

UNIVERSIDAD DE CHILE  
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Doctor Fernando Monckeberg Barros

“Efecto protector de la suplementación dietaria con ácido docosahexaenoico e hidroxitirosol frente a la esteatosis hepática en ratones alimentados con una dieta alta en grasa: inactivación de NF- $\kappa$ B Y SREBP-1c”

Tesista: Paula Andrea Orellana Manríquez  
Director de Tesis: MSc. Ph.D. Rodrigo Valenzuela

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

Fuente de financiamiento proyecto FONDECYT de Iniciación 11140174

20 Junio 2018

## **1. Cuerpo preliminar**

### **I. Comisión de tesis**

Dra. Virginia Fernández, Profesora titular; Facultad de Medicina Universidad de Chile.

Dra. Marcela Reyes Profesora Asistente; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

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

## **II. Dedicatoria**

Esta tesis está dedicada a mis abuelos; Teresa y Augusto, quienes siempre han llenado mi vida de risas, amor, enseñanza y música.

### III. Agradecimientos

A mis padres, Rosa y Augusto, porque siempre nos entregaron amor e igualdad de oportunidades a mi hermano y a mí, sin distinción de género ni estereotipos.

A mi hermano xek por su apoyo y porque aún nos queda un largo camino de aprendizaje juntos.

A pepe, Ximena, Sofía y Marcos por el cariño y apoyo.

A mis amigas y amigos porque los procesos creativos no solo ocurren en un aula de clases.

A chaula.

A mi director de tesis Prof. Rodrigo Valenzuela por su orientación y amplia enseñanza tanto en pregrado como postgrado.

A Alicia, Patricio y Karla por su generosa enseñanza y amabilidad en el laboratorio.

A los profesores revisores de esta tesis: Virginia Fernández, Rodrigo Troncoso y Marcela Reyes por su buena disposición siempre a resolver mis dudas.

Al profesor Fernando Pizarro por su incondicional apoyo como coordinador, carisma y gran calidad docente.

A las grandes mujeres de la historia cuya fuerza ha sido mi fuente de inspiración.

Y por supuesto, a Daniela por enseñarme que la vida tiene tanto de yin como de yang y que de ambos debemos llenarnos. Gracias por el apoyo incondicional, paciencia, amor y ánimo para escribir esta tesis.

#### IV. Índice de contenidos

Contenido	Página
1. Cuerpo preliminar	2
i Comisión de tesis	3
ii. Dedicatoria	3
iii. Agradecimientos	4
iv. Índice de contenidos	5
v. Índice de tablas	7
vi. Índice de figuras	8
vii. Lista de abreviaturas	9
2. Resumen	12
3. Abstract	13
4. Introducción.	14
4.1 Historia de la Enfermedad por hígado graso no alcohólico	15
4.2 Patogenia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico	15
4.3 Rol de la insulino resistencia en el desarrollo de la EHGNA	15
4.4 Efecto de SREBP-1c En la lipogénesis de <i>novo</i> aumentada presente en la EHGNA	16
4.5 Rol NF-KB en la inflamación presente en la EHGNA	17
4.6 Efecto hepatoprotector de los AGPICL n-3	19
4.7 Rol del DHA en la prevención de la inflamación y lipogénesis de <i>novo</i> presente en la EHGNA	20
4.8 Efectos citoprotectores del Hidroxitirosol	20
5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos	23
5.1 Hipótesis	23
5.2 Objetivo general	23
5.3 Objetivos específicos	23
6. Metodología	24
6.1 Definición del diseño de la investigación	24
6.2 Definición de la muestra	24

6.3 Protocolo de intervención	24
6.4 Definición de conceptos y variables	25
6.5 Procedimientos y técnicas realizadas	26
6.6 Plan de análisis y técnicas estadísticas	28
7. Resultados	30
7.1 Efecto de la suplementación con DHA más HT en el peso corporal y peso del hígado en los ratones de los distintos grupos experimentales	30
7.2 Efecto de la suplementación con DHA más HT en parámetros de esteatosis y daño hepático	30
7.3 Efecto de la suplementación con DHA más HT en el contenido lipídico hepático	33
7.4 Efecto de la suplementación con DHA más HT en la actividad de unión al ADN de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B	34
7.5 Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles de ARNm DE SREBP-1C y NF-KB	35
7.6 Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica de genes regulados por SREBP-1C; FAS y ACA y regulados por NF- $\kappa$ B; IL1- $\beta$ Y TNF- $\alpha$	36
8. Discusión	39
8.1 Efecto de la suplementación con HT y DHA en características generales y dietarias de los grupos experimentales	39
8.2 Efecto de la suplementación con HT y DHA sobre parámetros de esteatosis y daño hepático	40
8.3 Efecto de la suplementación dietaria con HT y DHA sobre el perfil hepático de AG	40
8.4 Efecto de la suplementación con DHA y HT sobre parámetros asociados al metabolismo lipídico	43
8.5 Efecto de la suplementación con HT y DHA sobre parámetros inflamatorios	45
9. Conclusión	47
10. Referencias	48
11. Anexos	56

