



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Doctor Fernando Monckeberg Barros**

**“Efecto de la suplementación con ácido eicosapentaenoico más hidroxitirosol en la prevención del hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en grasa en ratón”**

**Tesista: Francisca Echeverría González**

**Director de Tesis: Dr. Rodrigo Valenzuela Báez**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADOMAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
MENCION NUTRICIÓN HUMANA**

Noviembre de 2016

Santiago-Chile

## **1. Cuerpo preliminar**

### **i. Comisión de tesis**

Miguel Llanos, Profesor Asociado; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos  
Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

Pamela Rojas, MSc, Profesor Asistente; Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile.

Rodrigo Troncoso, PhD, Profesor Asistente; Instituto de Nutrición y Tecnología de los  
Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

## **ii. Dedicatoria**

A mi familia, especialmente a mis padres, ya que nunca terminaré de agradecer la educación que me dieron con tanto esfuerzo para que yo pudiera realizarme como persona y profesional.

A mis amigas del alma, a las de infancia y a las amigas que he ganado durante mi formación, por su cariño, inteligencia, y forma de ver las cosas. Estoy enormemente agradecida de compartir la vida con mujeres fuertes, que al igual que yo, se proponen metas y las cumplen.

### **iii. Agradecimientos**

Le agradezco primero que todo al profesor Rodrigo Valenzuela, por guiarme en este largo proceso, y por motivarme a seguir en la carrera académica. Sobre todo, le agradezco por sus consejos, motivación, y por su infinita generosidad.

Agradezco a Alicia Corbari, Patricio Muñoz, Romina Vargas, y a Alejandra Espinosa, por sus enseñanzas y por instruirme en el mundo de la investigación, además de la paciencia que tuvieron para responder mis dudas y ayudarme en todo momento. También al profesor Luis Videla y al profesor José Galgani, por apoyar el desarrollo de esta tesis.

Agradezco además a mis profesores, a los que tuve durante mi formación como nutricionista como a los profesores que tuve durante el programa de Magíster, ya que cada uno de ellos aportó a mi formación tanto profesional como personal.

Por último, agradezco especialmente a los profesores de mi comisión, y al profesor Fernando Pizarro, por su buena disposición y críticas constructivas que me permitieron desarrollar un mejor trabajo.

#### iv. Índice de contenidos

	Página
1. Cuerpo preliminar .....	2
i. Comisión de tesis.....	2
ii. Dedicatoria.....	3
iii. Agradecimientos .....	4
iv. Índice de contenidos.....	5
v. Índice de tablas .....	8
vi. Índice de figuras .....	9
vii. Lista de abreviaturas .....	10
2. Resumen .....	12
3. Abstract .....	13
4. Introducción .....	14
4.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA).....	14
4.2 Prevalencia y factores de riesgo de la EHGNA.....	14
4.3 Influencia de la dieta en la patogenia de la EHGNA .....	14
4.4 Alteraciones metabólicas en la EHGNA .....	15
4.5 AGPICL n-3: efectos beneficiosos para la salud .....	16
4.6 EPA: efectos beneficiosos para la salud .....	17
4.7 AGPICL n-3 en la EHGNA .....	18
4.8 Hidroxitirosol (HT): efectos beneficiosos para la salud .....	19
4.9 HT en la EHGNA .....	20
4.10 Formulación del proyecto.....	21
5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos .....	22
Hipótesis: .....	22

Objetivo general: .....	22
Objetivos específicos:.....	22
6. Metodología .....	23
6.1 Definición de la muestra .....	23
6.2 Definición del diseño de la investigación .....	23
6.3 Protocolo de intervención .....	23
6.4 Grupos experimentales .....	24
6.5 Definición de conceptos y variables .....	24
6.6 Procedimientos y técnicas realizados.....	26
6.7 Elaboración del plan de análisis y técnicas estadísticas.....	28
7. Resultados .....	29
7.1 Efecto de la suplementación con HT y EPA en peso corporal, peso del hígado y peso del tejido adiposo: .....	29
7.2 Efecto de la suplementación con HT y EPA en la ingesta dietaria:.....	29
7.3 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de esteatosis y daño hepático: .....	30
7.4 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de estrés oxidativo:.....	34
7.5 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de respuesta inflamatoria:.....	39
7.6 Efecto de la suplementación dietaria con HT y EPA sobre el perfil hepático de de AG:.....	39
8. Discusión.....	42
8.1 Efecto de la suplementación con HT y EPA en peso corporal, peso del hígado y peso del tejido adiposo: .....	42
8.2 Efecto de la suplementación con HT y EPA en la ingesta dietaria:.....	43

8.3	Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de esteatosis y daño hepático: .....	44
8.4	Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de estrés oxidativo:.....	46
8.5	Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de respuesta inflamatoria:.....	48
8.6	Efecto de la suplementación dietaria con HT y EPA sobre el perfil hepático de AG:.....	49
8.7	Limitaciones y aportes del estudio.....	50
9.	Conclusiones .....	51
10.	Referencias.....	52
11.	ANEXOS .....	62
	ANEXO 1: Información nutricional de las dietas experimentales .....	62
	ANEXO 2: Perfil de AG del aceite de anchoveta rico en EPA (Golden Omega).....	64
	ANEXO 3: Cálculo y discusión de la dosis de suplementación de HT y EPA extrapolada a seres humanos .....	66
	ANEXO 4: Cantidades de plasma y tejido utilizadas para las distintas mediciones .....	68
	ANEXO 5: Características generales de los grupos experimentales .....	69
	ANEXO 6: Control de ingesta por grupo experimental .....	70
	ANEXO 7: Evolución de peso corporal y control de ingesta, por semana .....	71
	ANEXO 8: Niveles séricos de transaminasas.....	72
	ANEXO 9: Efecto neto de la suplementación sin diferencias significativas .....	73
	ANEXO 10: Efecto neto en la suplementación sobre los distintos parámetros de glutación .....	74
	ANEXO 11: Resumen de los mecanismos protectores de HT y EPA frente a la DAG...	75

**v. Índice de tablas**

<b>Tabla 1</b>	Grupos experimentales.....	24
<b>Tabla 2</b>	VARIABLES DESCRIPTIVAS.....	24
<b>Tabla 3</b>	VARIABLES DEPENDIENTES.....	25
<b>Tabla 4</b>	Perfil hepático de AG por grupo experimental.....	41



## vi. Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Resultados de histología hepática de ratones alimentados con DC y DAG sin y con suplementación de HT, EPA o suplementación conjunta de HT+EPA. Cada imagen corresponde a un corte de hígado representativo de (A)DC, (B)DC+HT, (C)DC+EPA, (D)DC+HT+EPA, (E)DAG, (F)DAG+HT, (G) DAG+EPA, (H)DAG+HT+EPA.....32
<b>Figura 2</b>	Niveles hepáticos de grasa total, triacilglicéridos y ácidos grasos libres. (A) Niveles hepáticos de grasa total; (B) Niveles hepáticos de TAG; (C) Niveles hepáticos de AGL.....33
<b>Figura 3</b>	Capacidad antioxidante plasmática y actividad de SOD en hígado. (A)Capacidad antioxidante plasmática; (B)Actividad hepática de SOD.....36
<b>Figura 4</b>	Niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), glutatión total (equivalentes de GSH), y razón GSH/GSSG. (A)GSH hepático; (B)GSSG hepático; (C)Equivalentes de GSH; (D)Razón GSH/GSSG.....37
<b>Figura 5</b>	Niveles hepáticos de proteínas oxidadas, F-8 Isoprostanos y TBARS. (A) Proteínas oxidadas; (B) F-8 Isoprostanos; (C)TBARS.....38
<b>Figura 6</b>	Niveles séricos de IL-6, IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ . (A)IL-6; (B)IL-1 $\beta$ ; (C)TNF- $\alpha$ .....40

## **vii. Lista de abreviaturas**

<b>%EMAG</b>	Porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AAL</b>	Ácido alfa-linolénico
<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AGM</b>	Ácidos grasos monoinsaturados
<b>AGPI</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>AGPICL n-3</b>	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3
<b>AGPICL n-6</b>	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-6
<b>AGPICL</b>	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
<b>AGS</b>	Ácidos grasos saturados
<b>AL</b>	Ácido linoléico
<b>ALA</b>	Ácido $\alpha$ -linoléico
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>AO</b>	Ácido oleico
<b>AOEV</b>	Aceite de oliva extra virgen
<b>AP-1</b>	Proteína activante-1
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenasa-1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>DAG</b>	Dieta alta en grasa
<b>DC</b>	Dieta control
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico
<b>ECNT</b>	Enfermedades crónicas no transmisibles
<b>EHGNA</b>	Enfermedad por hígado graso no alcohólico
<b>EHNA</b>	Esteatosis hepática no alcohólica
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico

<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FOXO3a</b>	Factor de transcripción <i>forkhead 3a</i> , en inglés
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HO-1</b>	Hemoxigenasa-1
<b>HT</b>	Hidroxitirosol
<b>IL1β</b>	Interleuquina 1β
<b>IL-6</b>	Interleuquina-6
<b>IR</b>	Insulinorresistencia
<b>kcal</b>	Kilocalorías
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide 2
<b>O<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Radical superóxido
<b>PGC1α</b>	Proteína coactivadora G1-alfa
<b>PPAR-α</b>	Receptor activado por proliferadores peroxisomales-alfa
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RvE1</b>	Resolvina E1
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SREBP-1c</b>	Proteína de unión al elemento regulador del esterol-1c
<b>TAG</b>	Triacilglicéridos
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>TMB</b>	Tasa metabólica basal
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral-alfa
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

## 2. Resumen

**Introducción:** La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) tiene una alta prevalencia mundial (20-30%), siendo sus principales causas la dieta y estilos de vida occidentales. Se caracteriza por diferentes alteraciones metabólicas: insulinoresistencia (IR), inflamación, estrés oxidativo, y esteatosis hepática, por una disminución de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) de la serie n-3, y una razón n-6/n-3 aumentada en el hígado. El ácido eicosapentaenoico (EPA) es un AGPICL n-3 que podría formar parte del tratamiento la EHGNA, ya que tiene efectos antiinflamatorios y antilipogénicos. Sin embargo, los AGPICL n-3 son oxidados fácilmente, por lo que en altas dosis podrían contribuir aún más con el estrés oxidativo. Por otro lado, el hidroxitirosol (HT) es un polifenol presente en el aceite de oliva extra virgen (AOEV), con efectos antioxidantes y citoprotectores, por lo que administrado en conjunto a EPA podría disminuir la progresión de la EHGNA. **Objetivo:** Determinar el efecto de la suplementación dietaria con EPA más HT en la prevención del hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en grasa (DAG) en ratón. **Métodos:** Ratones machos C57BL/6J fueron divididos aleatoriamente en 8 grupos experimentales (n=7-8 por grupo), 4 grupos fueron alimentados con DAG y 4 con dieta control (DC) durante 12 semanas, con un grupo sin suplementación, otro solo con EPA (50mg/kg/d), otro solo con HT (5mg/kg/d), y otro con EPA (50mg/kg/d) + HT (5mg/kg/d). Se evaluaron parámetros de daño y esteatosis hepática, estrés oxidativo, inflamación, y perfil hepático de ácidos grasos (AG). El análisis estadístico se hizo con Two-way ANOVA y post-test Bonferroni, comparando el grupo DAG+HT+EPA versus DC con el test T de Student, con un  $p < 0,05$ . **Resultados:** La alimentación con DAG indujo esteatosis hepática, estrés oxidativo, un estado proinflamatorio, y aumento de la relación de AGPICL n-6/n-3. A su vez, la suplementación de HT+EPA generó un efecto protector mayor al efecto de la suplementación individual, resultando en: i) menor acumulación de lípidos hepáticos; ii) disminución de los niveles de estrés oxidativo; iii) disminución del estado proinflamatorio; iv) disminución de la razón de AGPICL n-6/n-3, aumentando la proporción de los n-3 en hígado. **Conclusiones:** En este estudio, la suplementación con HT+EPA fue efectiva en prevenir las alteraciones de la EHGNA inducida por DAG en ratones C57BL/6J, por lo que podría considerarse como una terapia efectiva para la prevención y tratamiento de esta patología.

### 3. Abstract

**Introduction:** Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a high prevalence disease worldwide (20-30%), being modern diet and occidental lifestyle their main causes. NAFLD is characterized by metabolic disorders: insuline resistance, inflammation, oxidative stress, and liver steatosis, and by a decrease in n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), and an increase of n-6/n-3 ratio, in liver. Eicosapentaenoic acid (EPA) is an n-3 LCPUFA potentially therapeutic for the treatment of NAFLD, because of their antiinflammatory and antilipogenic effects. Nevertheless, n-3 LCPUFAs are readily oxidized, so given in high doses could aggravate oxidative stress. On the other side, hydroxytyrosol (HT) is a polyphenol present in extra virgin olive oil (EVOO), that has shown antioxidant and cytoprotective effects, so that HT and EPA given jointly could delay progression of NAFLD. **Objective:** Determine the effect of the dietary supplementation with EPA and HT on the prevention of NAFLD induced by high fat diet (HFD) in mice. **Methods:** C57BL/6J male mice were randomly distributed in 8 experimental groups (n=7-8 each group), 4 groups were fed with HFD and 4 groups with control diet (CD) during a 12 weeks period, and orally supplemented with EPA (50mg/kg/d), HT (5mg/kg/d), or combination of EPA (50mg/kg/d) + HT (5 mg/kg/d), with one group without supplementation. This study evaluated liver damage and steatosis, oxidative stress, inflammation, and fatty acids (FA) profile in liver. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA and Bonferroni post-test, and T-test was performed to compare DAG+HT+EPA with DC,  $p < 0.05$ . **Results:** HFD induced hepatic steatosis, oxidative stress, a proinflammatory status, and an increase on the n-6/n-3 ratio. At the same time, the supplementation with EPA+HT generated a greater effect than HT or EPA given individually, resulting in: i) reduction of liver steatosis; ii) decrease of parameters of oxidative stress ii) decrease of inflammation; iii) a lower n-6/n-3 FA ratio, with an increase of n-3 LCPUFAs content in liver. **Conclusion:** In this study, the supplementation with EPA+HT was effective in preventing NAFLD alterations induced by HFD in C57BL/6J mice, so that it could be considered as an effective therapy in the prevention and treatment of this disease.

## **4. Introducción**

### **4.1 Enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA)**

La EHGNA se caracteriza por la acumulación de grasa en las células hepáticas (esteatosis hepática), sin una ingesta excesiva de alcohol (<10g/día en mujeres; <20 g/día en hombres) (1,2). A pesar de que la EHGNA suele ser asintomática, puede avanzar hacia una condición más severa, incluyendo esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y hepatocarcinoma (3,4). La EHNA corresponde a un conjunto de desórdenes hepáticos: esteatosis, inflamación, injuria celular y fibrosis, pudiendo progresar a cirrosis (4,5). Por lo tanto, la EHGNA se refiere tanto a la esteatosis hepática como a sus etapas progresivas (EHNA y cirrosis asociada a hígado graso) (2).

### **4.2 Prevalencia y factores de riesgo de la EHGNA**

La EHGNA es la enfermedad hepática crónica más prevalente en el mundo (6), con una prevalencia mundial estimada de 20-30% y un creciente aumento de personas que presentan factores de riesgo para su desarrollo (2,7). Sin embargo, faltan estudios epidemiológicos que estimen la prevalencia de esta enfermedad en la población general chilena. López-Velásquez y cols. 2014, realizaron una revisión de la situación epidemiológica y prevalencia de factores de riesgo de EHGNA en la región de las Américas, encontrando una prevalencia estimada en Chile de 23%, utilizando ultrasonido como diagnóstico en una población de estudio de n = 832 sujetos (8). Hay que considerar que estos datos no son necesariamente representativos a nivel nacional, ya que no hay registro dado lo complejo del diagnóstico de esta enfermedad.

Hay una estrecha relación entre síndrome metabólico (conjunto de factores de riesgo cardiovascular y de diabetes: obesidad abdominal, dislipidemias, insulinoresistencia (IR) e hipertensión arterial) y EHGNA, siendo la mal nutrición por exceso y el sedentarismo propios del estilo de vida occidental, sus principales causas (4).

### **4.3 Influencia de la dieta en la patogenia de la EHGNA**

La EHGNA es una enfermedad multifactorial que involucra la interacción de factores genéticos, dieta y de estilos de vida (9). La dieta occidental se caracteriza por una elevada ingesta energética proveniente principalmente del consumo de harinas, productos derivados de cereales, azúcares agregados, grasas, y jarabe de maíz alto en fructosa como endulzante

de bebidas y alimentos altamente procesados, lo que ha contribuido a aumentar la prevalencia de la EHGNA (10). La ingesta excesiva y permanente de ácidos grasos saturados (AGS) e hidratos de carbono favorecen el depósito de ácidos grasos (AG) y la lipogénesis hepática en obesidad (11,12). El aumento de la glicemia, con su consiguiente elevación de la insulina, favorecen esta alteración metabólica (13). Por otro lado, la dieta occidental también se caracteriza por un bajo consumo de pescados grasos, los cuales son ricos en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) de la serie n-3, lo que sumado a un aumento en el consumo de aceites vegetales y carnes ricos en AGPICL n-6, particularmente ácido linoleico (AL, C18:2 n-6), ha generado a un desbalance en la razón n-6/n-3, pasando de 5:1 a 15-20:1 (10). Este desbalance provoca un aumento de los derivados del ácido araquidónico (AA) con actividad procoagulante y proinflamatoria (14,15).

#### **4.4 Alteraciones metabólicas en la EHGNA**

La IR se relaciona con obesidad, síndrome metabólico y EHGNA, y se observa tanto en tejidos periféricos como en hígado (16). La IR periférica resulta en un aumento de la lipólisis y en un almacenamiento incorrecto de lípidos como resultado de una inhibición reducida de la lipasa hormona sensible y la actividad disminuida de factores de transcripción involucrados en la formación de la gota lipídica (17,18); mientras que la IR hepática, puede suprimir de manera insuficiente la gluconeogénesis (19). Defectos en la señalización de insulina e IR periférica han sido ligados a acumulación intrahepatocelular de grasas (16). La IR promueve la secreción de ácidos grasos libres (AGL) del tejido adiposo al plasma (lipólisis), lo que aumenta aún más el sustrato para lipogénesis (20), resultando en esteatosis hepática.

Los eventos moleculares resultantes en una acumulación intrahepática de lípidos y crecimiento de las gotas lipídicas podrían surgir de: a) un aumento en la captación de lípidos, b) elevada síntesis de novo de AG, c) incorrecta síntesis o secreción de lipoproteínas, d) oxidación de AG disminuida (2).

La esteatosis hepática puede surgir de un consumo excesivo de ácidos grasos y/o glucosa, lipotoxicidad, e IR. Una sobrecarga lipídica provoca una hipertrofia del adipocito e incompetencia metabólica. En consecuencia, hay infiltración de macrófagos en el tejido

adiposo y aparece la inflamación (18). La progresión de esteatosis hepática hacia EHNA está ligada al efecto de citoquinas proinflamatorias y un desequilibrio en las adipocinas. Esto aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), que producen estrés oxidativo, contribuyendo a aumentar la lipoperoxidación lipídica (2).

