 2017;16:65.
88. Polus A, Zapala B, Razny U, Gielicz A, Kiec-Wilk B, Malczewska-Malec M, Sanak M, Childs CE, Calder PC, Dembinska-Kiec A. Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid mediator production. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861(11):1746-1755.
89. Hernández-Rodas MC, Valenzuela R, Echeverría F, Rincón-Cervera MA, Espinosa A, Illesca P y cols. Supplementation with docosahexaenoic acid and extra virgin olive oil prevents liver steatosis induced by a high-fat diet in mice through PPAR- α and Nrf2 upregulation with concomitant SREBP-1c and NF- κ B downregulation. *Mol Nutr Food Res* 2017;61(12).
90. Rincón-Cervera MÁ, Valenzuela R, Hernandez-Rodas MC, Barrera C, Espinosa A, Marambio M, Valenzuela A. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016;111:25-35.
91. Martín, MA; Ramos, S; Granado-Serrano, AB; Rodríguez-Ramiro, I; Trujillo, M; Bravo, L; Goya, L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 956–966.

92. Gao L, Wang J, Sekhar KR, Yin H, Yared NF, Schneider SN, Sasi S, Dalton TP, Anderson ME, Chan JY, Morrow JD, Freeman ML. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem* 2007;282(4):2529-37.
93. Lebensztejn DM, Flisiak-Jackiewicz M, Białokoz-Kalinowska I, Bobrus-Chociej A, Kowalska I. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol* 2016;63(3):459-67.
94. Zhu S, Wu Y, Ye X, Ma L, Qi J, Yu D, Wei Y, Lin G, Ren G, Li D. FGF21 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by inducing autophagy. *Mol Cell Biochem* 2016;420(1-2):107-19.
95. Erickson A, Moreau R. The regulation of FGF21 gene expression by metabolic factors and nutrients. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2016;30(1).
96. Panera N, Della Corte C, Crudele A, Stronati L, Nobili V, Alisi A. Recent advances in understanding the role of adipocytokines during non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis and their link with hepatokines. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;10(3):393-403.
97. Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, Videla LA, Fernández V. N 3 PUFA supplementation triggers PPAR- activation and PPAR- /NF- B interaction: anti inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2011;6(12):e28502.
98. Valenzuela BA, Sanhueza CJ, Nieto KS. Oxidos del colesterol (oxisteroles): factores que condicionan su formacion, efectos biologicos, y su presencia en los alimentos. *Rev chil nutr* 2002;29(2):116-124
99. Charlton, M; Sreekumar, R; Rasmussen, D; Lindor, K; Nair, KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2002, 35(4), 898-904.
100. Bellanti F, Villani R, Tamborra R, Blonda M, Iannelli G, di Bello G, Facciorusso A, Poli G, Iuliano L, Avolio C, Vendemiale G, Serviddio G. Synergistic interaction of fatty acids and oxysterols impairs mitochondrial function and limits liver adaptation during nafld progression. *Redox Biol* 2017;15:86-96.
101. Riordan JD, Nadeau JH. Modeling progressive non-alcoholic fatty liver disease in the laboratory mouse. *Mamm Genome* 2014;25:473-86.
102. Soto-Alarcón SA, Valenzuela R, Valenzuela A. Extra Virgin Olive Oil and Hepatoprotective Effects. En: *Handbook of Olive Oil: Phenolic Compounds, Production and Health Benefits*, Nova Science Publishers, 2017:193-214.
103. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94(9):2467-74.

12. Anexos

ANEXO 1: Resumen de patogénesis y progresión de la Enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA). (102)



El tejido adiposo disfuncional libera altos niveles de AGP y citoquinas proinflamatorias al torrente sanguíneo. La resistencia a la insulina, común en sujetos obesos, genera un aumento en la lipogénesis de novo hepática, una alta acumulación de TG en los hepatocitos y baja liberación de VLDL, promoviendo una mayor acumulación de AGP y eventualmente TG llevando al desarrollo de esteatosis (primer golpe metabólico). Las citoquinas proinflamatorias alcanzan el hígado generando un estado de inflamación, que genera disfunción mitocondrial, condición exacerbada por la acumulación de AGP, lo cual lleva a estrés oxidativo (segundo golpe metabólico), que permite la progresión de esteatosis a esteatohepatitis. La esteatohepatitis es capaz de activar las células estrelladas en el hígado, que aumenta la producción de varios componentes de la matriz extracelular generando fibrosis y eventualmente cirrosis.