## V. Índice de tablas

Número de Tabla	Página
Tabla 1. Perfil hepático de AG por grupo experimental	34
Tabla 2. Perfil ácidos grasos totales del aceite utilizado como fuente de DHA	56
Tabla 3. Información nutricional de las dietas experimentales	
Tabla 4. Características generales de los animales	58
Tabla 6. Cuantificación ingesta	60

## VI. Índice de figuras

Número de figura	Página
Figura 1. Resumen de procesos implicados en la activación de SREBP-1c	17
Figura 2. Resumen de procesos implicados en la activación de NF- $\kappa$ B	19
Figura 3. Resumen de los efectos hepatoprotectores descritos en la literatura para DHA y HT en animales expuestos a HFD hasta la fecha	22
Figura 4. Resumen intervención	29
Figura 5. Resultados de histología hepática (5.1) y score de esteatosis (5.2) de ratones alimentados con DC y HFD con y sin suplementación de DHA o HT o suplementación conjunta de DHA + HT.	31
Figura 6. Niveles hepáticos ácidos grasos libres (6.1) y triacilglicéridos TG (6.2)	33
Figura 7. Resultados porcentaje de actividad de unión al ADN de SREBP-1c (4.1) y NF- $\kappa$ B (4.2) de ratones alimentados con DC y HFD con y sin suplementación de DHA o HT o suplementación conjunta de DHA + HT	35
Figura 8. Resultado de niveles hepáticos de ARNm de SREBP-1c (8.1) y NF- $\kappa$ B (8.2)	37
Figura 9. Resultado de niveles hepáticos de ARNm FAS (9.1), ACA (9.2), IL1- $\beta$ (9.3) y TNF- $\alpha$ (9.4)	38
Figura 10. Resumen de vías metabólicas implicadas en efecto hepatoprotector de la suplementación conjunta de DAG+ HT en HFD.	46

## VII. Lista de abreviaturas

<b>ACA</b>	Acetil-CoA, Carboxilasa
<b>ACOX</b>	Acil-CoA oxidasa ACOX
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AGMI</b>	Ácidos grasos monoinsaturados
<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>AL</b>	Ácido linoleico
<b>ALA</b>	Ácido alfa-linolénico
<b>AO</b>	Ácidooleico
<b>AOEV</b>	Aceite de oliva extra virgen
<b>ApoB-100</b>	Apolipoproteína B -100
<b>ALT</b>	Alaninatransaminasa
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AST</b>	Apartatotransaminasa
<b>ATF4</b>	Del inglés <i>Activating Transcription Factor 4</i>
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>CHO</b>	Carbohidratos
<b>CPT-1</b>	Carnitina palmitoiltransferasa I
<b>CYP4</b>	Del inglés <i>cytochrome P450 4</i>
<b>DHA</b>	Ácido docosaheptaenoico
<b>EHGNA</b>	Enfermedad por hígado graso no alcohólico
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Del inglés <i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i>
<b>ELISA</b>	Del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EO</b>	Estrés oxidativo
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno

<b>FAS</b>	Del inglés <i>FattyAcidSynthase</i>
<b>FFA4</b>	Del inglés <i>Free-fattyacid receptor-4</i>
<b>g</b>	Gramos
<b>GSH</b>	Del inglés <i>Reduced glutathione</i>
<b>GSSG</b>	Del inglés <i>Glutathionedisulfide</i>
<b>GST</b>	Del inglés <i>Glutati3n S-Transferasa</i>
<b>HFD</b>	Del inglés <i>High fatdiet</i>
<b>HT</b>	Hidroxitirosol
<b>IR</b>	Insulinoresistencia
<b>IkB</b>	Subunidad inhibidora de NF-κB
<b>IKK</b>	Del inglés <i>EnzymelkBkinase</i>
<b>IL1-β</b>	Interleuquina 1β
<b>mTORC1</b>	del inglés <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
<b>NF-κB</b>	Del inglés <i>nuclear factor kappa B</i>
<b>NLRP3</b>	Del inglés <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor containing pyrin domain 3 inflammasome</i>
<b>Nrf2</b>	Del inglés <i>Nuclear factor erythroid-like 2</i>
<b>OMS</b>	Organizaci3n mundial de la salud
<b>PERK</b>	Del inglés <i>Proteinkinase RNA-likeendoplasmicreticulumkinase</i>
<b>PPAR-α</b>	Del inglés <i>peroxisomeproliferator-activatedreceptors alfa.</i>
<b>PPAR-γ</b>	Del inglés <i>peroxisomeproliferator-activatedreceptors Y</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RvE1</b>	Resolvina E1
<b>RvE2</b>	Resolvina E2
<b>SCAP</b>	del inglés <i>cleavage-activatingprotein</i>
<b>SCoAD-1</b>	Estearoil - CoAdesaturasa - 1
<b>SOD</b>	Superoxidodismutase
<b>S1P</b>	Del inglés site 1 protease
<b>S2P</b>	Del inglés site 2 protease
<b>SRE</b>	Del inglés Sterol regulating elements