La hipótesis de los “dos golpes” (*two-hit hypothesis*, en inglés) explicaría la patogenia de la EHGNA. El primer golpe, correspondería a la esteatosis producto de una acumulación excesiva de triacilglicéridos (TAG) en el hígado. Luego, debido al aumento de los radicales libres y con ello del estrés oxidativo, ocurriría el segundo golpe, el cual asociado con una disfunción mitocondrial y un estado proinflamatorio, aumentaría el estrés de retículo, llevando a un aumento de las vías apoptóticas de los hepatocitos con una consiguiente fibrosis en el hígado (21–23).

#### **4.5 AGPICL n-3: efectos beneficiosos para la salud**

Los AGPICL n-3, son compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los seres humanos. El ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) son metabolitos resultantes de reacciones de elongación y desaturación a partir del ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, C18:3 n-3) que ocurren en el hígado (15). EPA y DHA, están presentes principalmente en el pescado, sobre todo pescados grasos (salmón, arenque, anchoa, caballa) (24). Se han asociado con múltiples efectos fisiológicos y beneficiosos para la salud, proponiéndose su uso terapéutico en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), entre ellas la obesidad y la diabetes mellitus (14). El valor superior del intervalo aceptable de distribución de nutrientes para el consumo de EPA y DHA se ha establecido en 2 g al día, ya que existe evidencia que indica que un consumo mayor de AGPICL n-3 en forma de suplementos puede suponer un incremento en la peroxidación lipídica y reducir la producción de citoquinas (24).

Los efectos protectores de los AGPICL n-3 están mediados principalmente por: a) cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana, lo que favorece la incorporación de receptores y el mantenimiento de las vías de señalización, incluyendo la de insulina, b) reducción de la síntesis de eicosanoides proinflamatorios derivados del AA y c) producción eicosanoides y docosanoides con efectos antiinflamatorios (25). Por otro lado, los AGPICL n-3 inducen la activación del factor de transcripción receptor activado por proliferadores



peroxisomales-alfa (PPAR- $\alpha$ ; *peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*, en inglés) favoreciendo la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y en la reducción de la biosíntesis de ácidos grasos (26).

El efecto antiinflamatorio y antioxidante de los AGPICL n-3 es a través de sus metabolitos derivados que son los eicosanoides y docosanoides (27,28). Existen tres mecanismos que explican su acción antiinflamatoria: a) vía competencia, previniendo la conversión del AA en eicosanoides proinflamatorios tales como prostaglandinas y leucotrienos; b) sirviendo como sustrato para la producción de prostaglandinas y leucotrienos menos potentes y tromboxanos; c) a través de mediadores antiinflamatorios derivados de AGPICL n-3, que son las resolvinas de la serie E y D y protectinas de la serie D (25,29).

#### **4.6 EPA: efectos beneficiosos para la salud**

El EPA tiene un rol cardioprotector, ya que tiene propiedades antiinflamatorias y anticoagulantes, lo que sugiere que este ácido graso podría utilizarse como parte de tratamiento de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (14). El EPA compite con el AA sirviendo como sustrato para la producción de metabolitos con acción antiinflamatoria (30). Durante el proceso inflamatorio, el AA es metabolizado por un grupo de enzimas conocidas como lipooxigenasas y ciclooxigenasas (COX), que van a generar eicosanoides bioactivos, entre los que se encuentran las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (31). Existen dos isoenzimas de la COX: la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). La COX-1 se expresa como componente constitutivo en la mayoría de las células; la COX-2 es inducible en diferentes tipos de células y su expresión se incrementa por diversos estímulos(32,33). El EPA también es un sustrato de la COX (1 y 2) y de la lipooxigenasa-5 cuando se ubica en la membrana plasmática, por lo cual compite con el AA en la generación de eicosanoides, pero en el caso del EPA estos presentan propiedades antiinflamatorias y antiagregación plaquetaria (34). El EPA inhibe *in vitro* la transformación del AA por la COX en sus derivados eicosanoides con lo cual la suplementación dietaria con EPA puede reducir la formación de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos con actividad proinflamatoria y mantener los niveles de la prostaglandina I<sub>2</sub> la cual es un inhibidor de la agregación plaquetaria (35,36). Los productos de la conversión del EPA son significativamente menos potentes en estimular la

inflamación, la vasoconstricción y la agregación plaquetaria, e incluso pueden antagonizar los efectos típicamente pro-inflamatorios de los eicosanoides derivados del AA (30,37). Por otro lado, las resolvinas formadas a partir de EPA por la acción de la COX-2, se denominan resolvinas de la serie E y comprenden diversas moléculas. Entre ellas, la primera en aislarse y estudiarse fue la resolvina E1 (RvE1) (38). La RvE1 protege ante la injuria medida por leucocitos y ante la expresión excesiva de genes proinflamatorios (29).

#### **4.7 AGPICL n-3 en la EHGNA**

Una baja biodisponibilidad de AGPICL n-3 y una composición alterada de las bicapas lipídicas en hígados con esteatosis contribuirían a exacerbar la esteatosis por un aumento de la lipogénesis y de producción de moléculas inflamatorias (2). La disminución de AGPICL n-3 en esteatosis hepática podrían ser el resultado de causas dietarias (asociado a obesidad, al bajo consumo de AGPICL n-3 y al aumento de la razón n-6/n-3) o de la inhibición de las desaturasas por una exposición a altos niveles de EROs, con un subsecuente aumento de su lipoperoxidación hepática (14,39).

El desbalance de la razón n-6/n-3 con el consiguiente aumento en la producción de eicosanoides proinflamatorios y un desajuste en la regulación de la función hepática y del tejido adiposo, predispone a la EHGNA (15). Esto se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias, activación de neutrófilos, aumento en la producción de EROs, y aumento en la permeabilidad vascular, incrementando el riesgo de agregación plaquetaria y hemorragia. Por otro lado, los eicosanoides derivados de EPA que tienen un efecto antiinflamatorio en comparación con los derivados del AA, están disminuidos (40).

La acción de las enzimas  $\Delta 5$ -desaturasas y  $\Delta 6$  desaturasas que catalizan las reacciones de desaturación puede estar desequilibrada por distintos factores incluyendo dieta, concentraciones de insulina, estrés oxidativo y enfermedad hepática (15). En los pacientes con EHGNA se ha visto menor actividad de ambas enzimas, asociado con IR y estrés oxidativo (41).

El EPA es un potente activador de PPAR $\alpha$  y el DHA controla el factor de transcripción proteína de unión al elemento regulador del esteroles (SREBP-1c; *sterol regulatory element-binding protein 1c*, en inglés) (24). PPAR- $\alpha$  es un factor de transcripción que regula el

metabolismo de AG, controlando vías metabólicas que incluyen: diferenciación de adipocitos, inflamación, metabolismo de lipoproteínas y oxidación de AG. Este factor de transcripción, tiene un rol importante en el metabolismo de lípidos, favoreciendo la expresión de genes involucrados en la absorción, transporte, oxidación, cetogénesis, además de reducir la expresión de genes proinflamatorios (42). PPAR- $\alpha$  puede activarse por varios ligandos, entre ellos los AGPICL n-3 (42,43). Los efectos de su activación se asocian con un aumento en el catabolismo de AG y una disminución de la respuesta inflamatoria (44). En la EHGNA, la importante depleción de los niveles hepáticos de AGPICL n-3 podría producir una disminución significativa de la actividad de PPAR- $\alpha$ , lo que favorecerá condiciones prolipogénicas y proinflamatorias, siendo estas alteraciones moleculares de gran importancia en el desarrollo y progresión de la EHGNA (45,46). La pérdida de la activación del factor de transcripción PPAR- $\alpha$  medida por AGPICL n-3 disminuye la oxidación de AG, secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y disminuye la supresión de síntesis de colesterol y AG. Por lo tanto, la depleción de AGPICL n-3 sería un factor prolipogénico que podría aumentar la acumulación de lípidos favoreciendo la síntesis de TAG (47,48).

#### **4.8 Hidroxitirosol (HT): efectos beneficiosos para la salud**

El aceite de oliva tiene un gran contenido de antioxidantes, entre los cuales destacan carotenoides y compuestos fenólicos. Dentro de los últimos, se encuentran polifenoles simples y complejos. Entre los simples, está el 3,4-dihydroxyphenyl-ethanol más conocido como hidroxitirosol (HT) (49). El HT es un metabolito derivado de la oleuropeína, que es un componente fenólico presente en la oliva y en el aceite de oliva (50). El HT tiene efectos antioxidantes y citoprotectores, y se encuentra naturalmente en el aceite de oliva extra virgen (AOEV), como también en el vino tinto, y algunas frutas (51). Es considerado uno de los antioxidantes naturales con efecto más potente (52). Es el único polifenol reconocido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European, Food Safety Authority, EFSA*; en inglés) como protector de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (53). Para lograr ese efecto, se debe consumir 5mg de HT y sus derivados en AOEV al día, lo que puede ser consumido fácilmente en una dieta saludable (52,53). Los efectos beneficiosos del HT se han demostrado en distintos modelos de estudio, pero consumido a partir de alimentos ricos en este polifenol (51,54). El HT presente en el AOEV, ha

demostrado aumentar la sensibilidad a la insulina y la capacidad secretora de las células  $\beta$ -pancreáticas, y reducir el riesgo de desarrollar síndrome metabólico (54). El HT reduce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, previniendo la oxidación de LDL (51). El HT previene enfermedades cardiovasculares ya que inhibe oxidación de las LDL, inhibe la Hidroximetilglutaril Coa reductasa e inhibe la agregación plaquetaria (49). Además, disminuye la formación de EROs y la inducción de estrés oxidativo a través de la regulación de distintas enzimas. Por ejemplo, el HT protege células endoteliales del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) *in vitro*, resultado de una regulación positiva de la enzima catalasa. También inhibe la xantina oxidasa y reduce la formación de superóxido ( $O_2^-$ ) (49). El HT activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), lo que sugiere una regulación de la función mitocondrial a través de la vía de señalización de AMPK-proteína coactivadora G1-alfa (PGC1 $\alpha$ ) (55). Este compuesto fenólico previene síndrome metabólico inducido por dieta y atenúa anomalías metabólicas en ratones obesos (56). Además, dado su actividad antioxidante, el HT también podría generar respuesta antiinflamatoria, y a través de otros mecanismos como la inhibición de la acción de COX y la reducción de la formación de moléculas con actividad proinflamatoria (49).

#### **4.9 HT en la EHGNA**

Park y cols., 2011, encontraron que la suplementación con oleuropeína, compuesto precursor del HT, en ratones alimentados con DAG, tenía un efecto protector sobre la esteatosis hepática, el aumento de lípidos plasmáticos y sobre el aumento de peso corporal y del hígado, revirtiendo dichos efectos negativos inducidos por la dieta (57). Priore y cols. 2014, estudiaron el efecto de los distintos compuestos fenólicos (HT, tirosol y oleuropeína) presentes en el AOEV en hepatocitos de ratas, y encontraron una disminución de la síntesis de novo de AG, de colesterol y de TAG (58). En el estudio de Pirozzi y cols. 2016, se encontró que la suplementación con HT (10mg/kg/día) en ratas con EHGNA inducida por DAG tuvo efectos protectores frente al daño hepático provocado por la DAG: mejoró tolerancia a la glucosa, aumentó sensibilidad a la insulina, tuvo un efecto antiinflamatorio, disminuyó el estrés oxidativo, y redujo el colesterol plasmático, aumentando los niveles hepáticos de PPAR- $\alpha$  (59).

#### **4.10 Formulación del proyecto**

La EHGNA es una enfermedad compleja, multifactorial y que tiene una alta y creciente prevalencia a nivel mundial. Se relaciona estrechamente con síndrome metabólico y enfermedades crónicas como la diabetes y el cáncer, teniendo causas ambientales comunes como son la dieta alta en carbohidratos refinados y grasas saturadas, y baja en AGPICL n-3, además del estilo de vida occidental y sedentarismo. Teniendo eso en consideración, se hace fundamental comprender la patogenia de la enfermedad, además de buscar tratamientos y enfoques terapéuticos factibles que contribuyan a disminuir la EHGNA y su progresión en nuestra población.

Los AGPICL n-3 se conocen por tener propiedades benéficas en ECNT y en la EHGNA. Sin embargo, grandes dosis de suplementación podrían aumentar la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. En particular, EPA tiene propiedades antiinflamatorias y antiagregación plaquetaria, pero faltan estudios que evalúen el efecto de EPA administrado sin DHA. Por otro lado, el HT es el antioxidante más potente presente en el AOEV, y se ha visto que tiene efectos protectores en la EHGNA y sus alteraciones metabólicas, además podría contribuir a disminuir la dosis de EPA para evitar su lipoperoxidación. Por lo tanto, mediante el presente trabajo se evaluó el efecto de la suplementación con EPA e HT en la prevención de la EHGNA, en modelo de ratón alimentado con DAG.

## **5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos**

### **Hipótesis:**

La suplementación dietaria con ácido eicosapentaenoico (EPA) más hidroxitirosol (HT) previene la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) inducida por dieta alta en grasa (DAG) en ratón.

### **Objetivo general:**

Determinar el efecto de la suplementación dietaria con EPA más HT en la prevención de la EHGNA inducida por DAG en ratón.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar el grado de protección conferido por la suplementación dietaria con EPA e HT en ratones alimentados con DAG, sobre los siguientes parámetros:
  - 1.1 Esteatosis y daño hepático
  - 1.2 Estrés oxidativo en tejido hepático
  - 1.3 Respuesta inflamatoria
  
2. Determinar el impacto de la suplementación dietaria con EPA e HT sobre el perfil de ácidos grasos (AG) hepáticos en los diferentes tratamientos dietarios, considerando la relación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) n-6/n-3.

## **6. Metodología**

### **6.1 Definición de la muestra**

Se utilizaron ratones macho C57BL/6J de 21 días de edad después del destete y con un peso inicial de entre 12 y 14 gramos obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se trabajó con esta cepa de ratones dada su utilidad para el estudio de alteraciones metabólicas (60).

El cálculo del tamaño muestral se realizó con el software estadístico G\*Power 3.0.10 considerando el modelo experimental, tipo de intervención, tamaño del efecto del 50% de reducción del contenido hepático de lípidos (variable crítica), significancia estadística de  $p < 0,05$  y un poder del 0.9, dando un total de 11 animales por grupo, lo que sumado a un 10% de margen, dio un total de 12 ratones por grupo ( $n=96$ ).

De cada animal se obtuvieron muestras de sangre y tejidos, obteniendo ambas muestras de un mismo ratón, y utilizando las muestras para más de un experimento.

### **6.2 Definición del diseño de la investigación**

Es un estudio experimental, aleatorizado, controlado, prospectivo, en modelo animal (ratón). El diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBA 0667 FMUCH).

### **6.3 Protocolo de intervención**

Los ratones fueron asignados aleatoriamente a uno de los ocho grupos experimentales y alojados en una habitación con temperatura controlada por ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad por 12 semanas. Los animales pertenecientes a cada grupo se asignaron a jaulas distintas, con libre acceso a la dieta correspondiente, y fueron suplementados diariamente según su tratamiento específico. Semanalmente, se evaluó tanto la ingesta como el incremento en el peso corporal de cada ratón. Al finalizar el período, los animales en ayunas fueron anestesiados con Isoflurano (Lunas better Pharmaceutical Co., Ltd) y sacrificados, obteniéndose muestras sanguíneas (por punción cardíaca) y de tejido hepático para el análisis. Además se obtuvo el peso corporal, peso del hígado, y peso del tejido adiposo.

## 6.4 Grupos experimentales

Por 12 semanas los ratones asignados a cada grupo fueron intervenidos con una de las siguientes dietas: dieta control (DC; Research Diet INC, dieta de ratón con 10% de las calorías provenientes de grasa, product data D12450B. USA) o dieta alta en grasa (DAG; Research Diet INC, dieta de ratón con 60% de las calorías provenientes de grasa, product data D12492. USA), con o sin suplementación de ácido eicosapentaenoico (EPA; Golden Omega, Chile), hidroxitirosol (HT; DSM Nutritional Products, Países Bajos); según los grupos experimentales que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Grupos experimentales

Grupo	Intervención	Grupo	Intervención
Grupo 1	DC	Grupo 5	DAG
Grupo 2	DC + HT	Grupo 6	DAG + HT
Grupo 3	DC + EPA	Grupo 7	DAG + EPA
Grupo 4	DC + HT + EPA	Grupo 8	DAG + HT + EPA

## 6.5 Definición de conceptos y variables

Variables independientes: Dieta → categórica, nominal, dicotómica: DC; DAG

Suplementación → categórica, nominal, 4 niveles: sin suplementación; HT; EPA; HT+EPA

Tabla 2: Variables descriptivas:

Variabes	Indicadores	Métodos
Peso corporal	G	Medición de peso en balanza analítica
Peso hígado	G	Medición de peso en balanza analítica
Peso tejido adiposo	G	Medición de peso en balanza analítica
Ingesta de alimento	g/día	Control de ingesta
Ingesta energética	kcal/día	Control de ingesta
Ingesta de hidratos de carbono	g/día	Control de ingesta
Ingesta de proteínas	g/día	Control de ingesta
Ingesta de lípidos	g/día	Control de ingesta



Tabla 3: Variables dependientes:

Variable	Indicadores	Métodos	Referencias
Esteatosis y daño hepático	% de células con infiltración de vesículas lipídicas en hígado	Histología	Brunt y cols. 1999
	Presencia de esteatosis, focos de inflamación, necrosis en hígado	Histología	Brunt y cols. 1999
	Niveles séricos de transaminasas (AST y ALT)	Kit espectrofotométrico	-
Contenido hepático de lípidos	Niveles hepáticos de grasa total (g/100 g hígado)	Bligh & Dyer y gravimetría	Bligh & Dyer, 1959
	Niveles hepáticos de TAG (mg/g hígado)	Kit colorimétrico	-
	Niveles hepáticos de AGL ( $\mu\text{mol/g}$ hígado)	Kit colorimétrico	-
Estrés oxidativo en plasma	Capacidad antioxidante plasmática (mM equivalentes de Trolox)	Kit colorimétrico	-
Estrés oxidativo en hígado	Niveles hepáticos de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) ( $\mu\text{mol/g}$ hígado)	Metodología de reciclaje enzimático	Rahman y cols, 2006
	Niveles hepáticos de F8-isoprostanos (pg/mg hígado)	Kit ELISA	-
	Niveles hepáticos de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS; nmol /mg proteína)	Kit colorimétrico	-
	Niveles hepáticos de proteínas carboniladas (nmol/mg de proteína)	Kit colorimétrico	-
	Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en hígado (U/mg proteína)	Kit colorimétrico	-
Respuesta inflamatoria	Niveles séricos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ; pg/ml)	Kit ELISA	-
	Niveles séricos de interleuquina-6 (IL-6; pg/ml)	Kit ELISA	-
	Niveles séricos de interleuquina 1 $\beta$ (IL1 $\beta$ ; pg/ml)	Kit ELISA	-
Perfil de ácidos grasos hepáticos	g de AG/100g de ésteres metílicos de AG en hígado (%EMAG)	Bligh & Dyer y cromatografía gas – líquida	Bligh & Dyer, 1959

## 6.6 Procedimientos y técnicas realizados

### 6.6.1 Dieta y suplementación

Las dietas fueron asignadas de manera aleatoria y cada animal tuvo libre acceso a su dieta correspondiente. Las dietas son isocalóricas y se encuentran certificadas (Research Diet INC) y por ende, son dietas estandarizadas con el mismo aporte de vitaminas y minerales:

- DC (Research Diet INC, rodent diet with 10% kcal% fat, product data D12450B. USA) es suficiente en nutrientes para el ratón y aporta el 10% de las calorías como grasa (Anexo 1, Tabla A).