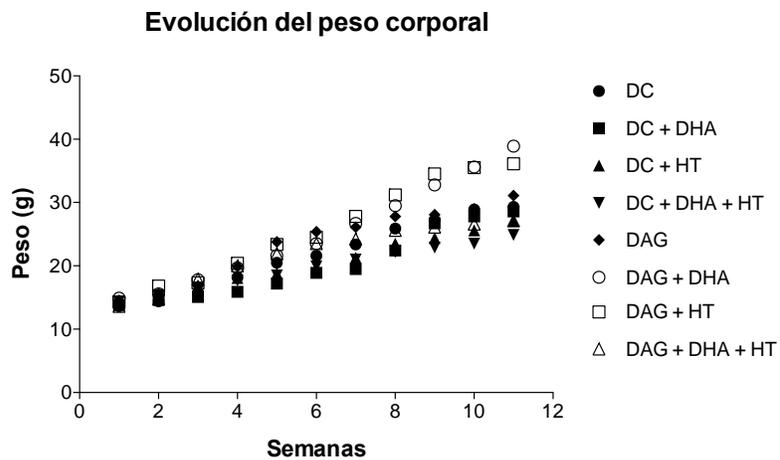
ANEXO 2: Cantidades de muestra (plasma y tejido hepático) utilizadas para las distintas mediciones.

Muestra	Medición	Cantidad de muestra
Plasma	FGF-21	50 µL
	AST	50 µL
	ALT	50 µL
Hígado	Histología	150 mg
	TG	200 mg
	AGL	200 mg
	Perfil de AG	150 mg
	Extracción de ARN	30 mg
	Extracción nuclear actividad de unión al ADN de PPAR α y Nrf2	200 mg
	RD1	250 mg

ANEXO 3: Clasificación de esteatosis hepática de acuerdo al porcentaje (%) de hepatocitos con vesículas lipídicas (103).

Porcentaje (%)	Clasificación
<33	Esteatosis leve
33 – 66	Esteatosis moderada
>66	Esteatosis severa

ANEXO 4: Evolución del peso corporal de los ratones durante las 12 semanas de intervención (g).



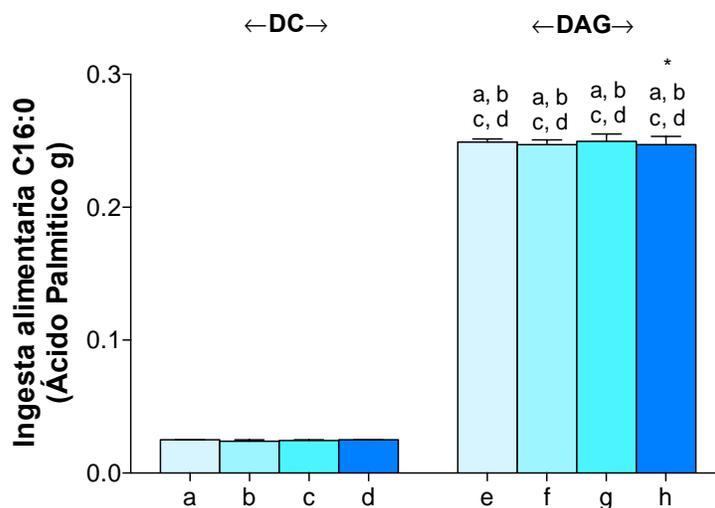
Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico.

ANEXO 5: Control de ingesta por grupo experimental.