<b>SREBP-1c</b>	Del inglés <i>Sterol regulatory element-binding proteins 1c</i>
<b>SREBP-1a</b>	Del inglés <i>Sterol regulatory element-binding proteins 1a</i>
<b>SREBP-2</b>	Del inglés <i>Sterol regulatory element-binding proteins 2</i>
<b>TBAR</b>	del inglés <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
<b>TG</b>	Triacilglicéridos
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>UPR</b>	Del inglés <i>Unfolded protein response</i>
<b>V-LDL</b>	Del inglés <i>verylowdensit y lipoptotein</i>

## 2. Resumen

**Introducción:** La enfermedad por hígado graso no alcohólico es la causa más importante de enfermedad hepática crónica en el mundo. Se caracteriza por la acumulación anormal de TG en los hepatocitos (esteatosis) que puede evolucionar con inflamación, fibrosis y cirrosis. El consumo de ácidos grasos saturados e hidratos de carbono en exceso, estimulan la lipogénesis y la esteatosis hepática, por una mayor disponibilidad y oxidación de AG, resistencia a la insulina y disminución de AGPICL n-3. Estos últimos, especialmente el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA) tienen efectos antilipogénicos e inflamatorios. En esta línea, el Hidroxitirosol (HT), presenta un efecto citoprotector previniendo la lipoperoxidación y daño oxidativo del ADN. Dados estos antecedentes, la suplementación conjunta de DHA + HT sugiere una adición en el efecto hepatoprotector. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la suplementación dietaria con DHA + HT sobre la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasa (en inglés *highfatdiet*, HFD) mediante la inactivación de NF- $\kappa$ B y de SREBP-1c. **Metodología:** Estudio experimental, aleatorizado, controlado, prospectivo, en modelo animal (ratones machos C57BL/6J), asignados aleatoriamente a uno de los ocho grupos experimentales con dieta control (DC) o HFD (10% y 60% de las calorías provenientes de grasa respectivamente) con o sin suplementación de DHA + HT. Se evaluó la presencia de esteatosis hepática mediante histología determinada por presencia de infiltración grasa, la actividad de unión al ADN de los factores de transcripción de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B mediante ELISA y la expresión hepática del mRNA de SREBP-1c, NF- $\kappa$ B, FAS, ACA, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mediante q-PCR. **Resultados:** La alimentación con HFD indujo esteatosis hepática, un estado proinflamatorio y prolipogénico. En oposición, la suplementación conjunta de DHA+ HT en HFD produjo i) menor infiltración grasa en el hígado; ii) disminución de la expresión de marcadores proinflamatorios TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  iii) disminución en la expresión de enzimas prolipogénicas FAS y ACA y iv) Disminución de la actividad de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B **Conclusiones:** La administración conjunta de DHA + HT puede prevenir el desarrollo de esteatosis hepática provocada por HFD en ratón mediante la disminución de la expresión de los genes SREBP1c y NF- $\kappa$ B y de las proteínas reguladas por estos factores de transcripción; FAS, ACA para SREBP1c y TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para NF- $\kappa$ B

### 3. Abstract

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease is the most important cause of chronic liver disease in the world. It is characterized by the abnormal accumulation of triacylglycerides in the hepatocytes (steatosis) that can evolve to inflammation, fibrosis and cirrhosis. The consumption of saturated fatty acids and excess carbohydrates, characteristic of the western diet, stimulate lipogenesis and hepatic steatosis, due to greater availability and oxidation of fatty acids, insulin resistance and decrease of long chain polyunsaturated fatty acids, n-3 (LCPUFAs n-3), favoring a hepatotoxic and proinflammatory state. N-3 LCPUFAs, mainly eicosapentaenoic acid (C20: 5, EPA) and docosahexaenoic acid (C22: 6, DHA), control hepatic lipid metabolism by stimulating lipolysis and inhibiting lipogenesis, thus decreasing the inflammatory hepatic response. In this same line, Hydroxytyrosol (HT), has a marked cytoprotective effect and can prevent lipoperoxidation and oxidative DNA damage. Given these antecedents, the joint supplementation of DHA + HT suggests a synergy in the hepatoprotective effect. **Objective:** To evaluate the effect of dietary supplementation with DHA+HT on hepatic steatosis induced by a high-fat diet (HFD) by inactivating NF- $\kappa$ B and SREBP-1c. **Methodology:** Experimental, randomized, controlled, prospective study in animal model (male C57BL / 6J mice), randomly assigned to one of the eight experimental groups exposed to a control diet or high-fat diet (10% and 60% of calories from fat, respectively) with or without supplementation of DHA + HT. The presence of hepatic steatosis was evaluated by histology determined by the presence of fatty infiltration, the DNA binding activity of the transcription factors of SREBP-1c and NF- $\kappa$ B by ELISA and the hepatic expression of SREBP-1c mRNA, NF- $\kappa$ B, FAS, ACA, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by q-PCR. **Results:** Feeding with HFD induced hepatic steatosis, a proinflammatory and prolypogenic state. In opposition, the joint supplementation of DHA + HT in HFD produced i) less fatty infiltration in the liver; ii) decrease in the expression of proinflammatory markers TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  iii) decrease in the expression of prolypogenic enzymes FAS and ACA iv) Decrease in the activity of SREBP-1c and NF- $\kappa$ B **Conclusions:** The co-administration of DHA + HT can prevent the progression of NAFLD caused by HFD in mice by decreasing the activity of transcription factors SREBP1c and NF- $\kappa$ B and the proteins regulated and; FAS, ACA for SREBP1c and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  for NF- $\kappa$ B.