- DAG (Research Diet INC, rodent diet with 60% kcal% fat, product data D12492. USA) aporta el 60% de las calorías como grasa, es suficiente en proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, en donde el único cambio es el reemplazo de hidratos de carbono por grasa (Anexo 1, Tabla B), lo cual se considera el modelo más recomendado para inducir EHGNA de origen nutricional (60).

La suplementación con EPA e HT fue administrada de forma oral en dosis de 50mg/kg de peso corporal al día y 5mg/kg de peso corporal al día, respectivamente.

- EPA (Golden Omega, Chile): aceite rico en EPA obtenido a partir de aceite de anchoveta, TAG 70% EPA (respecto al total de los AG poliinsaturados; AGPI). En el Anexo 2 se presenta el perfil de AG del aceite.

- HT (aceite elVida™ 40%, DSM Nutritional Products, Países Bajos): extracto de olivo con 40% de HT.

En el Anexo 3 se presenta el cálculo y la discusión de la equivalencia de la dosis de suplementación para seres humanos.

### 6.6.2 Evaluación de la esteatosis y marcadores de daño hepático:

- Evaluación histológica: evaluación cuantitativa (en base a la acumulación hepática de lípidos medida como porcentaje de células con infiltración de vesículas lipídicas) y cualitativa (presencia o ausencia de esteatosis, inflamación y necrosis) (61).

- Niveles séricos de transaminasas: niveles de AST y ALT (UI/l) en suero, mediante kit espectrofotométrico (specific diagnostic kits, Biomerieux, Marcy l' Etoile, Francia). Los valores se expresan como U/l.

### 6.6.3 Cuantificación del contenido hepático de grasa total, TAG y AGL:

- Grasa hepática total: extracción acorde al método de Bligh and Dyer (62) y cuantificación por gravimetría. Los valores se expresan como g/100 g de hígado.
- TAG hepáticos y AGL en el hígado: utilizando kit colorimétrico (#10010303, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA y #ab65341, Acbam, Cambridge, MA, USA; respectivamente.). Los valores se expresan como mg/g de hígado y  $\mu\text{mol/g}$  de hígado, respectivamente.

### 6.6.4 Evaluación del estrés oxidativo y capacidad antioxidante:

- Capacidad antioxidante plasmática: mediante kit colorimétrico (#709001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.). Los valores se expresan como mM equivalentes de Trolox.
- Actividad de SOD en hígado: mediante kit colorimétrico (#706002, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.). Los valores se expresan como U/mg proteína.
- Niveles hepáticos de glutatión total, GSH y GSSG: mediante la metodología de reciclaje enzimático (63). Los valores se expresan como  $\mu\text{mol/g}$  hígado.
- Niveles hepáticos de proteínas carboniladas: mediante kit colorimétrico (#10005020, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.). Los valores se expresan como nmol/mg de proteína.
- Niveles hepáticos de F-8 isoprostanos: mediante kit ELISA (#516351, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.). Los valores se expresan como pg/mg hígado.
- Niveles hepáticos de TBARS: mediante kit colorimétrico (#10009055, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA.). Los valores se expresan como nmol/mg de proteína.

### 6.6.5 Evaluación de la inflamación

- Niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL1 $\beta$ : mediante kit ELISA (#500850, #50083371, y #ab100704, respectivamente, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA para TNF- $\alpha$ , IL-6 y Acbam, Cambridge, MA, USA para IL1 $\beta$ ). Los valores se expresan como pg/ml.

#### 6.6.6 Determinación del perfil de AG hepáticos:

- Extracción y separación de lípidos tisulares: la extracción cuantitativa de los lípidos totales hepáticos se realizó de acuerdo a la técnica Bligh and Dayer (62). Las muestras fueron homogenizadas en ambiente frío y extraídas con cloroformo/metanol (2:1 v/v).
- Preparación de AG metilados: los lípidos saponificables obtenidos del tejido hepático fueron derivatizados a ésteres metílicos mediante hidrólisis alcalina (NaOH saturado en metanol), y posteriormente ácida ( $\text{BF}_3$  al 12% en metanol). El perfil de AG hepáticos se realizó mediante cromatografía gas – líquida, utilizando un cromatógrafo HP 7890-A. Los valores se expresan como g de AG/100g de %EMAG.

En el Anexo 4 se presentan las cantidades de plasma y tejido utilizadas para las distintas mediciones.

### 6.7 Elaboración del plan de análisis y técnicas estadísticas

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos se registraron en planillas Excel, para luego ser analizados mediante el software estadístico GraphPad Prism versión 6.0, San Diego, CA, USA. Solo se excluyeron aquellos datos que sobrepasaran  $\pm 2$  desviaciones estándar de la media. La evaluación de la distribución normal de los datos se realizó utilizando el test de Shapiro Wilk, dando como resultado una distribución normal de los datos. Para comparar entre grupos, se usó el test two-way ANOVA seguido del test Bonferroni (test post-hoc) para analizar entre qué grupos eran las diferencias, específicamente se comparó entre los grupos alimentados con DAG. Para determinar si el grupo DAG con suplementación conjunta (HT+EPA) tuvo efecto significativo sobre las distintas variables hasta normalizar los valores, se comparó este grupo con el grupo DC (grupo control), utilizando el test T de student. Finalmente, se analizaron los efectos netos de las distintas suplementaciones, restando el efecto de la dieta y, por lo tanto, quedando 6 grupos para análisis: (DC+HT)-DC, (DC+EPA)-DC, (DC+HT+EPA)-DC, (DAG+HT)-DAG, (DAG+EPA)-DAG, (DAG+HT+EPA)-DAG. Para determinar diferencias en el efecto neto de la suplementación sobre los distintos parámetros, se utilizó el test One-way ANOVA seguido del post-test Bonferroni. Se determinó una significancia estadística con  $p < 0,05$ . Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar (DE).

## **7. Resultados**

### **7.1 Efecto de la suplementación con HT y EPA en peso corporal, peso del hígado y peso del tejido adiposo:**

Las características generales de los grupos experimentales se presentan en el Anexo 5. En el peso inicial no se observaron diferencias significativas entre grupos, pero sí en el peso corporal al final. Los ratones con DAG sin suplementación tuvieron un peso mayor ( $p < 0,05$ ) que aquellos con DC y que aquellos tratados con DAG+EPA y DAG+HT+EPA. Además, los grupos alimentados con DAG con o sin suplementación, presentaron pesos significativamente mayores que sus respectivos controles alimentados con DC. El grupo DC no tuvo diferencias significativas en el peso final en comparación con DAG+HT+EPA. Esto es concordante con un mayor aumento de peso ( $p < 0,05$ ) del grupo DAG en comparación a DC, DAG+EPA y DAG+HT+EPA, sin diferencia significativa de este último con el grupo DC. En relación al peso del hígado, este fue significativamente menor en el grupo tratado con DAG más suplementación conjunta en relación a DC y DAG con suplementación única. Por el contrario, el peso del tejido adiposo fue mayor ( $p < 0,05$ ) en los grupos DAG+HT y DAG+EPA en comparación al grupo DAG y suplementación conjunta, sin embargo, todos los grupos alimentados con DAG tuvieron mayores pesos de tejido adiposo ( $p < 0,05$ ) que sus respectivos controles alimentados con DC. Al calcular la relación peso hígado/peso tejido adiposo, se observa que fue significativamente mayor en DC versus DAG y DAG+HT+EPA, observándose diferencias significativas entre los grupos DAG+HT y DAG+EPA y sus respectivos controles, mas no en el grupo DAG+HT+EPA. En la relación peso tejido adiposo/peso corporal, se observa que los grupos DAG, DAG+HT y DAG+EPA tuvieron una relación significativamente mayor que sus controles alimentados con DC, sin diferencias significativas entre DAG+HT+EPA en comparación con DAG. Por último, en la relación peso hígado/peso corporal, el grupo DC presentó una relación significativamente mayor que el grupo DAG y que el grupo DAG+HT+EPA.

### **7.2 Efecto de la suplementación con HT y EPA en la ingesta dietaria:**

En cuanto a la ingesta dietaria (Anexo 6), se encontraron diferencias significativas en la ingesta de gramos al día (g/d), siendo mayor ( $p < 0,05$ ) en el grupo DC que en DAG y DAG+HT+EPA, observándose la misma situación en la ingesta calórica, siendo además significativamente mayor la ingesta (g/d) en DAG+EPA versus su respectivo control. Esta

situación se repitió en la ingesta de proteínas, siendo mayor ( $p<0,05$ ) en el grupo DC versus el grupo DAG+HT+EPA. En cuanto a la ingesta de grasas, los grupos alimentados con DAG y las distintas suplementaciones, tuvieron una ingesta significativamente mayor en relación a sus respectivos controles, siendo también mayor ( $p<0,05$ ) en el grupo DAG+HT+EPA versus el grupo con DC sin suplementación. Caso contrario para la ingesta de hidratos de carbono, la cual fue mayor ( $p<0,05$ ) en DC sin suplementación versus DAG y DAG+HT+EPA, y menor ( $p<0,05$ ) en los grupos alimentados con DAG con o sin suplementación en comparación con sus controles. En el Anexo 7 se presenta la evolución del peso corporal y el control de ingesta por semana de los grupos DC, DAG y DAG+HT+EPA.

### **7.3 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de esteatosis y daño hepático:**

#### **- Esteatosis hepática:**

En la Figura 1 se presentan los resultados de histología en tejido hepático por grupo. En los ratones alimentados con DC, sin y con suplementación (Figura 1 A, B, C, D) se observa una histo-arquitectura normal de las células hepáticas, sin presencia de focos de inflamación o necrosis, ni focos de esteatosis hepática. En el grupo DAG (Figura 1E), hubo una alteración de la histo-arquitectura, sin focos de inflamación o necrosis. Se observan importantes focos de esteatosis micro y macro vesicular superior al 60% de los campos estudiados, mismo caso para DAG + EPA (Figura 1G). En el caso de DAG + HT (Figura 1F), la esteatosis fue superior al 40-50% de los campos estudiados. En el grupo DAG + HT + EPA (Figura 1H), también se observa una alteración de la histo-arquitectura, sin focos de inflamación o necrosis, pero la esteatosis micro y macro vesicular superó el 25-30%. Es importante destacar que en los grupos alimentados con DAG sin y con suplementación, se observa un desplazamiento del núcleo en los hepatocitos, perdiendo su ubicación central y desplazándose lateralmente, lo que ocurre cuando hay esteatosis, situación que no se observa en los grupos DC.

#### **- Transaminasas:**

En el Anexo 8 se presentan los resultados de los niveles de transaminasas hepáticas por grupo experimental. No hubo diferencias significativas en los niveles de AST ni de ALT, para todos los grupos experimentales.

- Grasa hepática total:

En la Figura 2A se presentan los niveles de grasa total en hígado. Se observa que el grupo tratado con DAG+HT+EPA tiene niveles significativamente menores de grasa hepática total en comparación con el resto de los grupos alimentados con DAG, reduciendo aproximadamente en un 42% dichos niveles en comparación al grupo con DAG sin suplementación. Sin embargo, la suplementación conjunta no logró alcanzar los niveles del grupo control. En cuanto al efecto neto de la suplementación (Anexo 9A), no se observaron diferencias significativas entre DAG+HT+EPA y DAG con suplementación única de HT o EPA.

- TAG en hígado:

En la Figura 2B se presentan los niveles hepáticos de TAG. Se observa que el grupo alimentado con DAG y suplementación conjunta tuvo niveles menores ( $p < 0,05$ ) que DAG y que DAG+HT, mas no tuvo diferencias significativas con DAG+EPA. El grupo DAG con suplementación conjunta redujo los niveles de TAG en un 52% con respecto a DAG. Sin embargo, la reducción de los niveles de TAG en hígado por la suplementación de HT+EPA en el grupo DAG no normalizó los valores al comparar con DC. Al analizar el efecto neto de la suplementación, se observa que cuando el grupo alimentado con DAG se suplementó con HT+EPA el efecto fue significativamente mayor que al suplementar solo con HT, sin embargo no hubo diferencias en el efecto con la suplementación única con EPA.

- AGL en hígado:

Los resultados de los niveles de AGL en hígado se presentan en la Figura 2C. El grupo con DAG+HT+EPA presentó niveles menores ( $p < 0,05$ ) de AGL en hígado en relación al resto de los grupos alimentados con DAG sin suplementación o con suplementación única, logrando una reducción de los niveles hepáticos de AGL de un 17% en relación a DAG. No obstante, dichos valores son significativamente diferentes a los valores del grupo DC, por lo que la suplementación conjunta, si bien reduce los niveles hepáticos de AGL en ratones alimentados con DAG, no normalizó los valores. En relación al efecto neto de la suplementación conjunta, esta fue significativamente mayor en cuanto a la suplementación con HT (2,8 veces) o con EPA (1,8 veces), al comparar entre grupos alimentados con DAG.

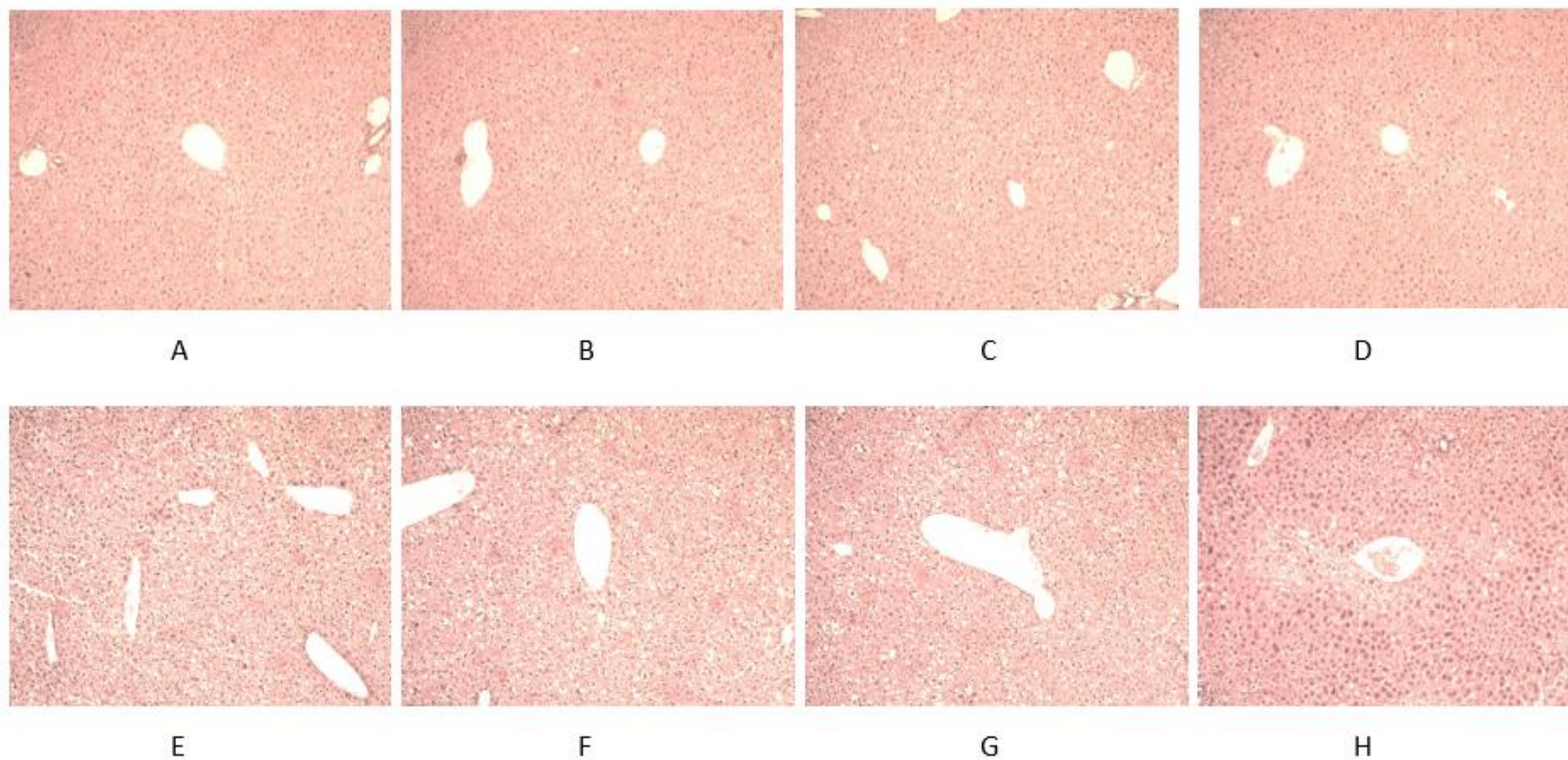


Figura 1: Histología hepática de ratones alimentados con DC y DAG sin y con suplementación de HT, EPA o suplementación conjunta de HT + EPA. Cada imagen corresponde a un corte de hígado representativo de (A) DC, (B) DC+HT, (C) DC+EPA, (D) DC+HT+EPA, (E) DAG, (F) DAG+HT, (G) DAG+EPA, (H) DAG+HT+EPA. Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina (10X de aumento); n =7-8 por grupo experimental.