	DC (a)	DC + DHA (b)	DC + HT (c)	DC + DHA + HT (d)	DAG (e)	DAG + DHA (f)	DAG + HT (g)	DAG + DHA + HT (h)
Ingesta dietaria (g/día)	3,89 (3,77 – 3,98)	3,81 (3,64 0 3,89)	3,86 (3,79 – 3,97)	3,88 (3,84 – 3,93)	3,84 (3,78 – 3,89)	3,82 (3,78 – 3,88)	3,86 (3,78 – 3,94)	3,82 (3,78 – 3,92)
Ingesta energética (kcal/día)	14,99 (14,53 – 15,35)	14,67 (14,01 – 14,99)	14,84 (14,58 – 15,28)	14,94 (14,78 – 15,11)	20,13 (19,82 – 20,39) ^{a,b,c,d}	20,00 (19,81 – 20,30) ^{a,b,c,d}	20,18 (19,77 – 20,66) ^{a,b,c,d}	20,00 (19,82 – 20,54) ^{a,b,c,d}
Ingesta de proteínas (g/día)	0,75 (0,73 – 0,77)	0,74 (0,70 – 0,75)	0,74 (0,73 – 0,76)	0,75 (0,75 – 0,75)	1,01 (0,99 – 1,02) ^{a,b,c,d}	1,01 (0,99 – 1,02) ^{a,b,c,d}	1,01 (0,99 – 1,03) ^{a,b,c,d}	1,00 (0,99 – 1,03) ^{a,b,c,d}
Ingesta de CHO (g/día)	2,63 (2,54 – 2,68)	2,57 (2,45 – 2,63)	2,60 (2,55 – 2,67)	2,62 (2,59 – 2,65)	1,01 (0,99 – 1,02) ^{a,b,c,d}	1,00 (0,99 – 1,02) ^{a,b,c,d}	1,01 (0,99 – 1,03) ^{a,b,c,d}	1,00 (0,99 – 1,03) ^{a,b,c,d}
Ingesta de lípidos (g/día)	0,17 (0,16 – 0,17)	0,16 (0,16 – 0,17)	0,17 (0,16 – 0,17)	0,17 (0,16 – 0,17)	1,34 (1,32 – 1,36) ^{a,b,c,d}	1,33 (1,32 – 1,36) ^{a,b,c,d}	1,35 (1,32 – 1,38) ^{a,b,c,d}	1,33 (1,32 – 1,37) ^{a,b,c,d}

Datos presentados como mediana ± rango intercuartilico de ingesta dietaria (gramos/día), ingesta energética (kcal/día), ingesta de proteínas, hidratos de carbono (CHO) e ingesta de lípidos (gramos/día). n=8-10. Diferencias significativas (P<0,05; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn´s para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental: DC (a), DC + DHA (b), DC + HT (c), DC + DHA + HT (d), DAG (e), DAG + DHA (f), DAG + HT (g), DAG + DHA + HT (h).

ANEXO 6: Ingesta de ácido palmítico (C16:0) por grupo experimental (g/100 g de dieta).



Datos presentados como mediana \pm rango intercuartilico. n= 8-10. a) DC; b) DC + DHA; c) DC + HT; d) DC + DHA + HT; e) DAG; f) DAG + DHA; g) DAG + HT; h) DAG + DHA + HT. Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las letras que representan a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DC (a) están representadas por un (*) y entre grupos DAG + DHA + HT (h) y DAG (e) están representados por un (#). Efectos netos: Diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples) están indicadas por las números que representan a cada grupo experimental.

ANEXO 8: Perfil de AG hepáticos totales por grupo experimental.