## **4. Introducción**

### **4.1 Historia de la enfermedad**

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es un trastorno metabólico multifactorial que comprende un espectro de enfermedades, que incluyen esteatosis simple, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (1). En la actualidad, la prevalencia de EHGNA en la población mundial se ha estimado entre el 20-30% (2), siendo hoy en día la segunda razón más común para el trasplante de hígado (3). Específicamente en pacientes obesos la prevalencia de EHGNA se encuentra entre el 60 y 90%, la esteatosis hepática entre el 20 al 25% y la cirrosis hepática entre el 2 y 8% (4). En esta línea, se estima que el 40% de las personas con EHGNA podrían desarrollar esteatohepatitis no alcohólica (4). Histológicamente la EHGNA se caracteriza por una acumulación hepática anormal de triacilglicéridos (TG) correspondiente a más del 5% del peso total del hígado, con un consumo de alcohol menor a 20 gr/día para mujeres y 40 gr/día para hombres (5). Al respecto, la dieta occidental favorece el desarrollo de EHGNA (6), ya que, se caracteriza por una elevada ingesta energética proveniente principalmente del consumo de harinas, cereales, azúcares agregados y jarabe de maíz alto en fructosa, produciendo un aumento de la glucosa plasmática y el nivel de insulina circulante (7,8). Además, la dieta occidental presenta un bajo consumo de pescados grasos, principal fuente natural de AGPICL n-3 y un alto consumo de alimentos ricos en AGPICL n-6 (6-8) lo que genera un desbalance en la relación AGPICL n6/n3 con efectos prolipogénicos (9) y proinflamatorios (10). Sumado a lo anterior, existe una alta ingesta de grasas saturadas principalmente de ácido palmítico (C16:0) cuya sobrecarga genera estrés oxidativo (EO) (11) e inflamación (12). En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar en hepatocitos de ratones las adaptaciones moleculares involucradas en la citoprotección inducida por la suplementación conjunta de DHA +HT en HFD.

### **4.2 Patogenia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico**

Se ha sugerido "la hipótesis de dos golpes" para explicar la patogénesis de la EHGNA avanzada; el primer golpe impulsaría el desarrollo de la esteatosis hepática simple, incluyendo el aumento de la llegada de AGL al hígado vía portal, lipogénesis de *novo* aumentada, (7) disminución de la  $\beta$ -oxidación (8), disminución de la exportación de TG y alteración del ensamblaje de las V-LDL (7,8). El segundo golpe, lo desencadenaría la

inflamación (9) y fibrosis (8). En este contexto, la lipotoxicidad, la IR y la inflamación están involucradas en la progresión de esteatosis leve a esteatohepatitis (11). Al respecto, Donnelly y cols., (13) demostraron en el año 2005, entre pacientes con EHGNA, que el 60% de los TG hepáticos provienen de los AGL circulantes, donde el 25% deriva de la lipogénesis de *novo* y el 15% restante se forma a partir de los AGL procedentes del metabolismo de la grasa dietaria. La lipotoxicidad emerge como consecuencia del depósito de TG hepáticos en niveles patológicos y de la disminución en la capacidad antioxidante sistémica con aumento de estrés oxidativo (EO) y daño celular (7,14). La lipotoxicidad además, promueve la IR, que a su vez aumenta la lipólisis de los adipocitos y exagera la lipotoxicidad, constituyendo ambas vías un círculo vicioso acelerando el desarrollo de esteatosis hepática y su progresión a etapas más severas (15). En este contexto de pérdida de la homeostasis celular, emerge como integrador de las redes de vías inflamatorias, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), el cual regula la expresión de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6) y las anticitocinas inflamatorias, como la adiponectina (14,15).