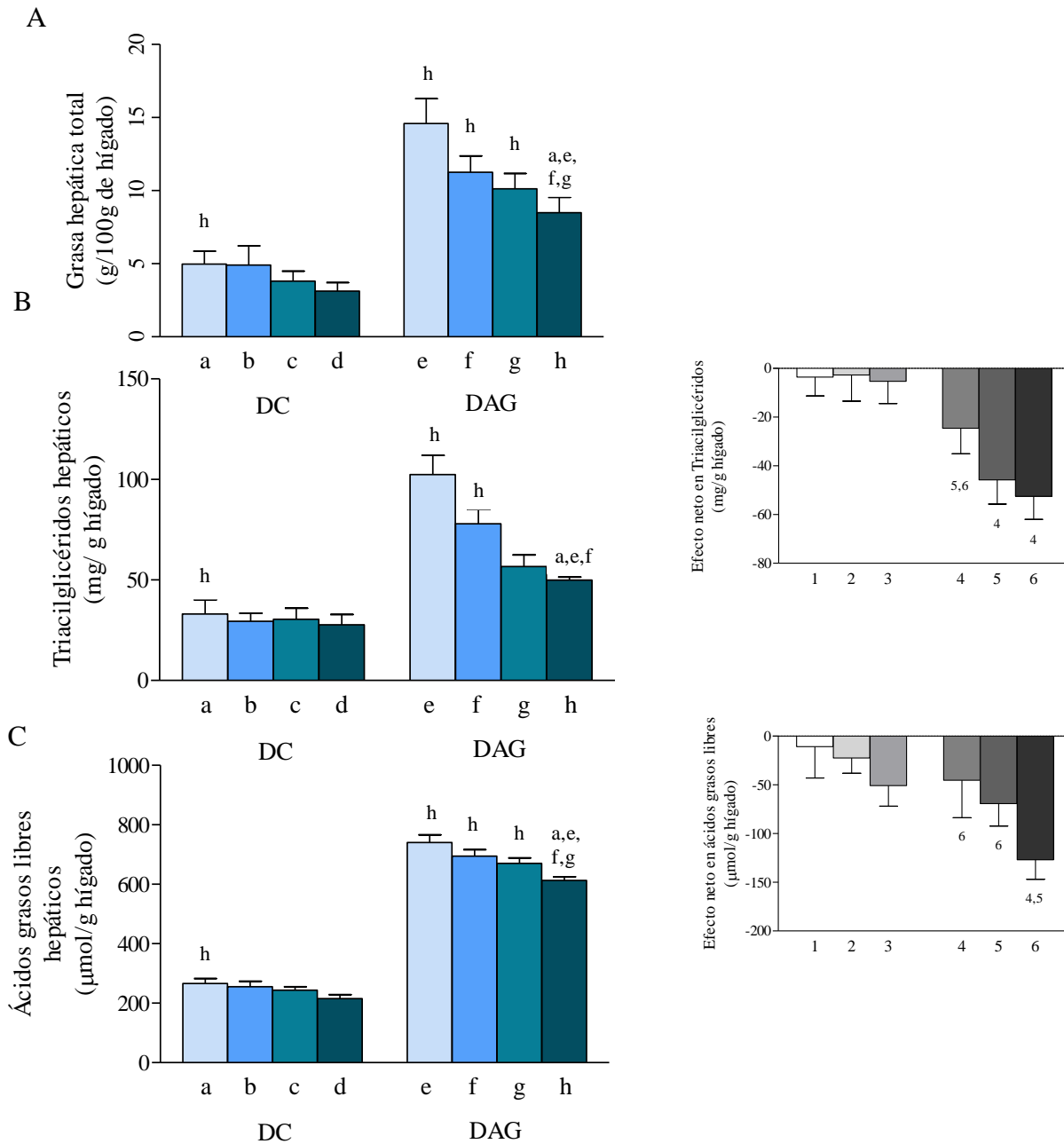


Figura 2: Niveles hepáticos de grasa total, triacilglicéridos (TAG) y ácidos grasos libres (AGL). (A) Niveles hepáticos de grasa total; (B) Niveles hepáticos de TAG; (C) Niveles hepáticos de AGL. Las figuras insertas (B-C) corresponden a los efectos netos calculados como se describe en la metodología. Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar; n=7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni, se presentan las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; test T de Student para comparar entre DAG+HT+EPA y DC; Test One-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni para comparar entre efectos netos. Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales, y los números las diferencias entre efectos netos, con  $p < 0,05$ : (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA; (1) (DC+HT)-DC, (2) (DC+EPA)-DC, (3) (DC+HT+EPA)-DC, (4) (DAG+HT)-DAG, (5) (DAG+EPA)-DAG, (6) (DAG+HT+EPA)-DAG.

#### **7.4 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de estrés oxidativo:**

- Capacidad antioxidante plasmática:

Los datos de capacidad antioxidante plasmática por grupo experimental se presentan en la Figura 3A. El grupo alimentado con DAG y suplementación conjunta, tuvo una capacidad antioxidante mayor ( $p < 0,05$ ) que el resto de los grupos alimentados con DAG, aumentando dicha capacidad en un 82% en relación al grupo DAG sin suplementación. Este aumento no tuvo diferencias con el grupo alimentado con DC, por lo que la suplementación conjunta en el grupo con DAG normalizó los valores de capacidad antioxidante. En relación al efecto neto, al comparar los grupos con DAG eliminando el efecto de la dieta, el grupo suplementado con HT+EPA tuvo un efecto significativamente mayor que el grupo suplementado con DAG, sin diferencias con el grupo suplementado con HT.

- Actividad hepática SOD:

La actividad hepática de SOD (Figura 3B) disminuyó en todos los grupos alimentados con DAG, con o sin suplementación, observándose una disminución de un 60% de la actividad en el grupo alimentado con DAG sin suplementación. No obstante, el grupo con DAG y suplementación conjunta mejoró esta situación, aumentando significativamente la actividad en 2,05 veces en relación a la misma dieta sin suplementación, mas no logró normalizar los valores. Al analizar el efecto neto de la suplementación entre los grupos alimentados con DAG, se observa que la suplementación de HT+EPA tuvo un efecto neto significativamente mayor que la suplementación única con HT o EPA.

- Niveles hepáticos de GSH y GSSG:

En el caso de los niveles de GSH y glutatión total (equivalentes de GSH) (Figura 4A y 4C, respectivamente), la suplementación conjunta aumentó ( $p < 0,05$ ) los niveles de ambos parámetros en los grupos alimentados con DAG en relación al grupo sin suplementación o con suplementación única de EPA. Sin embargo, no logró alcanzar los niveles de DC. En los niveles de GSSG (Figura 4B), ocurrió una situación similar, ya que el grupo con DAG+HT+EPA disminuyó ( $p < 0,05$ ) dichos niveles en un 27,8%, sin diferencias significativas con los grupos con DAG y suplementación única, mas no logró normalizar. Sin embargo, al analizar la razón GSH/GSSG en hígado (Figura 4D), esta aumentó significativamente con la suplementación conjunta en relación a DAG, sin diferencias

significativas con respecto a DC, por lo tanto, la suplementación con HT+EPA normalizó los valores. En el efecto neto (Anexo 10) de la suplementación conjunta sobre los grupos alimentados con DAG, se observa un efecto neto significativamente mayor de HT+EPA en relación a la suplementación única de EPA en los niveles de GSH y equivalente de GSH.

- Niveles hepáticos de proteínas oxidadas:

Los niveles hepáticos de proteínas oxidadas se presentan en la Figura 5A. El grupo tratado con DAG+HT+EPA disminuyó ( $p<0,05$ ) en un 31,8% los niveles de proteínas oxidadas en el hígado en relación al grupo alimentado con DAG sin suplementación, sin diferencias significativas con el grupo DAG suplementado solo con EPA. Sin embargo, no normalizó los valores. Concordante a ello, el efecto neto de la suplementación conjunta fue significativamente mayor al efecto de EPA, mas no al efecto de HT para este parámetro.

- Niveles hepáticos de F8-isoprostanos

En relación a los niveles de F8-isoprostanos en hígado (Figura 5B), el grupo tratado con DAG+HT+EPA presentó menores niveles ( $p<0,05$ ) que el resto de los grupos alimentados con DAG, disminuyendo los niveles de F8-isoprostanos en un 27,5% con respecto al grupo sin suplementación. Sin embargo, la suplementación conjunta no logró normalizar los valores hasta niveles de DC. El efecto neto de la suplementación conjunta fue significativamente mayor que el de la suplementación única con EPA entre los grupos alimentados con DAG.

- Niveles hepáticos de TBARS:

Los niveles hepáticos de TBARS se presentan en la Figura 5C. El grupo tratado con DAG+HT+EPA presentó menores niveles ( $p<0,05$ ) de TBARS en hígado en relación al grupo con DAG y al grupo con DAG+EPA. No obstante, los niveles no disminuyeron hasta alcanzar los niveles del grupo alimentado con DC. Se observa que el efecto neto de la suplementación fue 8 veces mayor que el efecto neto del EPA como suplementación única, sin diferencias significativas con el efecto neto del HT.

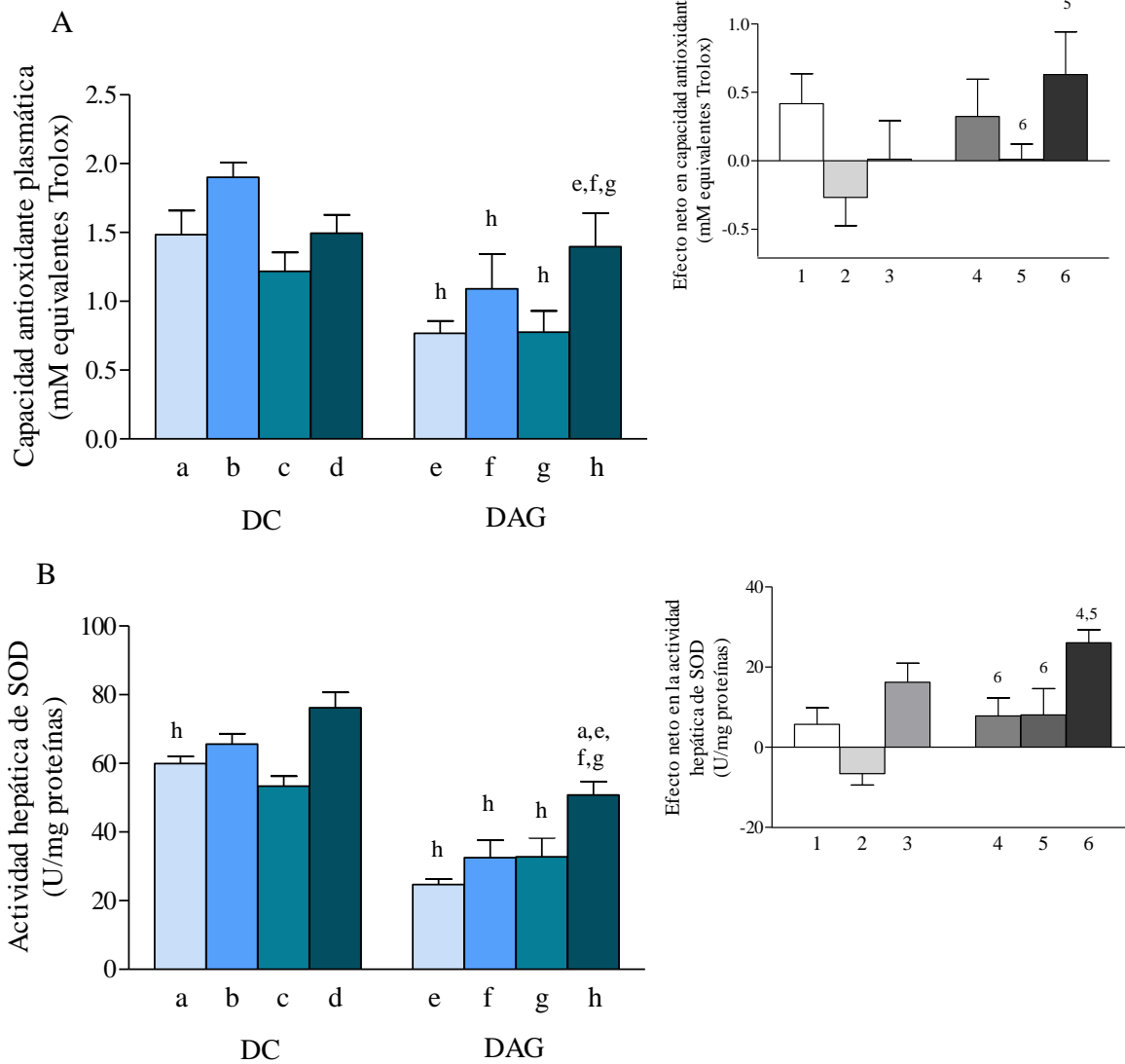


Figura 3: Capacidad antioxidante plasmática y actividad de SOD en hígado. (A) Capacidad antioxidante plasmática; (B) Actividad hepática de SOD. Las figuras insertas (A-B) corresponden a los efectos netos calculados como se describe en la metodología. Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar; n=7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni, se presentan las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; test T de Student para comparar entre DAG+HT+EPA y DC; Test One-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni para comparar entre efectos netos. Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales, y los números las diferencias entre efectos netos, con  $p < 0,05$ : (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA; (1) (DC+HT)-DC, (2) (DC+EPA)-DC, (3) (DC+HT+EPA)-DC, (4) (DAG+HT)-DAG, (5) (DAG+EPA)-DAG, (6) (DAG+HT+EPA).

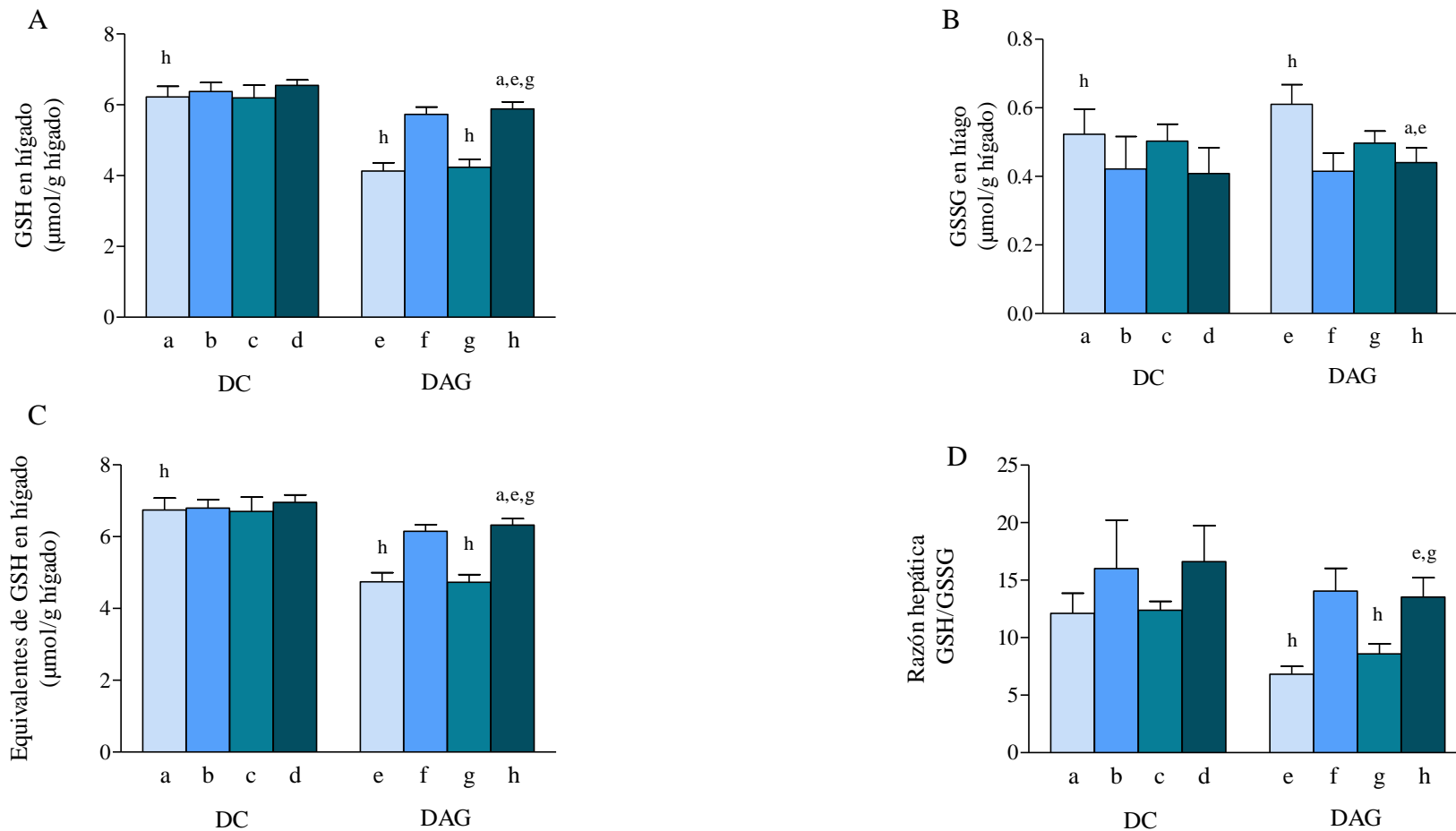


Figura 4: Niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), glutatión total (equivalentes de GSH), y razón GSH/GSSG. (A) GSH hepático; (B) GSSG hepático; (C) Equivalentes de GSH; (D) Razón GSH/GSSG. Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar; n=7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni, se presentan las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; test T de Student para comparar entre DAG+HT+EPA y DC. Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales con  $p < 0,05$ : (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA.

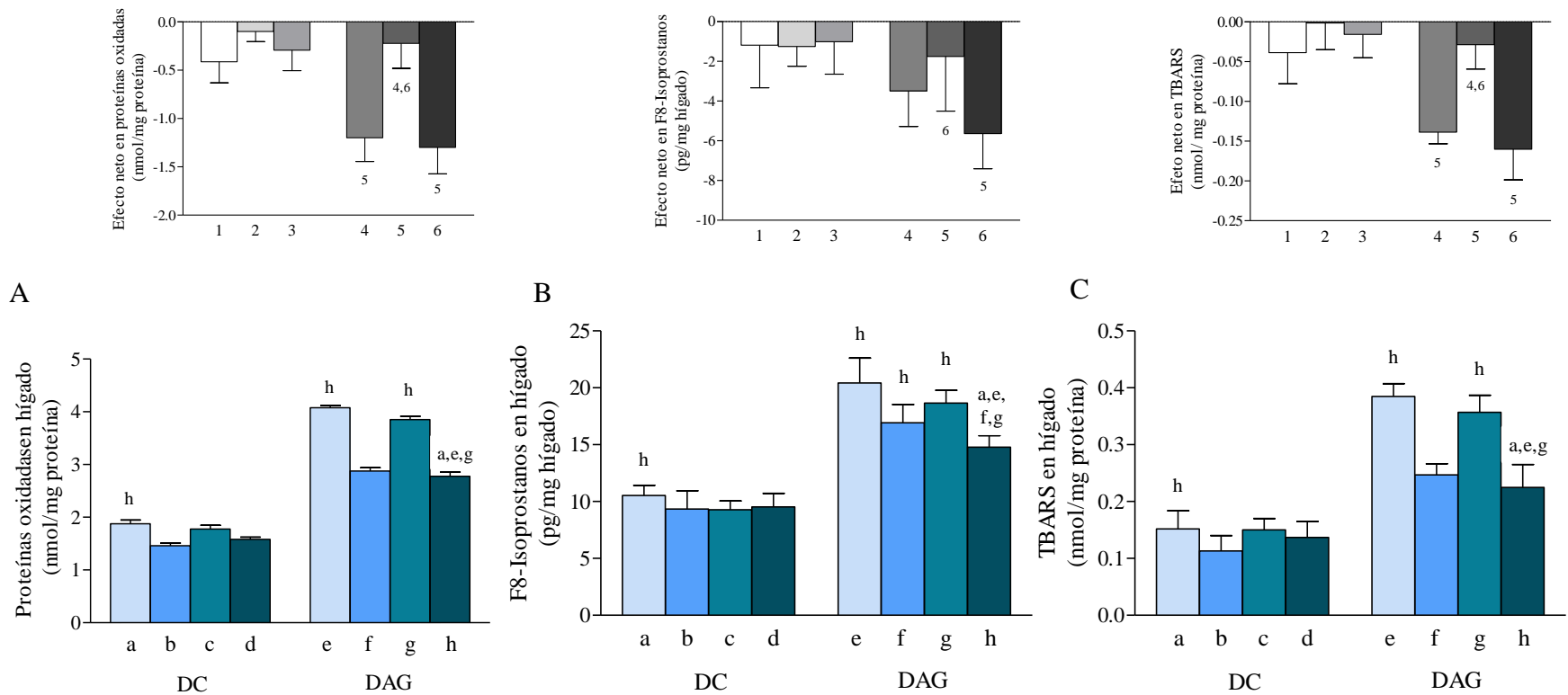


Figura 5: Niveles hepáticos de proteínas oxidadas, F-8 Isoprostanos y TBARS. (A) Proteínas oxidadas; (B) F-8 Isoprostanos; (C) TBARS. Las figuras insertas (A-C) corresponden a los efectos netos calculados como se describe en la metodología. Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar;  $n=7-8$  por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni, se presentan las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; test T de Student para comparar entre DAG+HT+EPA y DC; Test One-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni para comparar entre efectos netos. Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales, y los números las diferencias entre efectos netos, con  $p<0,05$ : (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA; (1) (DC+HT)-DC, (2) (DC+EPA)-DC, (3) (DC+HT+EPA)-DC, (4) (DAG+HT)-DAG, (5) (DAG+EPA)-DAG, (6) (DAG+HT+EPA).