Ácido graso (g/100 g hígado)	CD (a)	CD + DHA (b)	CD + HT (c)	CD + DHA + HT (d)	DAG (e)	DAG + DHA (f)	DAG + HT (g)	DAG + DHA + HT (h)
C10:0 Acido Decanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)
C12:0 Acido Dodecanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0015 (0,00 – 0,003)	0,0075 (0,005 – 0,01) ^{a,b,c,d,e,f}
C14:0 Acido Tetradecanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,004 (0,004 – 0,004)	0,004 (0,002 – 0,004)	0,004 (0,002 – 0,004)	0,0045 (0,003 – 0,006)	0,004 (0,004 – 0,004)	0,005 (0,004 – 0,006) ^a	0,00975 (0,0075 – 0,012) ^{a,c,d}
C16:0 Acido Palmítico	0,305 (0,296 – 0,314)	0,3525 (0,346 – 0,359)	0,3135 (0,3 – 0,327)	0,32 (0,257 – 0,383)	0,344 (0,294 – 0,394)	0,357 (0,346 – 0,368)	0,336 (0,311 – 0,361)	0,6615 (0,556 – 0,767) ^{a,c,d}
C18:0 Acido Estearico	0,148 (0,14 – 0,156)	0,1425 (0,138 – 0,147)	0,121 (0,119 – 0,123)	0,097 (0,082 – 0,112)	0,2055 (0,179 – 0,232) ^{c,d}	0,2015 (0,186 – 0,217) ^d	0,1935 (0,157 – 0,23) ^d	0,333 (0,281 – 0,395) ^{a,b,c,d}
C20:0 Acido Eicosanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0015 (0,00 – 0,003)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0035 (0,003 – 0,004)	0,004 (0,003 – 0,005) ^{a,c,d}	0,003 (0,002 – 0,004)	0,0045 (0,004 – 0,005) ^{a,c,d}
C22:0 Acido Docosanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0025 (0,0010 – 0,004) ^{a,b,c,d,h}	0,0025 (0,002 – 0,003) ^{a,b,c,d,h}	0,002 (0,002 – 0,002) ^{a,b,c,d,h}	0,00 (0,00 – 0,00)
C24:0 Acido Tetracosanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0015 (0,001 – 0,002) ^{a,b,c,d,e,f,g}
AGS	0,454 (0,437 – 0,471)	0,5005 (0,5 – 0,501)	0,4365 (0,427 – 0,446)	0,4195 (0,344 – 0,495)	0,56 (0,481 – 0,639)	0,5685 (0,541 – 0,596) ^{a,c,d}	0,541 (0,481 – 0,601)	0,4415 (0,355 – 0,528)
C14:1 Acido Tetradecenoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)
C16:1 Acido Palmitoleico	0,0245 (0,2 – 0,029)	0,0225 (0,022 – 0,023)	0,0275 (0,025 – 0,03)	0,028 (0,025 – 0,031)	0,015 (0,01 – 0,02) ^{c,d}	0,0105 (0,009 – 0,012) ^{c,d}	0,014 (0,013 – 0,015) ^d	0,0155 (0,009 – 0,022) ^d
C18:1 Acido Oleico	0,2295 (0,217 – 0,242)	0,203 (0,202 – 0,204)	0,239 (0,226 – 0,204)	0,2135 (0,172 – 0,255)	0,278 (0,222 – 0,334)	0,2385 (0,226 – 0,251)	0,2675 (0,265 – 0,27) ^b	0,334 (0,204 – 0,464)
C20:1n9 Acido Eicosaenoico	0,0025 (0,00 – 0,005)	0,004 (0,004 – 0,004)	0,004 (0,004 – 0,004)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0065 (0,005 – 0,008) ^d	0,006 (0,005 – 0,007) ^d	0,006 (0,006 – 0,006) ^d	0,0065 (0,004 – 0,009) ^d
C22:1n9 Acido Erucico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,001 (0,00 – 0,002) ^{a,b,c,d,e,g,h}	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)
C24:1 Acido Tetracosanoico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0025 (0,002 – 0,003)	0,002 (0,002 – 0,002) ^{a,b,c,d}	0,0025 (0,002 – 0,003) ^{a,b,c,d}	0,0025 (0,00 – 0,005)