#### **4.3 Rol de la insulino resistencia en el desarrollo de la EHGNA**

La malnutrición por exceso genera un aumento de los niveles de glucosa circulante concomitante con el incremento de liberación de insulina alcanzando niveles patológicos a nivel celular y sistémico (10). En respuesta a este ambiente patológico, y como mecanismo de protección, el hígado se hace resistente a la insulina, lo que produce un aumento de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática (10). Esto a su vez resulta en hiperglicemia que estimula aún más la producción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas como mecanismo compensatorio y redundante, dado que la insulina se encuentra limitada en su eficacia por la IR (10,15). Concomitante con lo anterior existe una IR periférica que genera un aumento de la captación de glucosa a nivel hepático producto de la disminución de la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y el tejido adiposo (15), evento que aumenta aún más la llegada de AGL al hígado (16). Producto de lo anterior, se incrementan las tasas de oxidación de AG a nivel mitocondrial y además aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (16). Considerando que tanto el hígado como los demás tejidos no adiposos poseen una limitada capacidad para almacenar TG, el exceso de estas moléculas promueve la lipotoxicidad y daño celular (11,17). La insulina, además, puede potenciar la síntesis de los ácidos grasos al activar a SREBP-1c (9) y regular negativamente

la  $\beta$ -oxidación de AG a nivel hepático (10,17), aumentando mediante estas vías el efecto lipogénico que se le atribuye.

#### **4.4 Efecto de SREBP-1c en la lipogénesis de *novo* aumentada presente en la EHNA**

Los SREBPs comprenden una serie de factores de transcripción que regulan el metabolismo de los AG y el colesterol en el hígado (18). En depleción de esteroides, los SREBP se escinden y se convierten en formas maduras para unirse a elementos reguladores de esteroides (SRE) y / o secuencias E-box (19) y luego activar la expresión del gen diana. Por lo tanto, tanto los niveles de expresión como el procesamiento de SREBP regulan la expresión del gen. La proteína activadora de la escisión de SREBP (SCAP) acompaña a los SREBP al complejo de Golgi, donde son escindidos secuencialmente por dos proteasas unidas a la membrana (S1P y S2P), liberando así el dominio NH<sub>2</sub>-terminal, permitiendo su ingreso al núcleo (20). Existen 3 formas de SREBP (SREBP1a, SREBP-1c y SREBP-2) siendo SREBP-1c la isoforma predominante en hígado (19), jugando un rol fundamental en la regulación dietética de los genes lipogénicos hepáticos (20). Al respecto, se ha descrito que SREBP-1c puede activar la expresión de más de treinta genes que regulan enzimas implicadas en la síntesis de AG. Entre ellas la ATP citrato liasa; la acetil coa carboxilasa (ACA) (21), considerada la enzima marcapasos de la síntesis de AG al catalizar el paso de Acetil CoA a MalonilCoa; la ácido graso sintasa (FAS, del inglés *Fatty Acid Synthase*) que cataliza 7 reacciones hasta la formación de Palmitoil Coa (22); elongasas y la estearoil CoA desaturasa (SCoAD-1) (23). De este modo, presenta efecto en la activación, síntesis y posterior esterificación de los AG a TG (22). La insulina hepática activa a SREBP-1c aumentando *i*) la transcripción de SREBP-1c (15, 24), *ii*) el procesamiento de SREBP-1c a un fragmento soluble capaz de translocarse a el núcleo para activar la transcripción (24,25) y *iii*) la actividad de mTORC1, que regula positivamente la expresión y el procesamiento del ARNm de SREBP1c (26). Sin embargo, SREBP-1c también está regulado independientemente de la insulina, Haas y cols., 2012 (27) informaron que SREBP-1c se indujo después de la alimentación en ratones que carecen de receptores de insulina hepática al estar sometidos a una HFD (55% kcal como grasa, 21% kcal proteína y 24% kcal CHO) por 18 semanas. En línea con Ahagi N y cols. (28), quienes informaron en el 2002, que ratones *ob/ob* knockout para SREBP-1c tampoco desarrollaron esteatosis masiva característica de los ratones *ob/ob*. Por lo tanto, SREBP-1c es necesario

y suficiente para el desarrollo de la esteatosis inducida por HFD. El resumen de la activación de SREBP-1c se presenta en la figura 1.