### **7.5 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de respuesta inflamatoria:**

En relación a los niveles séricos de IL-6 (Figura 6A) y de TNF- $\alpha$  (Figura 6C), se observa que el grupo DAG+HT+EPA, disminuyó ambos niveles ( $p<0,05$ ) en relación a DAG sin suplementación en un 36,5% y un 75,4%, respectivamente, mas no alcanzó a normalizar los valores comparando con DC. En el caso de TNF- $\alpha$ , el efecto neto de la suplementación conjunta fue mayor ( $p<0,05$ ) que la suplementación única, no encontrándose diferencias significativas en el efecto neto de la suplementación sobre los niveles séricos de IL-6 (Anexo 9B). En cuanto a IL1 $\beta$  (Figura 6B), el grupo DAG+HT+EPA tuvo niveles menores (15,2% menos,  $p<0,05$ ) que el grupo DAG sin suplementación y que DAG+EPA, sin embargo, no normalizó los valores. No se observan diferencias significativas en el efecto neto de las suplementaciones (Anexo 9C).

### **7.6 Efecto de la suplementación dietaria con HT y EPA sobre el perfil hepático de de AG:**

En la Tabla 4 se presenta el perfil hepático de AG por grupo. No se observan diferencias significativas en el %EMAG de AGS entre grupos, sin embargo, el grupo DAG+HT+EPA presentó valores menores ( $p<0,05$ ) de ácido palmítico (C16:0) que el DC. En el caso de los AG monoinsaturados (AGMI), el grupo con DAG+HT+EPA presentó un menor %EMAG de AGMI que DC ( $p<0,05$ ), con niveles significativamente menores de ácido oleico (AO, C18:1 n9). En el caso de los AGPI, DAG+HT+EPA presentó un mayor %EMAG ( $p<0,05$ ) en relación a DC, con diferencias significativas entre DAG+HT y DAG+EPA, siendo mayor la cantidad de AGPI en el grupo suplementado con EPA. El %EMAG de AA fue mayor ( $p<0,05$ ) en el grupo DAG sin suplementación comparado con los grupos DAG con suplementación. Al contrario de la cantidad hepática de EPA, la cual fue mayor ( $p<0,05$ ) en DAG+HT+EPA y en DAG+EPA comparado con DAG sin suplementación. A su vez, DAG+HT+EPA presentó niveles significativamente mayores que DC. Esto es concordante al %EMAG de DHA, el cual fue significativamente mayor en DAG+HT+EPA y DAG+EPA que DAG sin suplementación y DAG+HT, siendo además mayor ( $p<0,05$ ) que DC. Al analizar la relación n-6/n-3, fue significativamente menor en DAG+HT+EPA con respecto a DC, DAG y DAG+HT, lo que se traduce en la razón n-6/n-3 de AGPICL (AGPICL= AA/EPA+DPA+DHA), manteniendo dichas diferencias.

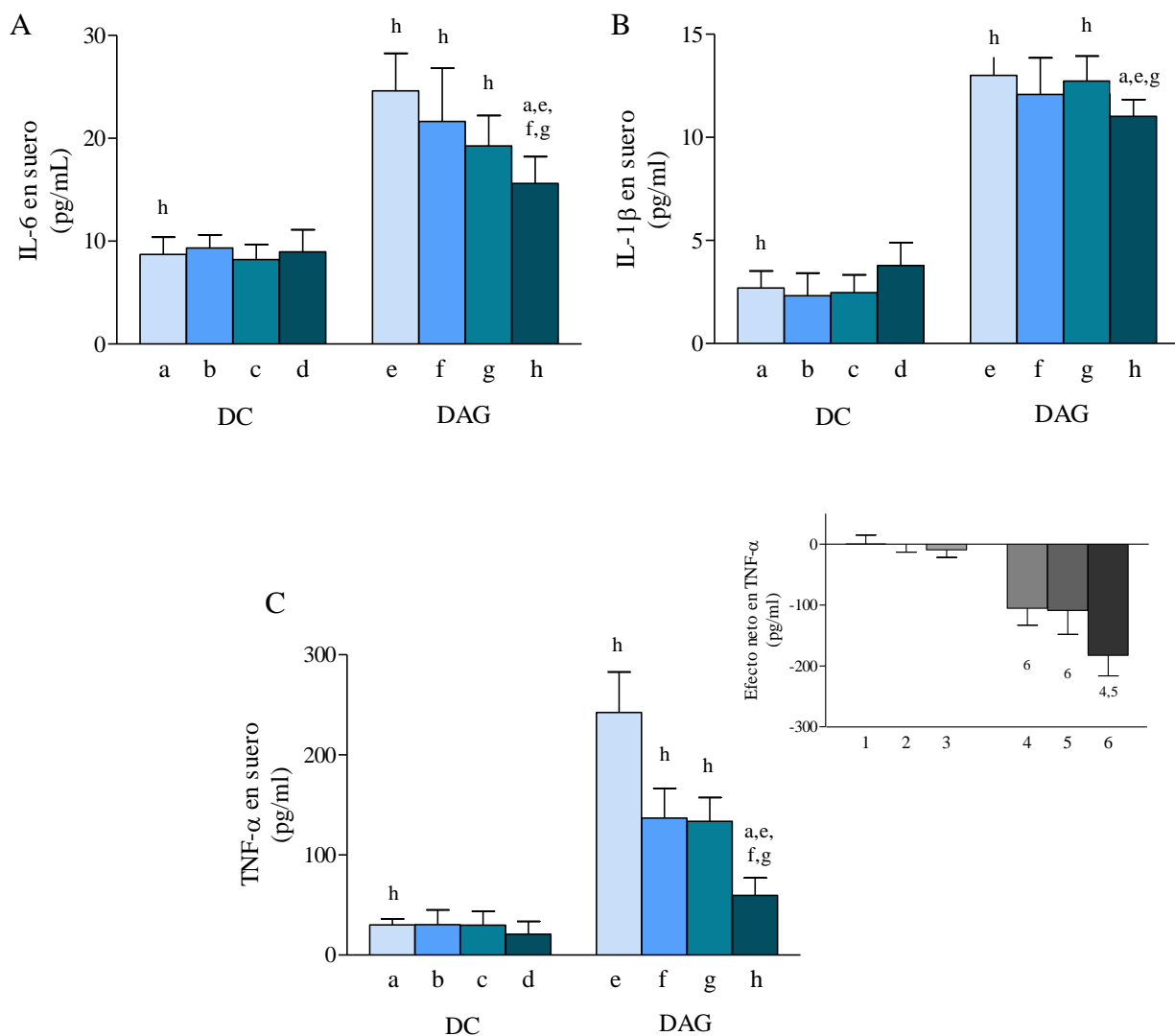


Figura 6: Niveles séricos de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . (A) IL-6; (B) IL-1 $\beta$ ; (C) TNF- $\alpha$ . La figura inserta (C) corresponde a los efectos netos calculados como se describe en la metodología. Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar; n=7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni, se presentan las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; test T de Student para comparar entre DAG+HT+EPA y DC; Test One-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni para comparar entre efectos netos. Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales, y los números las diferencias entre efectos netos, con  $p < 0,05$ : (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA; (1) (DC+HT)-DC, (2) (DC+EPA)-DC, (3) (DC+HT+EPA)-DC, (4) (DAG+HT)-DAG, (5) (DAG+EPA)-DAG, (6) (DAG+HT+EPA).



Tabla 4: Perfil hepático de AG por grupo experimental

	DC				DAG			
	Sin (a)	HT (b)	EPA (c)	HT+EPA (d)	Sin (e)	HT (f)	EPA (g)	HT+EPA (h)
<b>16:0</b>	24,39±1,22 <sup>h</sup>	24,67±0,90	22,71±1,79	26,83± 1,26	22,66±0,97	22,68±0,43	22,56±1,07	22,54±0,91 <sup>a</sup>
<b>18:1 n9/n7</b>	39,88±3,93 <sup>h</sup>	30,82±6,88	18,76±5,08	19,67±2,46	25,40±4,04	27,55±5,19 <sup>g</sup>	20,84±3,73 <sup>f</sup>	23,47±6,54 <sup>a</sup>
<b>18:2 n-6 AL</b>	9,59±1,46 <sup>h</sup>	13,18±2,00	13,02±1,77	11,96±1,57	21,15±0,53	20,45±1,79	20,02±0,78	20,23±1,69 <sup>a</sup>
<b>18:3 n-3 AAL</b>	0,29±0,05 <sup>h</sup>	0,66±0,17	0,74±0,12	0,66±0,08	0,62±0,07 <sup>g</sup>	0,77±0,20	0,81±0,15 <sup>e</sup>	0,74±0,10 <sup>a</sup>
<b>20:4 n-6 AA</b>	6,27±1,21	5,28±0,99	4,52±0,63	4,15±0,33	9,73±2,02 <sup>f,g,h</sup>	6,68±3,05 <sup>e</sup>	5,72±1,60 <sup>e</sup>	5,50±1,57 <sup>e</sup>
<b>20:5 n-3 EPA</b>	0,35±0,20 <sup>h</sup>	2,06±0,79	8,87±2,80	7,56±1,09	0,36±0,07 <sup>g,h</sup>	1,76±2,37 <sup>g</sup>	5,18±3,05 <sup>e,f</sup>	3,45±1,62 <sup>a,e</sup>
<b>22:6 n-3 DHA</b>	4,73±1,31 <sup>h</sup>	9,16±3,69	16,57±3,02	13,29±1,84	6,76±1,09 <sup>g,h</sup>	6,77±3,04 <sup>g,h</sup>	11,05±3,16 <sup>e,f</sup>	11,17±4,14 <sup>a,e,f</sup>
<b>Total AGS</b>	30,86±1,24	31,11±2,07	30,75±2,09	35,78±1,45	31,08±1,66	30,65±1,61	31,22±2,37	30,84±0,46
<b>Total AGMI</b>	45,70±4,59 <sup>h</sup>	36,27±7,66	22,14±6,32	23,10±3,48	27,42±4,52	29,42±6,46	22,50±4,15	25,34±7,29 <sup>a</sup>
<b>Total AGPI</b>	23,15±4,16 <sup>h</sup>	32,49±6,03	47,11±7,15	41,12±3,25	40,97±3,08	39,06±5,18 <sup>g</sup>	46,10±4,93 <sup>f</sup>	44,04±6,70 <sup>a</sup>
<b>Total AGPI n6</b>	17,53±2,84 <sup>h</sup>	19,55±1,91	18,14±1,77	16,54±1,59	32,72±2,22 <sup>f,g,h</sup>	28,68±2,96 <sup>e</sup>	26,95±1,73 <sup>e</sup>	27,77±0,50 <sup>a,e</sup>
<b>Total AGPI n3</b>	5,62± 1,51 <sup>h</sup>	12,94±4,49	28,97±6,08	24,58±2,84	8,26±0,98 <sup>g,h</sup>	10,38±6,25 <sup>g,h</sup>	19,16±6,63 <sup>e,f</sup>	17,10±5,25 <sup>a,e,f</sup>
<b>n-6/n-3 totales</b>	3,20±0,49 <sup>h</sup>	1,62±0,38	0,66±0,12	0,68±0,11	3,99±0,29 <sup>g,h</sup>	3,59±1,63 <sup>g,h</sup>	1,66±0,88 <sup>e,f</sup>	1,52±0,25 <sup>a,e,f</sup>
<b>AA / EPA + DPA + DHA</b>	1,20±0,18 <sup>h</sup>	0,47±0,16	0,17±0,03	0,17±0,01	1,27±0,17 <sup>f,g,h</sup>	0,91±0,54 <sup>e,g,h</sup>	0,40±0,28 <sup>e,f</sup>	0,38±0,24 <sup>a,e,f</sup>

Los valores se presentan como media ± desviación estándar de % de ésteres metílicos de ácidos grasos (% EMAG); n =7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni y test T de Student para comparar entre DAG+HT+EPA y DC. Las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales con p<0,05: (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA. Se presentan las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG. Ácidos grasos saturados (AGS) corresponden al total de: 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0; ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) corresponden al total de: 14:1, 16:1, 18:1 n9/n7, 20:1, 22:1, 24:1; ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) corresponden al total de: 18:2 n-6 (ácido Linoleico; AL), 18:3 n-6, 18:3 n-3 (ácido α-linolénico; AAL), 20:2 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6 (ácido araquidónico; AA), 20:3 n-3, 20:5 n-3 (ácido eicosapentaenoico; EPA), 22:2 n-6, 22:4 n-6, 22:5 n-3 (ácido docosapentaenoico; DPA), 22:6 n-3 (ácido docosahexaenoico).

## **8. Discusión**

Este estudio se realizó en modelo animal, ratón macho de la cepa DC57BL/6J, y utilizó una DAG con 60% de grasa para inducir la EHGNA, siendo la enfermedad inducida por esta dieta una de las que más se parece a la patología en humanos, ya que se asocia a obesidad y tiene un patrón histológico similar a la esteatosis hepática en humanos (64).

Al finalizar el tratamiento de 12 semanas, la DAG produjo: un aumento del peso corporal con un concordante mayor peso del tejido adiposo, una mayor ingesta de grasas, esteatosis hepática, acumulación de TAG y AGL en el hígado, mayor estrés oxidativo tanto en plasma como en hígado, un estado proinflamatorio, y una razón aumentada de AG n-6/n-3.

### **8.1 Efecto de la suplementación con HT y EPA en peso corporal, peso del hígado y peso del tejido adiposo:**

Los ratones alimentados con DAG sin suplementación tienen un peso corporal mayor que aquellos alimentados con DC, y que aquellos tratados con EPA, ya sea como suplementación única o conjunta con HT. Sin embargo, el grupo DAG+HT+EPA normalizó los valores a niveles del grupo DC, teniendo además un peso de tejido adiposo significativamente menor en relación a DAG. Natakani y cols. 2003, realizaron un estudio en ratones C57BL/6J alimentados con DAG, los cuales fueron suplementados con diferentes dosis de aceite de pescado (7% EPA y 24% DHA) y de aceite de cártamo (46% AO y 45% AL), a mayor dosis de aceite de pescado administrada, menor dosis de aceite de cártamo, y viceversa. Se observó una relación lineal inversa entre dosis de aceite de pescado y peso corporal. Además, encontraron que a mayor dosis de aceite de pescado, aumentó la activación de genes diana de PPAR $\alpha$ : ACOX y acil Coa deshidrogenasa de cadena media, y disminuyó la expresión del factor de transcripción SREBP-1c. Esto sugiere que la suplementación con AGPICL n-3 (EPA y DHA) activaría PPAR $\alpha$  promoviendo la  $\beta$ -oxidación y disminuiría la expresión de SREBP-1c, disminuyendo la activación de genes prolipogénicos, lo que se traduce en la reducción del peso corporal (efecto anti-obesidad), además de una menor acumulación hepática de TAG (65). En este estudio, el peso del hígado fue significativamente mayor en el grupo DC versus DAG, lo que se refleja en sus respectivas razones con tejido adiposo y peso corporal, siendo ambas razones mayores en el grupo DC en comparación a los grupos DAG y DAG+HT+EPA. Este hallazgo difiere de

otros estudios en que ratones alimentados con DAG, tienen un peso del hígado mayor en los ratones alimentados con DAG versus su grupo control o versus los ratones alimentados con DAG pero suplementados con AGPICL n-3 (27,66). Sin embargo, es concordante con el estudio de Valenzuela y cols. 2015, donde la razón peso hígado/peso corporal final, fue mayor en DC que en DAG (67).

### **8.2 Efecto de la suplementación con HT y EPA en la ingesta dietaria:**

En cuanto a la ingesta dietaria, se observó que el grupo alimentado con DC tuvo una mayor ingesta dietaria (g/d) y por consiguiente, una mayor ingesta energética en relación al grupo con DAG y DAG+HT+EPA. Al ser ambas dietas isocalóricas, una mayor ingesta en gramos se traduce en una ingesta energética mayor. Como era de esperarse, los grupos alimentados con DAG tuvieron una mayor ingesta de grasas en relación a los DC, independiente de la suplementación, y ocurrió lo inverso con la ingesta de hidratos de carbono, debido a la composición de las dietas. La menor ingesta por parte de los grupos alimentados con DAG podría deberse al estado proinflamatorio observado en este estudio en los ratones con dicho tratamiento, ya que las citoquinas proinflamatorias tienen un efecto anorexígeno, disminuyendo el apetito y en consecuencia, el peso corporal (68,69). A pesar de que la ingesta cae a partir de la semana 7 en el grupo DAG, el aumento de peso continúa de manera progresiva hasta el final de la intervención. Meijer y cols. 2010, realizaron un estudio en ratones macho C57BL/6J para evaluar si el inicio de la esteatosis hepática se relaciona con el contenido de grasa de la dieta más que con la ingesta calórica. Los animales recibieron una DAG con 60% de las kcal provenientes de grasa o una dieta baja en grasa (10% de las kcal provenientes de la grasa) durante 9 semanas. Los animales que consumieron la DAG ganaron 53% más peso que aquellos con la dieta baja en grasa, a pesar de que la ingesta energética fue la misma, debido a una mayor eficiencia energética por parte del grupo DAG. Es decir, aquellos animales alimentados con la DAG ganaron más peso por caloría consumida en comparación al grupo control (70). Por otro lado, en el estudio de Hu y cols. 2004, se reportó que ratones C57BL/6J alimentados con DAG tuvieron una disminución del gasto energético, por lo que el aumento de peso no se debe solamente a la ingesta energética (71).