AGMI	0,256 (0,241 – 0,271)	0,2295 (0,228 – 0,231)	0,27 (0,254 – 0,286)	0,2415 (0,197 – 0,286)	0,3025 (0,309 – 0,366)	0,2565 (0,245 – 0,268)	0,29 (0,289 – 0,291) ^b	0,43 (0,359 – 0,501)
C18:2 n6 Acido Linoleico	0,2185 (0,203 – 0,234)	0,199 (0,199 – 0,199)	0,204 (0,19,6 – 0,212)	0,235 (0,179 – 0,291)	0,251 (0,216 – 0,286)	0,3 (0,286 – 0,314) ^b	0,295 (0,283 – 0,307)	0,605 (0,503 – 0,707) ^{a,b,c,d}
C18:3 n6 Acido Linolénico	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,0055 (0,004 – 0,007) ^{a,b,c,d}	0,0035 (0,003 – 0,004)	0,0055 (0,005 – 0,006) ^{a,b,c,d}	0,00825 (0,0065 – 0,01) ^{a,b,c,d}
C18:3 n3 Acido Linolénico	0,002 (0,00 – 0,004)	0,0015 (0,00 – 0,003)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,007 (0,006 – 0,008)	0,0065 (0,006 – 0,007) ^{c,d}	0,007 (0,007 – 0,007) ^{c,d}	0,01275 (0,0105 – 0,015) ^{a,b,c,d}
C20:2 n6	0,006 (0,005 – 0,007)	0,006 (0,006 – 0,006)	0,006 (0,005 – 0,007)	0,007 (0,007 – 0,007)	0,009 (0,008 – 0,01) ^b	0,008 (0,007 – 0,009)	0,009 (0,009 – 0,009) ^b	0,0145 (0,012 – 0,017) ^{a,b,c,d}
C20:3 n6	0,014 (0,009 – 0,019)	0,018 (0,018 – 0,018)	0,0205 – 0,019 – 0,022)	0,0175 (0,016 – 0,019)	0,017 (0,016 – 0,018)	0,0185 (0,018 – 0,019)	0,0155 (0,015 – 0,016) ^c	0,03225 (0,0275 – 0,037) ^{a,e,g}
C20:3 n3	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)
C20:4 n6	0,1375 (0,136 – 0,139)	0,0995 (0,096 – 0,103)	0,1435 (0,139 – 0,148)	0,104 (0,89 – 0,119)	0,2345 (0,221 – 0,248) ^{b,d}	0,1565 (0,159 – 0,174)	0,2335 (0,215 – 0,252) ^{b,d}	0,358 – 0,296 – 0,42) ^{a,b,d}
C20:5 n3	0,0025 (0,00 – 0,005)	0,0185 (0,018 – 0,019) ^a	0,005 (0,004 – 0,006)	0,0105 (0,00 – 0,021)	0,003 (0,002 – 0,004) ^b	0,0105 (0,008 – 0,013)	0,0025 (0,002 – 0,003) ^b	0,01925 (0,0175 – 0,021) ^{a,e,g}
C22:5 n3	0,0055 (0,005 – 0,006)	0,01 (0,009 – 0,011)	0,0065 (0,006 – 0,007)	0,0065 (0,003 – 0,01)	0,0065 (0,005 – 0,008)	0,0065 (0,006 – 0,007)	0,0065 (0,006 – 0,007)	0,013 (0,011 – 0,015) ^{a,b,e}
C22:6 n3 (DHA)	0,12 (0,109 – 0,131) ^d	0,245 (0,235 – 0,255) ^{a,c}	0,135 (0,121 – 0,149)	0,2145 (0,188 – 0,241)	0,136 (0,122 – 0,15)	0,217 (0,214 – 0,22)	0,136 (0,132 – 0,14)	0,42 (0,354 – 0,486) ^{a,c,e,g}
AGPI	0,5065 (0,499 – 0,514)	0,5925 (0,575 – 0,61)	0,5205 (0,491 – 0,55)	0,5955 (0,483 – 0,708)	0,72 (0,671 – 0,769)	0,737 (0,72 – 0,754) ^{a,c}	0,71 (0,673 – 0,747)	1,488 (1,248 – 1,728) ^{a,b,c,d}
AG totales	1,217 (1,192 – 1,241)	1,322 (1,302 – 1,342)	1,228 (1,172 – 1,283)	1,257 (1,024 – 1,489)	1,583 (1,391 – 1,774)	1,562 (1,506 – 1,618)	1,542 (1,444 – 1,639)	2,936 (2,462 – 3,41) ^{a,b,c,d}

ANEXO 9: Resumen de los mecanismos protectores de DHA e HT frente a DAG a nivel molecular.