**Figura 1**

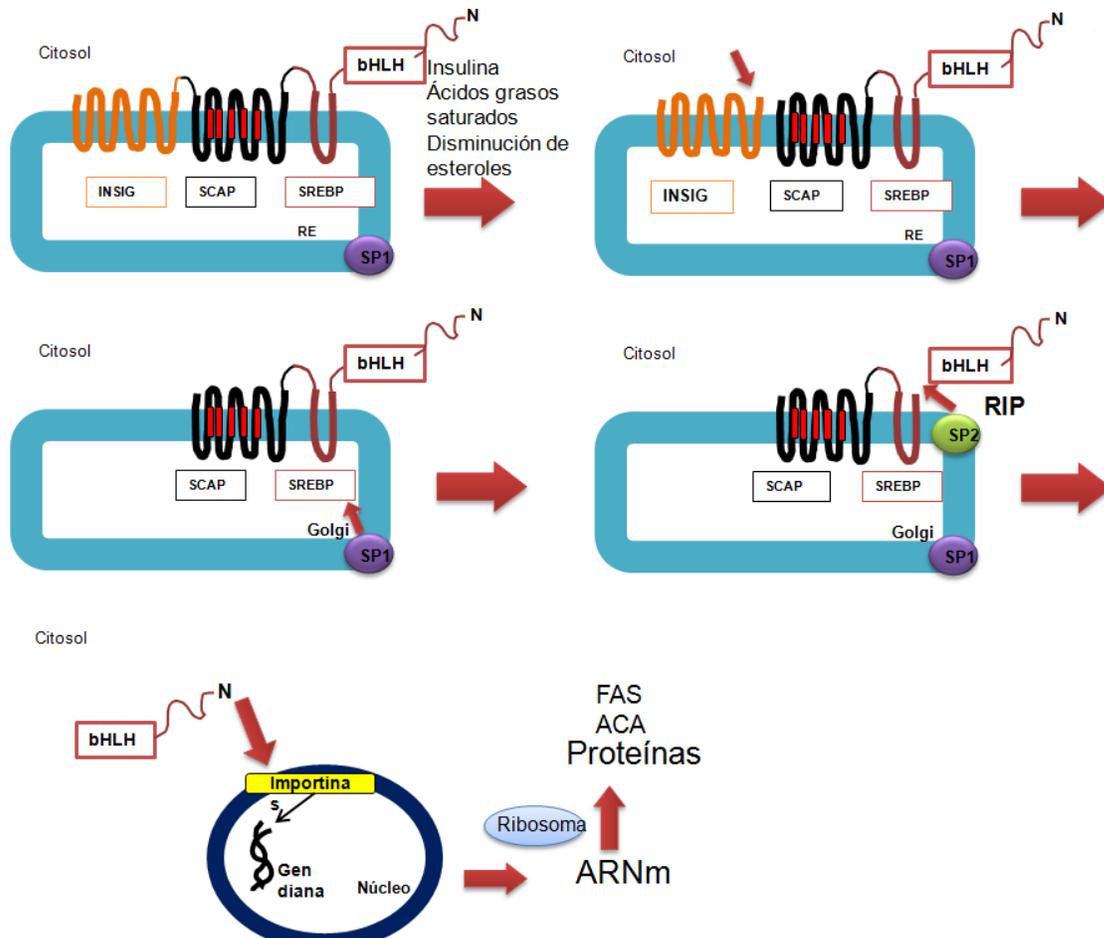


Figura 1. Resumen de procesos implicados en la activación de SREBP-1c desde la activación por un estímulo del procesamiento y escisión de SREBP, escisión proteolítica por proteasas de membrana, liberación del dominio NH<sub>2</sub>-terminal, activación nuclear de la transcripción y posterior traducción de derivados metabólicos implicados en la lipogénesis.

## 5. Rol de NF-κB en la inflamación presente en la EHGNA

Además del estado prolipogénico en EHGNA, la inflamación también constituye un eje en el daño hepático desencadenado por la HFD (7). Al respecto, NF-κB constituye una familia de factores de transcripción eucarióticos que promueven la expresión de más de 150 genes involucrados en una variedad de procesos celulares (29). Existen 5 miembros de la familia NF-κB, siendo la forma activa más común p50 (29). Al respecto, NF-κB está involucrado en

respuestas inmunitarias innatas, respuestas adaptativas e inflamación (30), promoviendo la síntesis de citocinas proinflamatorias, proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis entre otros (30). En condiciones normales, en su estado inactivo, se encuentra como un trímero localizado dentro del citosol unido a la proteína inhibidora (*IκB*) (31). La activación de NF-κB puede ejercerse mediante muchas vías de transducción de señales diferentes incluyendo citoquinas inflamatorias (TNF-α e IL1β) (31,32), patógenos virales y bacterianos, y agentes inductores de estrés como EROs y lipoperoxidación, los cuales convergen en un solo objetivo; la disociación del complejo NF-κB/*IκB*, considerándose la vía clásica la activación de la enzima IκB quinasa (*IKK*) (32). Ante el estímulo el complejo citoplásmico NF-κB/*IκBa* se activa por fosforilación en los residuos de serina en el parte N-terminal de *IκB* mediada por el complejo multimérico, denominado *IκB* quinasa (o complejo *IKK*) (32) lo que conduce a la posterior ubiquitinización y degradación de la subunidad inhibidora por el proteosoma 26S (33), generando su disociación y posterior translocación del dímero restante al núcleo (33). Este proceso activa a NF-κB dando como resultado la optimización de la capacidad de unión de NF-κB al ADN (31-33). Esta vía conduce a la regulación positiva de los genes regulados por NF-κB que codifican mediadores inflamatorios entre ellos TNF-α (31), IL1-β e IL6-β (33). El TNF-α por su parte, promueve la liberación de AG e inhibe la β-oxidación favoreciendo el proceso de esteatosis celular (34), además puede bloquear la transducción de la señal de insulina (35) y promover la síntesis de EROs (35). En la figura 2 se presenta un esquema resumen de la activación de NF-κB. Se encuentra documentado en la literatura que el alto contenido de grasas saturadas presente en la dieta occidental, especialmente ácido palmítico (C16:0), genera un efecto proinflamatorio mediante la activación de NF-κB, (10), producto de la desregulación de PPAR-α (10), conduciendo a la activación del inflammasoma (10,31).