### **8.3 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de esteatosis y daño hepático:**

En este estudio, la alimentación con DAG indujo esteatosis hepática en los ratones, aumentando el contenido hepático de grasa total, de TAG hepáticos y de AGL.

Se ha propuesto el estrés de retículo endoplasmático (RE) como uno de los mecanismos relacionados con la esteatosis hepática (45,72), por lo que estaría ligado tanto a la patogenia como a la progresión de la EHGNA. El RE es un organelo presente en las células eucariontes, cuya función principal es la síntesis, plegamiento, modificación y transporte de proteínas, además de mantener la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{+2}$  (73). El estrés de RE se activa para regular la síntesis proteica cuando hay una disrupción en la homeostasis celular debido a una acumulación de proteínas mal plegadas, disrupción de la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$ , cambios de pH, y/o al aumento de estrés oxidativo y nitrosativo (73,74). El estrés de RE estimula la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR; *unfolded protein response*, en inglés), que tiene por objetivo mantener la homeostasis del RE a través de promover el replegamiento de proteínas y la detención del transporte de proteínas. Cuando el estrés de RE es crónico, se activan vías metabólicas que pueden llevar a la IR, inflamación, acumulación hepática de lípidos, y a la apoptosis celular, lo que se relaciona con diversas enfermedades, entre ellas la EHGNA (74,75). La UPR está relacionado con el metabolismo de lípidos. Bajo condiciones de estrés de RE crónicas, como es el caso de la EHGNA, se activan vías que activan la síntesis de fosfolípidos, síntesis de TAG, y que favorecen la lipogénesis. Dentro de estas vías, se encuentra la supresión de PPAR $\alpha$  y el aumento de SREBP-1c, lo que se traduce en una oxidación de AG deficiente y una acumulación hepática de lípidos (72), favoreciendo la EHNA.

Por otro lado, se ha visto que la DAG aumenta los niveles hepáticos de anandamida (endocanabinoide), la densidad hepática del receptor CB1, y la tasa de síntesis de AG, en ratones. Por lo tanto, la activación del receptor endocanabinoide CB1 en hígado podría tener un rol en el desarrollo de EHNA. Con la activación de CB1 por endocanabinoides en los hepatocitos, aumentaría la expresión del factor prolipogénico SREBP-1c y de sus enzimas diana, la sintasa de AG y acetil coenzima A carboxilasa-1, favoreciendo la síntesis *de novo* de AG e inhibiendo la  $\beta$ -oxidación, lo que provocaría una acumulación hepática de lípidos (esteatosis) (76,77).

No obstante, en esta tesis, se observó que la suplementación conjunta con HT y EPA redujo de manera efectiva la acumulación de grasas en hígado en los ratones alimentados con DAG. Valenzuela y cols. 2016 evaluaron el efecto del aceite de pescado y AOEV en el hígado de ratones macho C57BL/6J alimentados con DAG. La DAG provocó: esteatosis hepática (con aumento de grasa total, aumento de TAG y aumento de AGL en hígado), entre otras alteraciones (inflamación, estrés oxidativo). Estos cambios fueron disminuidos o normalizados al suplementar con aceite de pescado y AOEV. Por lo que la suplementación conjunta tuvo efectos antiestatóticos y disminuyó la acumulación de grasa total, TAG y AGL en hígado (14).

El efecto antiestatótico de la suplementación podría estar mediado por la activación del factor de transcripción PPAR $\alpha$  y la disminución de la actividad del factor SREBP-1c (6,14,65,67). EPA es un potente ligando de PPAR $\alpha$ , el cual regula genes involucrados en la oxidación de AG y vías lipolíticas, favoreciendo estas rutas metabólicas(67,78). Ip y cols 2003, estudiaron el rol de PPAR $\alpha$  en el metabolismo hepático de AG en esteatohepatitis inducida por una DAG deficiente en colina y metionina en ratones, y encontraron que los animales tratados con un agonista potente de PPAR $\alpha$  tuvieron un aumento del recambio hepático de lípidos, lo que elimina los AG como sustrato de la lipoperoxidación, previniendo el desarrollo de esteatohepatitis (79). A su vez, los AGPICL han mostrado ser reguladores negativos de la lipogénesis a través de la supresión del factor SREBP-1c, el cual regula positivamente genes prolipogénicos en hígado (46,48,65,80).

Sofi y cols 2010, realizaron un estudio clínico controlado randomizado en 11 pacientes con EHGNA, donde se les administró a 6 pacientes un aceite de oliva enriquecido en AGPI n-3 (6,5 ml de aceite con 0.83g de AGPICL n-3 al día) y los otros 5 consumieron aceite de oliva común durante un año. Encontraron que los pacientes que consumieron el aceite de oliva enriquecido disminuyeron los niveles de transaminasas y TAG en plasma, disminuyeron la esteatosis hepática y mejoraron los niveles de adiponectina (81), por lo que podría haber un efecto sinérgico entre los AGPICL n-3 y el aceite de oliva en reducir la esteatosis hepática y otros parámetros alterados de la EHGNA.

Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias significativas en los niveles de transaminasas entre grupos experimentales. Se ha visto que los niveles séricos de

transaminasas son poco sensibles diagnosticando EHNA para la mayoría de los individuos, y que los cambios en sus niveles no se relacionan necesariamente de manera directa con los cambios en la progresión de la esteatosis o fibrosis en hígado (5,67).

#### **8.4 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de estrés oxidativo:**

Los ratones alimentados con DAG presentaron un aumento del estrés oxidativo, con mayores niveles hepáticos de GSSG, proteínas oxidadas, TBARS y F8-Isoprostanos, y con una menor capacidad antioxidante y actividad de SOD. Se ha visto que los pacientes obesos con EHGNA tienen un menor potencial antioxidante, mayor actividad de radicales libres, mayor formación de  $O_2$  y lipoperoxidación aumentada, con una disminución de la capacidad antioxidante plasmática (14).

Los ratones alimentados con DAG y suplementados con HT+EPA presentaron menores niveles de estrés oxidativo y una mayor capacidad antioxidante. Este efecto parece estar dado principalmente por el HT (10), ya que el efecto neto de la suplementación conjunta versus el de la suplementación solo con HT no presentó diferencias significativas sobre los parámetros de estrés oxidativo en hígado. Covas y cols. 2006 realizaron un estudio clínico controlado randomizado en humanos con 200 voluntarios hombres adultos aparentemente sanos. Se les indicó el consumo de aceite de oliva en dosis diaria de 25 ml con contenido alto, medio o bajo de polifenoles, en diferentes secuencias durante 3 semanas con 2 semanas de descanso entre cada intervención. Concluyeron que el aceite de oliva mejoró perfil lipídico y mejoró la razón GSH/GSSG, siendo mayor el efecto en el aceite alto en contenido de polifenoles (82).

Los niveles de F8-isoprostanos reflejan la lipoperoxidación no enzimática de AA, EPA o DHA como consecuencia del estrés oxidativo. La suplementación con EPA/DHA se ha asociado con una inducción de la respuesta celular antioxidante (7). Por otro lado, algunos autores indican que los AGPICL n-3 aumentan los niveles de TBARS, indicadores de peroxidación lipídica, debido a las insaturaciones presentes en su estructura (83,84). Por lo tanto, la acción antioxidante de los AGPICL n-3 es controversial. En los parámetros de capacidad antioxidante y actividad de SOD, la suplementación conjunta presentó mayores niveles que las suplementaciones únicas, teniendo un mayor efecto HT+EPA que HT o

EPA por sí solos, por lo que EPA por sí solo podría presentar una mayor lipoperoxidación, efecto que se ve contrarrestado al administrar en conjunto con HT. El estrés de RE provoca el aumento de proteínas sin plegar o mal plegadas, lo que podría traer como consecuencia proteínas disfuncionales (45). La SOD es una enzima y por lo tanto, una proteína, por lo que la disminución de la actividad de SOD podría deberse a un mal plegamiento de proteínas dado por el estrés de RE. En el caso de la capacidad antioxidante, con la suplementación conjunta se normaliza a valores de DC. El aumento en el sistema de defensa antioxidante por parte del HT podría estar dado por un aumento en la expresión y actividad de la catalasa, además de los niveles del factor de transcripción *forkhead 3a* (FOXO3a) y la fosforilación de AMPK que transloca FOXO3a al núcleo, siendo dicho factor importante ya que promueve la transcripción de genes involucrados en la respuesta antioxidante, como los genes de las enzimas SOD y catalasa (55), por lo que HT podría actuar no solo como un antioxidante en sí mismo, sino además inducir una mayor respuesta antioxidante. Por otro lado, el estrés oxidativo activa la respuesta UPR, y a su vez, el estrés de RE está relacionado con un aumento del estrés oxidativo, ya que aumenta la generación de EROs (45,73). Sin embargo, la vías de transducción de señales de la UPR pueden activar la respuesta antioxidante para limitar la acumulación de EROs vía fosforilación del factor de transcripción factor nuclear eritroide 2 (Nrf2; *nuclear erythroid 2-related factor 2*, en inglés) (74). Lee y cols. 2015 estudiaron si la inducción de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) contribuye al efecto citoprotector de EPA, el cual es ligando de Nrf2, en células epiteliales humanas sometidas a estrés oxidativo. La HO-1 es un mecanismo de defensa inducible con un importante rol en mantener la homeostasis y en permitir adaptación frente al estrés. Los autores encontraron que el tratamiento con EPA aumentó la translocación del factor Nrf2 aumentando también la respuesta antioxidante, llevando a una regulación positiva de la expresión de la HO-1. Además, el tratamiento con EPA redujo la apoptosis celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de dicho mecanismo (85). Por lo tanto, uno de los mecanismos por los cuales EPA contribuyó a reducir el estrés oxidativo en esta tesis, podría estar mediado por la inducción de HO-1 mediada por la activación del factor Nrf2.

### **8.5 Efecto de la suplementación con HT y EPA sobre parámetros de respuesta inflamatoria:**

La DAG indujo una respuesta proinflamatoria, aumentando los niveles séricos de IL-6, TNF- $\alpha$ , y de IL1 $\beta$  (citoquinas proinflamatorias). La obesidad inducida por DAG con el consiguiente aumento del tejido adiposo, provocan un estado proinflamatorio vía disminución de la activación de PPAR $\alpha$  y aumento del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), lo cual provoca esteatohepatitis, y un aumento en la expresión del mRNA de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Además, la DAG provoca una depleción de los niveles de AGPICL n-3 aumentando la razón n-6/n-3, y con ello contribuyendo aún más al estado proinflamatorio (27). Por otro lado, el estrés de RE también estaría ligado con el estado proinflamatorio en la EHGNA. Esto podría ser a través de distintos mecanismos: 1) el aumento de EROs; 2) la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias y 3) la inducción de la respuesta de fase aguda (69). En este estudio, la suplementación conjunta disminuyó significativamente los parámetros séricos de IL-6, TNF- $\alpha$ , y de IL1 $\beta$ , sin diferencia con DAG+EPA para IL1 $\beta$ ; siendo mayor el efecto neto de HT+EPA en relación a las otra suplementaciones en el caso del TNF- $\alpha$ . Los AGPICL n-3 tienen un efecto antiinflamatorio ya que suprimen el efecto de la biosíntesis de eicosanoides derivados del AA: 1) una alta ingesta de AGPICL n-3 resulta en la incorporación de éstos en los fosfolípidos de membrana, reemplazando parcialmente al AA. Al disminuir la disponibilidad de AA, esto suprime la biosíntesis de los eicosanoides derivados del AA en favor de aquellos derivados del EPA: prostanoïdes de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5, los cuales tienen un efecto mucho menos potente que aquellos derivados del AA. 2) los AGPI n-3 compiten con los n-6 por las desaturasas y elongasas, teniendo una mayor afinidad por las enzimas aquellos de la serie n-3. Por lo tanto, una mayor ingesta de AGPI n-3 disminuye la desaturación y elongación del AL en AA, y con ello la producción de eicosanoides derivados de AA con potente efecto proinflamatorio 3) los AGPICL n-3 suprimen la acción de la COX-2 y compiten con los n-6 por la COX para formar eicosanoides. En comparación al AA, EPA es el sustrato preferido de la lipooxigenasa, por lo tanto, una mayor ingesta de EPA lleva a una mayor formación de productos derivados del EPA en comparación a los derivados del AA por acción de la lipooxigenasa (86,87).



Por otro lado, las resolvinas de la serie E, productos del metabolismo del EPA, actúan como agentes endógenos con efecto antiinflamatorio; asisten en la resolución de eventos proinflamatorios, y suprimen la producción de IL-1, IL-2, IL-6 y TNF $\alpha$  por parte de las células T (87). Además, EPA es un potente ligando de PPAR $\alpha$ , el cual tiene un efecto antagonizante sobre la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B y la proteína activante 1 (AP-1), importantes gatillantes de la inflamación, por lo que al aumentar la disponibilidad de EPA, aumentaría la activación de PPAR $\alpha$  y disminuiría la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1, disminuyendo la inflamación (14). Por otro lado, EPA también activa al factor Nrf2, lo que disminuye el estrés oxidativo y contribuye a disminuir el estado proinflamatorio exacerbado por el estrés oxidativo (74).

Pirozzi y cols. 2015 evaluaron el efecto del HT en la inflamación en un modelo de rata con EHGNA inducida por DAG. Administraron a ratas una DAG con 58% de las calorías totales provenientes de grasa durante 6 semanas y suplementaron con HT. Las ratas alimentadas con DAG+HT presentaron una expresión significativamente menor del mRNA de COX-2, IL-6 y TNF- $\alpha$ , además de una expresión significativamente mayor de PPAR $\alpha$  en relación al grupo alimentado con DAG sin suplementación. Por lo tanto, la suplementación con HT también aumentaría la expresión de PPAR $\alpha$ , lo que podría modular desórdenes metabólicos asociados a inflamación. Además, su efecto antiinflamatorio podría estar dado por la reducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y de la COX-2, además de tener efectos antioxidantes, lo que también contribuiría a disminuir el estado inflamatorio exacerbado por el estrés oxidativo, como por ejemplo, la lipoperoxidación asociada a un aumento del TNF- $\alpha$  (59).

#### **8.6 Efecto de la suplementación dietaria con HT y EPA sobre el perfil hepático de AG:**

En este estudio se encontró que en el grupo DAG+HT+EPA el contenido hepático de EPA era significativamente mayor y el contenido de AA era significativamente menor en comparación al grupo DAG sin suplementación. Además, la suplementación con HT+EPA mejoró la razón AGP/ICL n-6/n-3, disminuyéndola, efecto que parece estar dado principalmente por el EPA, ya que tanto el grupo HT+EPA como el grupo EPA lograron este efecto. Este hallazgo es concordante con el estudio de Tanaka y cols. 2008, en que se evaluó la eficacia y seguridad de EPA altamente purificado (2700 mg/día) durante 12

meses en 23 pacientes con EHNA mediante parámetros bioquímicos e histológicos. Se observó que aumentó el contenido de EPA en suero y disminuyó la razón n-6/n-3, ya que se redujeron las concentraciones de AA. Por otro lado, los pacientes tuvieron buena tolerancia al tratamiento, además mejoraron los niveles de ALT, AGL en plasma, y niveles de estrés oxidativo en hígado. En conclusión, el tratamiento con EPA mostró ser seguro y eficaz en el tratamiento de la EHNA, debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, además de mejorar la razón n-6/n-3(88).

En el Anexo 11 se presenta un esquema que resume los diferentes mecanismos a través de los cuales la suplementación con HT+EPA previene el desarrollo y progresión de la esteatosis hepática, inflamación, y estrés oxidativo característicos de la EHGNA inducida por DAG en ratón.

### **8.7 Limitaciones y aportes del estudio**

Este estudio presenta las limitaciones y ventajas propias de un estudio en modelo animal, ya que si bien nos entrega evidencia de los mecanismos fisiopatológicos de la EHNGA y del efecto protector que podría tener la suplementación con HT+EPA, se requieren estudios clínicos controlados randomizados en seres humanos que permitan evaluar el efecto clínico y las dosis requeridas (89). No obstante, la utilización de modelo animal, permite estudiar directamente el hígado, lo que es más difícil de realizar en seres humanos, considerando el riesgo de realizar biopsia hepática. La DAG utilizada es una dieta estandarizada que permite la inducción de la esteatosis hepática en ratones (64), sin embargo, no necesariamente representa la dieta occidental actual de los seres humanos; poniéndose el énfasis en la ingesta de grasas, dejando de lado el alto consumo de glucosa, fructosa y de alimentos altamente procesados.

Esta tesis estudió el efecto de EPA aislado de DHA, lo que es un aporte ya que generalmente se evalúan ambos AG en conjunto. Además, se evalúa en administración con HT, lo que permite disminuir la dosis empleada y con ello, disminuir el riesgo de lipoperoxidación. Considerando que la EHGNA es una enfermedad de alta y creciente prevalencia a nivel mundial y en particular en Chile, es que se necesitan nuevos enfoques terapéuticos, siendo la suplementación con HT+EPA un nuevo enfoque para su prevención y tratamiento.

## 9. Conclusiones

En ratones macho C57BL/6J la alimentación con DAG generó:

- ✓ Esteatosis hepática (infiltración de las vesículas lipídicas superior al 60%) sin focos de inflamación o necrosis, sin alteración de los niveles séricos de transaminasas
- ✓ Aumento del estrés oxidativo, disminución de la capacidad antioxidante plasmática, la actividad de SOD y la razón GSH/GSSG, y aumento de los niveles hepáticos de F8-isoprostanos, TBARS, y proteínas oxidadas
- ✓ Un estado proinflamatorio, aumentando los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL6 y TNF- $\alpha$
- ✓ Alteración del perfil hepático de AG, aumentando el % de EMAG de AA y disminuyendo el de EPA, aumentando la razón n-6/n-3

La suplementación con HT+EPA en ratones C57BL/6J alimentados con DAG tuvo un efecto sobre las distintas alteraciones provocadas por la DAG, disminuyendo la acumulación hepática de lípidos, el estrés oxidativo, la inflamación, y disminuyendo la razón n-6/n-3:

- ✓ Se observó que probablemente EPA tenga un efecto más potente sobre los parámetros de inflamación e HT sobre los parámetros de estrés oxidativo. Sin embargo, la suplementación conjunta fue más efectiva en la mayoría de las variables evaluadas
- ✓ El efecto de la suplementación conjunta fue mayor que de las suplementaciones únicas para la mayoría de los parámetros. Por lo tanto, probablemente haya un efecto sinérgico de HT y EPA para el tratamiento y prevención de la EHGNA
- ✓ En este estudio, la suplementación conjunta de HT+EPA fue efectiva en prevenir las alteraciones de la EHGNA inducida por DAG en ratones C57BL/6J

## 10. Referencias

1. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010;5(1):145–71.
2. Anderson N. Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008;60(3):311–57.
3. Rahman R, Hammoud GM, Almashhrawi AA, Ahmed KT, Ibdah JA. Primary hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: An update. *World J Gastrointest Oncol* 2013;5(9):186–94.
4. Siegel AB, Zhu AX. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. *Cancer* 2009;115(24):5651–61.
5. Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: An emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1281(1):106–22.
6. Eslamparast T, Eghtesad S, Poustchi H, Hekmatdoost A. Recent advances in dietary supplementation, in treating non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2014;7(2):204.
7. Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver*; 2009;50(1):204–10.
8. López-Velázquez JA, Silva-Vidal KV, Ponciano-Rodríguez G, Chávez-Tapia NC, Arrese M, Uribe M, et al. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Annals of Hepatology* 2014;34:247-253
9. Nseir W, Hellou E, Assy N. Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20(28):9338–44.
10. Hernandez-Rodas M, Valenzuela R, Videla L. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2015;16(10):25168–98.
11. Byrne CD. Dorothy Hodgkin Lecture 2012 Non-alcoholic fatty liver disease, insulin

resistance and ectopic fat: A new problem in diabetes management. *Diabet Med* 2012;29(9):1098–107.

12. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48(1):1–26.
13. Hellemans K, Kerckhofs K, Hannaert J-C, Martens G, Van Veldhoven P, Pipeleers D. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-retinoid X receptor agonists induce beta-cell protection against palmitate toxicity. *FEBS J* 2007;274(23):6094–105.
14. 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(11):644.
15. Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 Fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic Fatty liver disease. *Annu Rev Nutr* 2013;33:231–48.
16. McGarry JD. Banting Lecture 2001:Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002;51:7–18.
17. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis* 2004;8(3):639–71.
18. Guilherme A, Virbasius JV, Vishwajeet P, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol* 2008;9(5):367–77.
19. Blaak EE, Wagenmakers AJM, Glatz JANFC, Wolffenbuttel BHR, Kemerink GJ, Langenberg CJM, et al. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:146–54.
20. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 2007;583(1):9–24.

21. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits". *Gastroenterology* 1998;114(4):842–5.
22. Baran B, Akyüz F. Non-alcoholic fatty liver disease: What has changed in the treatment since the beginning? *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14219–29.
23. Le T-A, Loomba R. Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis. *J Clin Exp Hepatol* 2012;2(2):156–73.
24. Fao. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. In: Estudio FAO alimentación y nutrición. 2008:1–204.
25. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution. *Chem Rev.* 2011;111(10):5922–43.
26. Clarke SD. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(1):13–8.
27. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Mañán D, et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- $\alpha$  upregulation and NF- $\kappa$ B DNA binding abrogation. *Mol Nutr Food Res* 2014;58(6):1333–41.
28. McGuinness J, Neilan TG, Sharkasi A, Bouchier-Hayes D, Redmond JM. Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action. *JThoracCardiovascSurg.* 2006;132(1097-685X):72–9.
29. Seki H, Tani Y, Arita M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;89(3-4):126–30.
30. Valenzuela B R, Tapia O G, González E M, Valenzuela B A. Ácidos Grasos Omega-3 (EPA y DHA) y su Aplicación en Diversas Situaciones Clínicas. *Rev Chil Nutr.* 2011;38(3):356–67.
31. Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 2002;87(S1):S31.

32. Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* 2009;153(S1):S200–15.
33. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids , inflammation , and inflammatory. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1505–19.
34. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. *Annu Rev Nutr* 2005;25:317–40.
35. Calder PC, Albers R, Antoine J-M, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns G, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr* 2009;101:S1–45.
36. Cottin SC, Sanders TA, Hall WL. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc* 2011;70(02):215–31.
37. Layé S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2010;82(4-6):295–303.
38. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* 2007;28(4):176–83.
39. Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growth factor-beta to prevent human essential hypertension. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(2):195–203.
40. Le HD, Meisel JA, de Meijer VE, Gura KM, Puder M. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 2009;81(2-3):165–70.
41. Araya J, Rodrigo R, Pettinelli P, Araya AV, Poniachik J, Videla LA. Decreased Liver Fatty Acid  $\Delta$  -6 and  $\Delta$  -5 Desaturase Activity in Obese Patients. *Obesity* 2010;18(7):1460–3.
42. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 2007;2007:1–10.

43. Nagahuedi S, Popesku JT, Trudeau VL, Weber J-M. Mimicking the natural doping of migrant sandpipers in sedentary quails: effects of dietary n-3 fatty acids on muscle membranes and PPAR expression. *J Exp Biol.* 2009;212(Pt 8):1106–14.
44. Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, et al. N-3 PUFA Supplementation Triggers PPAR- $\alpha$  Activation and PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Interaction: Anti-Inflammatory Implications in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One* 2011;6(12):e28502.
45. Videla LA, Pettinelli P. Misregulation of PPAR Functioning and Its Pathogenic Consequences Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Human Obesity. *PPAR Res* 2012;2012:107434.
46. Pettinelli P, Videla LA. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: An additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1424–30.
47. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, et al. Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res* 2002;43:107–14.
48. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 2002;277(3):1705–11.
49. 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.
50. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317–33.
51. Cheng Z, Schmelz EM, Liu D, Hulver MW. Targeting mitochondrial alterations to prevent type 2 diabetes-Evidence from studies of dietary redox-active compounds.



Mol Nutr Food Res 2014;58(8):1739–49.

52. Achmon Y, Fishman A. The antioxidant hydroxytyrosol: biotechnological production challenges and opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;99(3):1119–30.
53. EFSA Panel on Dietetic Products and Nutrition and Allergies (NDA). 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), mainte. *EFSA J.* 2011;9(4):2033.
54. de Bock M, Derraik JGB, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, et al. Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLoS One.* 2013;8(3).
55. Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway. *Eur J Pharmacol* 2011;660(2-3):275–82.
56. Cao K, Xu J, Zou X, Li Y, Chen C, Zheng A, et al. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic Biol Med* 2014;67:396–407.
57. Park S, Choi Y, Um SJ, Yoon SK, Park T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *J Hepatol* 2011;54(5):984–93.
58. Priore P, Siculella L, Gnoni GV. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *J Nutr Biochem* 2014;25(7):683–91.
59. 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.

60. Ricci M. Brief Scientific Literature Review. NAFLD (Non-alcoholic Fatty Liver Disease).2012:7–9.
61. 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.
62. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.
63. Rahman I, Kode A, Biswas S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 2006;1(6):3159–65.
64. Willebrords J, Veloso I, Pereira A, Maes M, Yanguas SC, Colle I, et al. Europe PMC Funders Group Strategies , models and biomarkers in experimental non- alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res* 2016;106–25.
65. Nakatani T, Kim H-J, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O. A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity. *J Lipid Res* 2003;44(2):369–79.
66. Soni NK, Nookaew I, Sandberg A-S, Gabrielsson BG. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis* 2015;14(74):1–13.
67. Valenzuela R, Espinosa A, Llanos P, Hernandez-Rodas MC, Barrera C, Vergara D, et al. Anti-steatotic effects of an n-3 LCPUFA and extra virgin olive oil mixture in the liver of mice subjected to high-fat diet. *Food Funct* 2016;7(1):140-150.
68. Finck BN, Johnson RW. Anorexia, weight loss and increased plasma interleukin-6 caused by chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1B in the rat. *Brain Res* 1997;761:333–7.

69. García MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, et al. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes* 2006;55(5):1205–13.
70. De Meijer VE, Le HD, Meisel JA, Sharif MRA, Pan A, Nosé V, et al. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism* 2010;59(8):1092–105.
71. Hu CC, Qing K, Chen Y. Diet-induced changes in stearoyl-CoA desaturase 1 expression in obesity-prone and -resistant mice. *Obes Res* 2004;12(8):1264–70.
72. Zheng Z, Zhang C, Zhang K. Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J Hepatol* 2010;2(6):203–7.
73. Begum G, Harvey L, Dixon E, Dandan S. ER stress and effects of DHA as an ER stress inhibitor. *Transl Stroke Res* 2013;4(6):635–42.
74. Zhang X-Q, Xu C-F, Yu C-H, Chen W-X, Li Y-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20(7):1768–76.
75. Yin Y, Sun G, Li E, Kiselyov K, Sun D. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing Res Rev* 2016.
76. Osei-hyiaman D, Depetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB 1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Investigation*. 2005;115(5):1298–305.
77. Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin* 2008;118(9):3160–9.
78. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35
79. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of

- PPAR $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38(1):123–32.
80. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, et al. Polyunsaturated Fatty Acids Ameliorate Hepatic Steatosis in Obese Mice by SREBP-1 Suppression. *Hepatology* 2003;38(6):1529–39.
81. Sofi F, Giangrandi I, Cesari F, Corsani I, Abbate R, Gensini GF, et al. Effects of a 1-year dietary intervention with n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched olive oil on non-alcoholic fatty liver disease patients: a preliminary study. *Int J Food Sci Nutr* 2010;61:792–802.
82. Covas M-I, Nyyssönen K, Poulsen H, Kalkkonen J, Zunft HF, Kiesewetter H, et al. Annals of Internal Medicine Article The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. *Ann Intern Med* 2006;145:333–41.
83. 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.
84. Gavino VC, Miller JS, Ikharebha SO, Milo GE, Cornwell DG. Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. *J Lipid Res* 1981;22:763–9.
85. Lee SE, Kim G-D, Yang H, Son GW, Park HR, Cho J-J, et al. Effects of Eicosapentaenoic Acid on the Cytoprotection Through Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 in Human Endothelial Cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015;66(1):108–17.
86. Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n  $\times$  3 fatty acids for the prevention of cancer : a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2004;79(6):935-45
87. Anderson BM, Ma DWL. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis* 2009;8(1):33.

88. Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K AT. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008;42(4):413–8.
89. Muhlhausler BS, Bloomfield FH, Gillman MW. Whole Animal Experiments Should Be More Like Human Randomized Controlled Trials. *PLoS Biol* 2013;11(2):1–6.
90. Kleiber M. Metabolic turnover rate: A physiological meaning of the metabolic rate per unit body weight. *J Theor Biol* 1975;53(1):199–204.
91. Banavar J, Damuth J, Marltan A, Rinaldo A. Supply-demand Balance and metabolic scaling. *PNAS* 2002;99(16):10506-9
92. Miró-Casas E, Farré Albaladejo M, Covas MI, Rodriguez JO, Menoyo Colomer E, Lamuela Raventós RM, et al. Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem* 2001;294(1):63–72.
93. Auñon-Calles D, Giordano E, Bohnenberger S, Visioli F. Hydroxytyrosol is not genotoxic in vitro. *Pharmacol Res* 2013;74:87–93.

## 11. ANEXOS

### ANEXO 1: Información nutricional de las dietas experimentales

Tabla A: Información nutricional dieta control (#D12450B)

Producto #D12450B	g%	kcal%
Proteínas	19,2	20
Carbohidratos	67,3	70
Lípidos	4,3	10
<b>Total</b>		<b>100</b>
<b>kcal/g</b>	<b>3,85</b>	
Ingrediente	g	kcal
Caseína, 30 Mesh	200	800
L-Cisteína	3	12
Almidón de maíz	315	1260
Maltodextrina	35	140
Sacarosa	350 (175 fructosa*)	1400
Celulosa, BW200	50	0
Aceite de soya	25	225
Manteca de cerdo**	20	180
Mezcla de minerales S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de calcio	5,5	0
Citrato de potasio, 1 H <sub>2</sub> O	16,5	0
Mezcla de vitaminas V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Tartrazina (FD&C yellow dye #5)	0,05	0
<b>Total</b>	<b>1055,05</b>	<b>4057</b>

\* El aporte de fructosa fue calculado como el 50% de la sacarosa aportada

\*\* Análisis de colesterol en manteca de cerdo = 0,72mg/g

Colesterol (mg)/4057 kcal = 216,4

Colesterol (mg)/kg = 279,6

Tabla B: Información nutricional dieta alta en grasa (#D12492)

<b>Producto #D12492</b>	<b>g%</b>	<b>kcal%</b>
Proteínas	26,2	20
Carbohidratos	26,3	20
Lípidos	34,9	60
<b>Total</b>		<b>100</b>
<b>kcal/g</b>	<b>3,85</b>	
<b>Ingrediente</b>	<b>g</b>	<b>kcal</b>
Caseína, 30 Mesh	200	800
L-Cisteína	3	12
Almidón de maíz	0	0
Maltodextrina 10	125	500
Sacarosa	68,8 (34,4 fructosa*)	275,2
Celulosa, BW200	50	0
Aceite de soya	25	225
Manteca de cerdo**	245	2205
Mezcla de minerales S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de calcio	5,5	0
Citrato de potasio, 1 H <sub>2</sub> O	16,5	0
Mezcla de vitaminas V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Tartrazina (FD&C yellow dye #5)	0,05	0
<b>Total</b>	<b>773,85</b>	<b>4057</b>

\* El aporte de fructosa fue calculado como el 50% de la sacarosa aportada

\*\* Análisis de colesterol en manteca de cerdo = 0,72mg/g

Colesterol (mg)/4057 kcal = 216,4

Colesterol (mg)/kg = 279,6

## ANEXO 2: Perfil de AG del aceite de anchoveta rico en EPA (Golden Omega)

Tabla A: Perfil de AGS de aceite de anchoveta rico en EPA

	% Metil Ester	g/100g
C10:0 Ácido Decanoico	0,000	0,000
C12:0 Ácido Dodecanoico	0,000	0,000
C14:0 Ácido Tetradecanoico	0,694	0,459
C16:0 Ácido Palmítico	2,248	1,486
C18:0 Ácido Estéarico	0,565	0,373
C20:0 Ácido Eicosanoico	0,425	0,281
C22:0 Ácido Docosanoico	0,758	0,501
C24:0 Ácido Tetracosanoico	0,000	0,000
<b>Total AGS</b>	<b>4,690</b>	<b>3,099</b>

Tabla B: Perfil de AGMI de aceite de anchoveta rico en EPA

	% Metil Ester	g/100g
C14:1n5 Ácido Tetradecenoico	0,000	0,000
C16:1n7 Ácido Palmitoleico	0,087	0,071
C18:1n9 Ácido Oleico	12,417	10,176
C20:1n9 Ácido Eicosaenoico	2,487	2,039
C22:1n9 Ácido Erucico	0,118	0,096
C24:1n9 Ácido Tetracosanoico	0,116	0,097
<b>Total AGMI</b>	<b>15,225</b>	<b>12,479</b>



Tabla C: Perfil de AGPI de aceite de anchoveta rico en EPA

	<b>% Metil Ester</b>	<b>g/100g</b>
C18:2n-6 Ácido Linoleico	1,244	1,019
C18:3n-6 Ácido $\gamma$ -Linolénico	0,205	0,168
C18:3n-3 Ácido $\alpha$ -Linolénico	1,065	0,872
C20:2n-6 Ácido Eicosadienoico	0,476	0,390
C20:3n-6 ácido Di-homo- $\gamma$ -Linolénico	0,476	0,390
C20:3n-3 Ácido 11,14,17 Eicosatrienoico	0,251	0,206
C20:4n-6 Ácido Eicosatetraenoico	3,194	2,617
<b>C20:5n-3 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)</b>	<b>53,551</b>	<b>43,887</b>
C22:5n-3 Ácido Docosapentaenoico	2,053	1,682
C22:6n-3 Ácido Docosahexaenoico (DHA)	15,573	12,764
<b>Total AGPI</b>	<b>78,087</b>	<b>63,995</b>

### **ANEXO 3: Cálculo y discusión de la dosis de suplementación de HT y EPA extrapolada a seres humanos**

#### **Cálculo:**

La tasa metabólica basal (TMB) del ratón es diferente a la del humano, lo que se debe considerar a la hora de extrapolar la dosis. La relación, es alométrica y no isométrica, en este caso. Esto quiere decir que la dosis no se puede calcular como proporcionalidad directa.

En mamíferos se utiliza la siguiente ecuación (90):

$$M = 70W^{3/4}$$

M: Tasa metabólica en Kilocalorías (kcal)/día

W: Masa corporal en Kilogramos (kg)

Se asume que el metabolismo del HT y del EPA es similar a la TMB, por lo que se utiliza también el 0,75 (90,91).

Considerando un ratón de 30g y un adulto de 70kg:

#### ✓ HT

En ratón de 30 g:	5mg/kg peso	→ 0,15 mg en 0,03 kg de ratón
		→ 0,15mg en 0,03 kg <sup>0,75</sup> = 2,08 mg/kg <sup>0,75</sup>
En humano de 70 kg:	2,08 x 70 kg <sup>0,75</sup>	= 50,33 ~ 50mg
	50/70 kg	= 0,71mg/kg

#### ✓ EPA

En ratón de 30 g:	50mg/kg peso	→ 1,5 mg en 0,03 kg de ratón
		→ 1,5mg en 0,03 kg <sup>0,75</sup> = 20,8 mg/kg <sup>0,75</sup>
En humano de 70 kg:	20,8 x 70 kg <sup>0,75</sup>	= 503,36 ~ 500mg
	500/70 kg	= 7,14 mg/kg

Por lo tanto:

5mg/kg extracto de olivo en ratón = 0,71 mg/kg en humano (50mg/día en humano de 70 kg)

50mg/kg aceite rico en EPA en humano = 7,14 mg/kg en humano (500mg/día en humano de 70 kg)

### **Discusión:**

En el caso del EPA, el valor superior del intervalo aceptable de distribución de nutrientes para el consumo de EPA y DHA se ha establecido en 2 g al día (24), por lo que no habría problemas en consumir esta dosis (350 mg/d de EPA).

En cuanto al HT, la dosis calculada no sería recomendable de consumir como parte del AOEV, ya que 20 g de AOEV tienen aproximadamente 5 mg de HT, lo que según la EFSA sería la dosis mínima para lograr efectos en la salud vascular (53). Para alcanzar la dosis de 20 mg habría que consumir 80 g de AOEV, lo que es un exceso tanto en cantidad como en aporte calórico. Sin embargo, se podría consumir como suplemento. Por ejemplo, en el mercado existen cápsulas en base a AOEV con alto contenido de HT (25 mg por cápsula), por lo que se podría alcanzar la dosis. El HT es un compuesto soluble que se elimina por la orina, siendo de 8 horas su vida media estimada (92). Auñón-Calles y cols. 2013, realizaron un estudio toxicológico del HT y llegaron a la conclusión de que el HT no presenta efectos genotóxicos ni mutagénicos, proponiendo un nivel en el que no se observan efectos adversos de 500mg/kg/día (93).

Por lo tanto, las dosis calculadas para seres humanos: 500mg/día de aceite rico EPA (350 mg de EPA) y 50mg/día de extracto rico en HT (20 mg HT), son dosis factibles y seguras de ingerir.