Figura 2

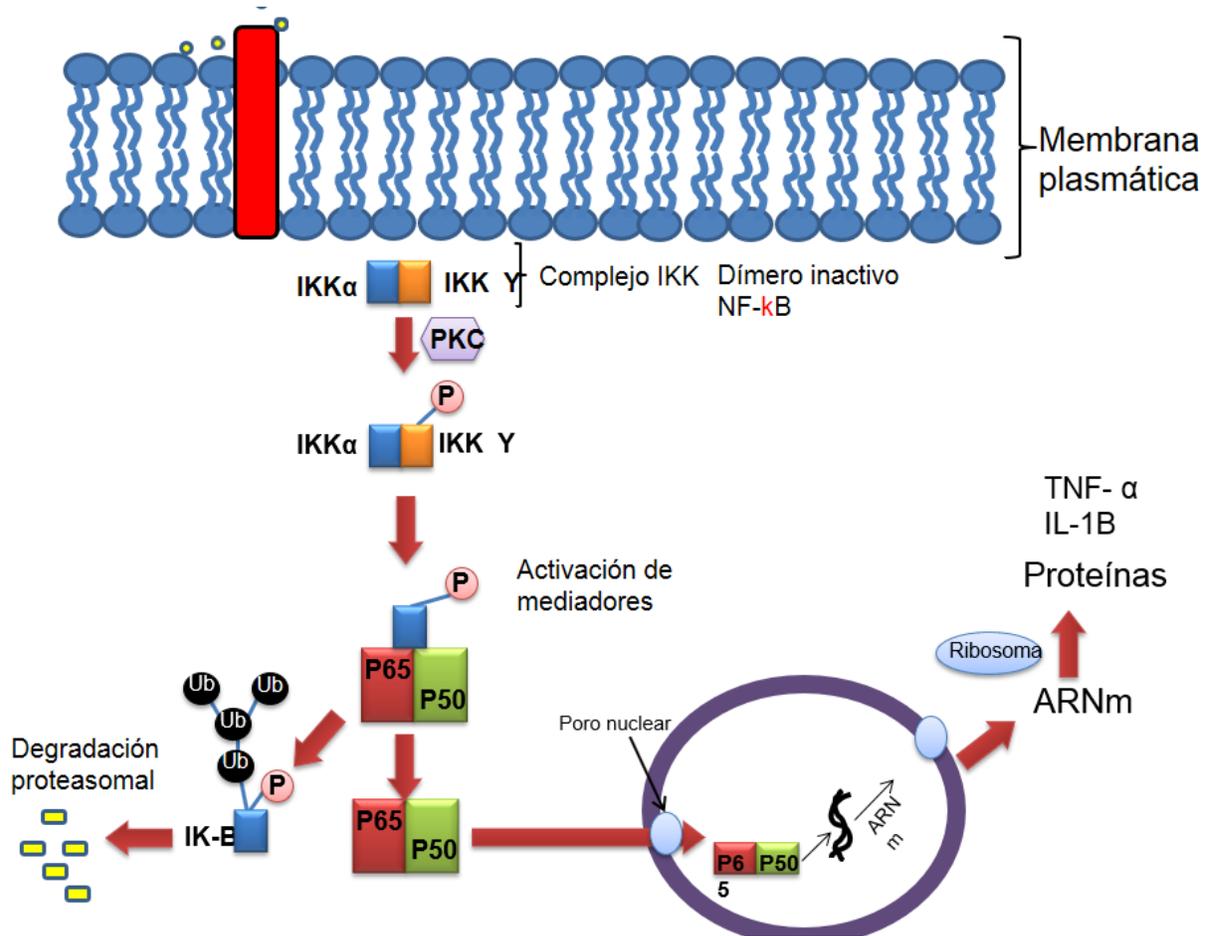


Figura 2. Resumen de procesos implicados en la activación de NF-κB desde la activación del receptor transmembrana por una señal extracelular, activación de mediadores por fosforilación, degradación por ubiquitinización de la subunidad inhibidora, activación en el núcleo de la transcripción de derivados metabólicos implicados en la inflamación y posterior traducción a proteínas en el ribosoma (TNF-  $\alpha$ , IL-1B).