#### ANEXO 4: Cantidades de plasma y tejido utilizadas para las distintas mediciones

	Medición	Cantidad de muestra
<b>Muestra de hígado</b>	Histología	150 mg
	Grasa total	200 mg
	TAG	200 mg
	AGL	200 mg
	Glutación total, GSH y GSSG	50 mg
	TBARS	25 mg
	F8-isoprostanos	100 mg
	Proteínas carboniladas	100 mg
	Actividad de SOD	200 mg
<b>Muestra de plasma</b>	Transaminasas	50 µl
	Capacidad antioxidante plasmática	10 µl
	TNF- $\alpha$	100 µl
	IL-6	100 µl
	IL1 $\beta$	100 µl

## ANEXO 5: Características generales de los grupos experimentales

	DC				DAG			
	Sin (a)	HT (b)	EPA (c)	HT+EPA (d)	Sin (e)	HT (f)	EPA (g)	HT+EPA (h)
<b>Peso Inicial (g)</b>	14,71±1,02	14,38±0,99	14,56±1,11	14,51±0,91	14,26±0,74	14,31±0,86	14,77±1,02	14,56±0,97
<b>Peso Final (g)</b>	26,67±3,51 <sup>e</sup>	28,79±1,76 <sup>f</sup>	25,47±4,24 <sup>g</sup>	26,96±4,44	37,15±5,01 <sup>a,g,h</sup>	36,02±3,15 <sup>b,h</sup>	33,13±3,56 <sup>c,e</sup>	30,00±6,60 <sup>e,f</sup>
<b>Ganancia total de peso (g)</b>	11,95±3,74 <sup>e</sup>	14,42±1,88 <sup>h</sup>	10,91±4,44 <sup>g</sup>	12,45±4,02	22,89±5,40 <sup>a,g,h</sup>	21,71±2,91 <sup>b,h</sup>	18,36±2,99 <sup>e,c</sup>	15,44±6,11 <sup>e,f</sup>
<b>Peso Hígado (g)</b>	1,25±0,23 <sup>h</sup>	1,17±0,14	1,04±0,18	1,07±0,19	1,12±0,11	1,23±0,16 <sup>h</sup>	1,19±0,23 <sup>h</sup>	1,03±0,77 <sup>a,f,g</sup>
<b>Peso Tejido Adiposo (g)</b>	0,27±0,48 <sup>e,h</sup>	1,44±0,39 <sup>f</sup>	1,11±0,39 <sup>g</sup>	1,44±0,56 <sup>h</sup>	2,96±1,94 <sup>a,f</sup>	4,73±1,72 <sup>b,e,h</sup>	4,67±1,42 <sup>c,h</sup>	2,29±1,84 <sup>a,d,f,g</sup>
<b>Relación peso hígado (g)/peso tejido adiposo (g)</b>	1,05±0,25 <sup>e,h</sup>	0,88±0,28 <sup>f</sup>	0,95±0,23 <sup>g</sup>	0,72±0,27	0,49±0,22 <sup>a,h</sup>	0,30±0,12 <sup>b,h</sup>	0,28±0,09 <sup>c,h</sup>	0,75±0,48 <sup>a,e,f,g</sup>
<b>Relación peso tejido adiposo (g)/peso corporal (g)</b>	0,05±0,01 <sup>e,h</sup>	0,05±0,01 <sup>f</sup>	0,04±0,01 <sup>g</sup>	0,06±0,03	0,08±0,05 <sup>a,f,g</sup>	0,13±0,05 <sup>b,e,h</sup>	0,14±0,04 <sup>c,e,h</sup>	0,08±0,06 <sup>f,g,a</sup>
<b>Relación peso hígado(g)/peso corporal (g)</b>	0,05±0,00 <sup>e,h</sup>	0,04±0,01 <sup>f</sup>	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01 <sup>a</sup>	0,04±0,01 <sup>b</sup>	0,04±0,01	0,04±0,01 <sup>a</sup>

Los valores se presentan como media ± desviación estándar de peso corporal, peso hígado y peso tejido adiposo, en gramos (g); n =7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni para las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; T de student para comparar con grupos control y para comparar entre DAG+HT+EPA versus DC; las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales con p<0,05: (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA.

## ANEXO 6: Control de ingesta por grupo experimental

	DC				DAG			
	Sin (a)	HT (b)	EPA (c)	HT+EPA (d)	Sin (e)	HT (f)	EPA (g)	HT+EPA (h)
<b>Ingesta dietaria (g/día)</b>	9,08±2,44 <sup>e,h</sup>	6,18±1,32	6,14±1,11	6,20±1,69	4,58±1,37 <sup>a</sup>	5,45±1,41	5,58±1,30	5,10±1,38 <sup>a</sup>
<b>Ingesta energética (kcal/día)</b>	34,91±9,38 <sup>e,h</sup>	23,77±5,05	23,61±4,2 <sup>g</sup>	23,83±6,50	23,99±7,20 <sup>a</sup>	28,57±7,37	29,27±6,84 <sup>c</sup>	26,74±7,24 <sup>a</sup>
<b>Ingesta de proteínas (g/día)</b>	1,74±0,47 <sup>e,h</sup>	1,19±0,25	1,18±0,21 <sup>g</sup>	1,19±0,32	1,20±0,36 <sup>a</sup>	1,43±0,37	1,46±0,34 <sup>c</sup>	1,34±0,36 <sup>a</sup>
<b>Ingesta de grasas (g/día)</b>	0,39±0,10 <sup>e,h</sup>	0,27±0,06 <sup>f</sup>	0,26±0,04 <sup>g</sup>	0,27±0,07 <sup>h</sup>	1,60±0,48 <sup>a,g</sup>	1,90±0,49 <sup>b</sup>	1,95±0,46 <sup>c,e</sup>	1,78±0,48 <sup>a,d</sup>
<b>Ingesta de hidratos de carbono (g/día)</b>	6,11±1,64 <sup>e,h</sup>	4,16±0,89 <sup>f</sup>	4,13±0,75 <sup>g</sup>	4,17±1,14 <sup>h</sup>	1,20±0,36 <sup>a</sup>	1,43±0,37 <sup>b</sup>	1,45±0,34 <sup>c</sup>	1,34±0,36 <sup>a,d</sup>

Los valores se presentan como media ± desviación estándar de ingesta dietaria en gramos (g), ingesta energética en kilocalorías (kcal), ingesta de proteínas (g), ingesta de grasas (g), ingesta de hidratos de carbono (g), al día; n =7-8 por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni para las comparaciones entre los grupos alimentados con DAG; T de student para comparar con grupos control y para comparar entre DAG+HT+EPA versus DC; las letras en minúscula representan diferencias significativas entre grupos experimentales con p<0,05: (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA.

## ANEXO 7: Evolución de peso corporal y control de ingesta, por semana

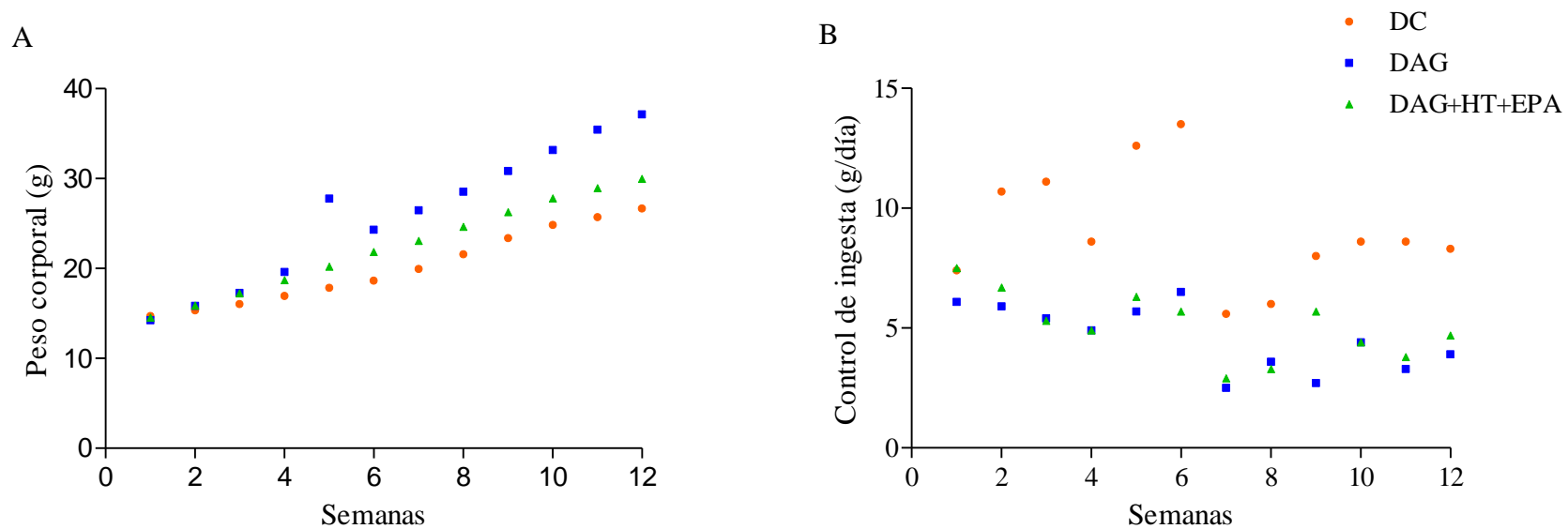


Figura: Peso corporal y control de ingesta por semana, en los grupos tratados con DC, DAG, y DAG+HT+EPA. (A) Evolución del peso corporal en gramos (g), por semana, (B) Evolución de la ingesta dietaria en gramos al día (g/d), por semana.

## ANEXO 8: Niveles séricos de transaminasas

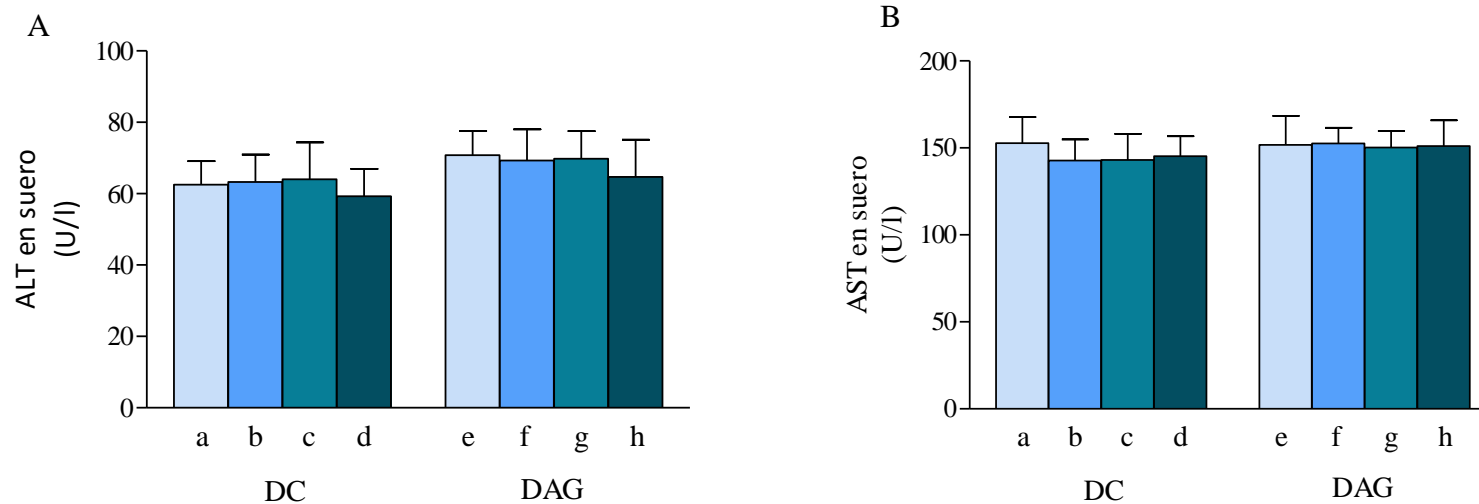


Figura: Niveles de transaminasas en suero. (A) Alanina aminotransferasa (ALT); (B) Aspartato aminotransferasa (AST). Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar de niveles de transaminasas (U/l);  $n = 7-8$  por grupo experimental. Análisis estadístico: Test Two-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni. Los tratamientos están representados por letras en minúscula: (a) DC, (b) DC+HT, (c) DC+EPA, (d) DC+HT+EPA, (e) DAG, (f) DAG+HT, (g) DAG+EPA, (h) DAG+HT+EPA. No se observan diferencias significativas entre grupos.



## ANEXO 9: Efecto neto de la suplementación sin diferencias significativas

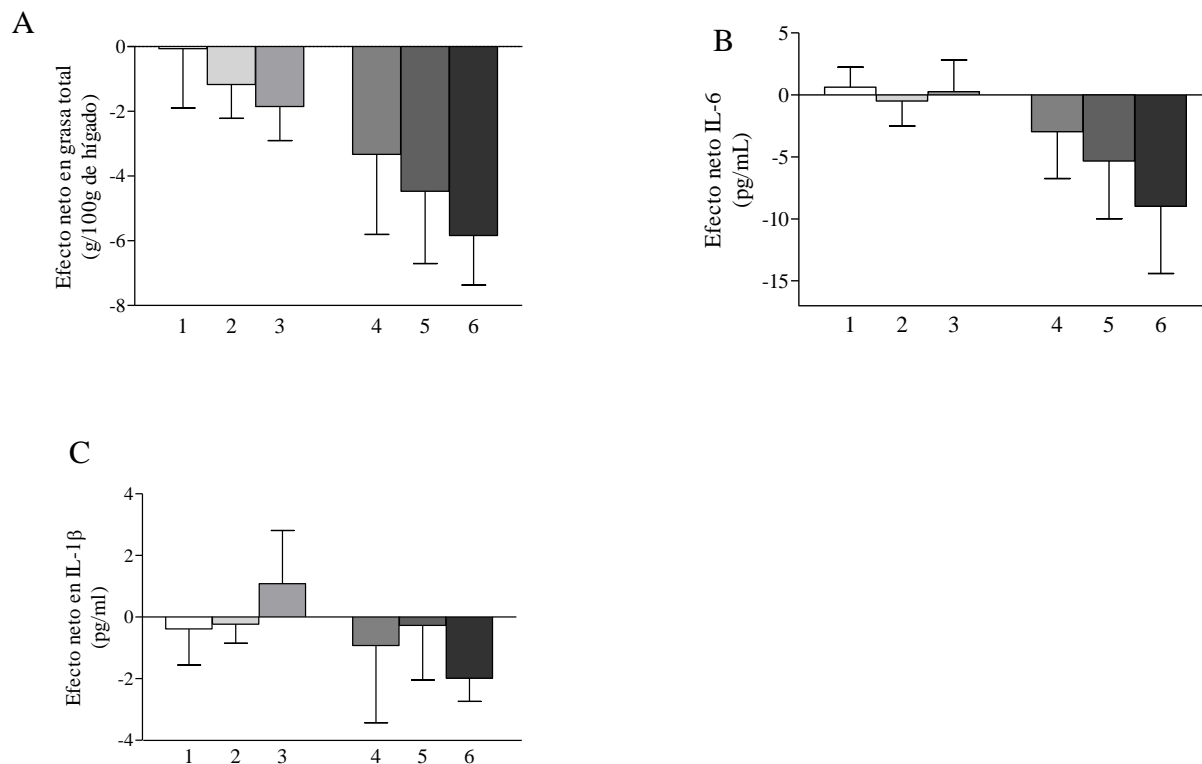


Figura: Efecto neto de la suplementación sobre grasa hepática total y niveles séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$ . (A) Efecto neto en grasa hepática total; (B) Efecto neto en niveles séricos de IL-6; (C) Efecto neto en niveles séricos de TNF- $\alpha$ . Análisis estadístico: Test One-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni. Los números representan diferencias significativas entre suplementaciones: (1) (DC+HT)-DC, (2) (DC+EPA)-DC, (3) (DC+HT+EPA)-DC, (4) (DAG+HT)-DAG, (5) (DAG+EPA)-DAG, (6) (DAG+HT+EPA)-DAG.

**ANEXO 10: Efecto neto en la suplementación sobre los distintos parámetros de glutación**

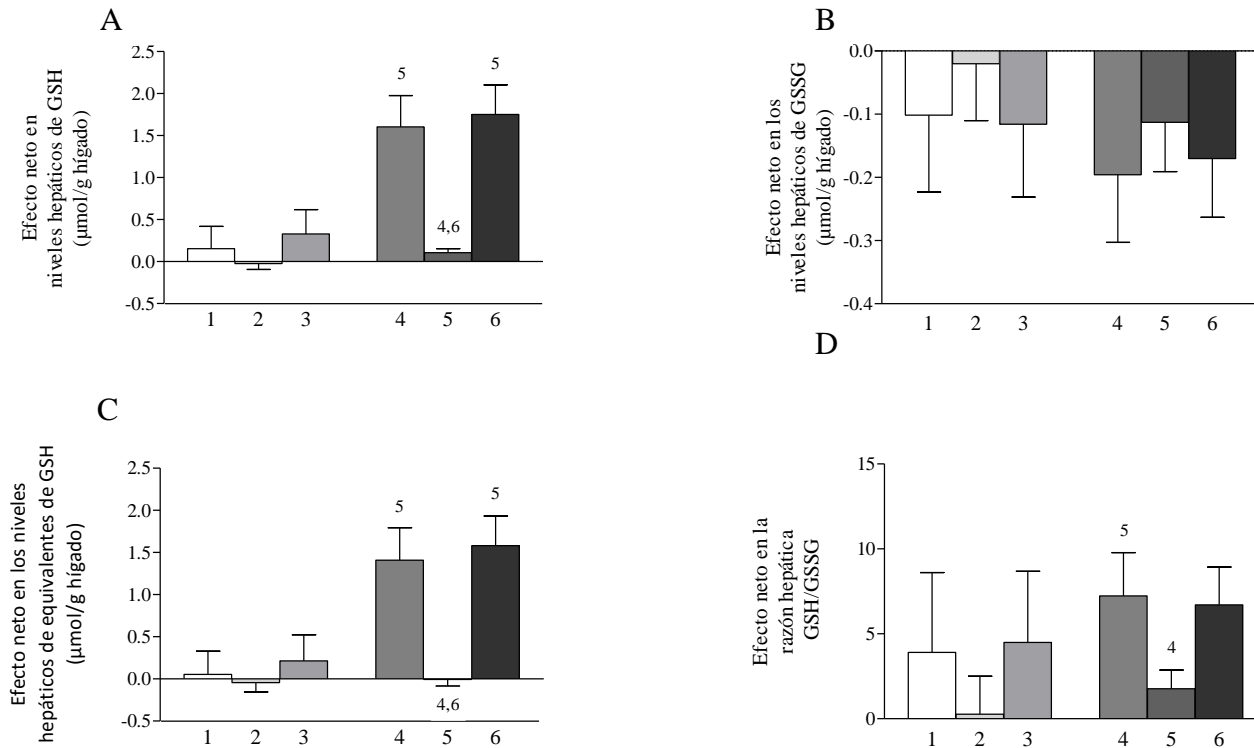


Figura: Efecto neto de la suplementación sobre parámetros hepáticos de glutación. (A) Efecto neto en GSH; (B) Efecto neto en GSSG; (C) Efecto neto en equivalentes de GSH; (D) Efecto neto en GSH/GSSG. Análisis estadístico: Test one-way ANOVA seguido de post-test Bonferroni. Los números representan diferencias significativas entre suplementaciones: (1) (DC+HT)-DC, (2) (DC+EPA)-DC, (3) (DC+HT+EPA)-DC, (4) (DAG+HT)-DAG, (5) (DAG+EPA)-DAG, (6) (DAG+HT+EPA)-DAG.

**ANEXO 11: Resumen de los mecanismos protectores de HT y EPA frente a la DAG**