#### 4.6 Efecto hepatoprotector de los AGPICL n-3

Un factor común de los pacientes con EHGNA es su perfil lipídico, donde existe una disminución de los niveles hepáticos de AGPICL n-3 (10). Esta disregulación metabólica puede ser consecuencia del *i*) bajo consumo de AGPICL n-3 y / o su precursor, ácido alfa-linolénico (C18:3 n-3, ALA) (8) *ii*) aumento de la peroxidación lipídica como consecuencia del aumento de EROs (8, 12), o *iii*) disminución de la desaturación y elongación de ALA a EPA y DHA producto de la reducción de la actividad enzimática de las  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas, secundaria a la desnaturalización de estas enzimas o como consecuencia del estado oxidante preponderante en esteatosis por lipotoxicidad (13,15). La dieta occidental,

se caracteriza por un bajo consumo de AGPICL n-3 derivados de pescados grasos como el atún, jurel, anchoas, salmón y sardina, además de una alta ingesta de AGPI n-6 derivado de carnes y aceites vegetales (8). Al respecto, la FAO recomienda una ingesta AGPICL en razón n-6/n-3 de 5:1 (8), sin embargo, la dieta occidental alcanza valores de AGPICL n-6/n-3 de hasta 20:1 (13,15). Dicha recomendación se basa en que existe una competencia enzimática entre las enzimas  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas las cuales participan tanto de la vía metabólica de AGPICL n-6 como de n-3, teniendo más afinidad por estos últimos (7). La reducción del nivel hepático de AGPICL n-3 EPA y DHA en HFD, se asocia con disminución de *i*) la actividad de PPAR- $\alpha$  (11) *ii*) de los niveles de apolipoproteína B-100 (APOB-100) (11) y *iii*) de la síntesis de VLDL (del inglés *very low density lipoprotein*) (13). Además, este desbalance favorece la formación de derivados proinflamatorios y protrombóticos de los AGPICL n-6 tales como eicosanoides derivados del Ácido Araquidónico (C20:4n-6,ARA) (8,13). Contrario a esto, los eicosanoides derivados de los AGPICL n-3 EPA y DHA poseen características antiinflamatorias y antitrombóticas (36).

#### **4.7 Rol del DHA en la prevención de la inflamación y lipogénesis de *ново* presente en la EHGNA**

El DHA es precursor de mediadores antiinflamatorios tales como las resolvinas de la serie D (36) y protectinas que son sintetizadas a partir del 17S-hidroxi-DHA (producto intermedio de DHA) (36). En la literatura se sugiere una inhibición de SREBP-1c dependiente DHA en múltiples niveles *i*) disminución de la transcripción (37), *ii*) aumento de la degradación proteasomal de SREBP1c (38), y *iii*) supresión de la escisión proteolítica, impidiendo la maduración (38,39) siendo este último el principal mecanismo de inhibición (39) El efecto antilipogénico del DHA en la HFD, se fundamenta en que promueve la  $\beta$ -oxidación de AG mediante el incremento de la actividad de PPAR- $\alpha$  e inhibición de SREBP-1c (39,40). Respecto al efecto antiinflamatorio del DHA en HFD, se encuentra descrito en la literatura que este AGPICL n3 regula negativamente la cascada metabólica implicada en la activación de NF- $\kappa$ B y sus derivados metabólicos como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (40-42), mediante la activación de PPAR- $\alpha$  (40,42).

#### **4.8 Efectos citoprotectores del Hidroxitirosol**

El aceite de oliva es un producto vegetal obtenido a partir del mesocarpio del fruto del olivo mediante un proceso de prensado en frío (43). El producto del primer prensado de la

aceituna es el aceite de oliva virgen extra (AOEV), que se considera el estándar de oro de los aceites comestibles (43). El AOEV presenta mayormente AG monoinsaturados (MUFA, 55-83%), principalmente ácido oleico (C18: 1 n-9, AO) (43).

Una porción del AOEV está representado por componentes menores que incluyen una fracción no saponificable (apolar), representada por triterpenos, esteroides, tocoferoles y pigmentos, que pueden extraerse con disolventes; además de una fracción polar, donde los compuestos fenólicos son prominentes, entre ellos el hidroxitirosol (HT) (44). El contenido de estos componentes varía según el tipo de cultivo, el clima, la madurez de la aceituna en el momento de la cosecha y el proceso industrial utilizado para producir AOEV (44). El reconocido poder antioxidante del AOEV está dado por un alto contenido de vitamina E (tocoferol) y de polifenoles como el HT (43). Hasta ahora el rol hepatoprotector del HT en ratones expuestos a HFD tiene relación con un efecto antiinflamatorio y antioxidante a través de *i*) la activación del factor de Nrf2 (del inglés, *Transcripción nuclear erythroid-2-like 2*), induciendo la respuesta antioxidante celular (44); *ii*) Inactivación de NF- $\kappa$ B, disminuyendo la respuesta inflamatoria (45); y *iii*) Inhibición de la vía PERK (del inglés *Proteinkinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), evitando el estrés del retículo endoplasmático, la autofagia y la respuesta lipogénica (46). Además, el HT ha demostrado prevenir la reducción de la actividad hepática de las enzimas  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas en HFD, favoreciendo el metabolismo de los AGPICL n-3 (45), la actividad de PPAR- $\alpha$  y  $\beta$ -oxidación de AG (44). Pudiendo contribuir a la prevención de la lipoperoxidación y el daño oxidativo del ADN (44). En la imagen 1 se presenta el resumen de los efectos citoprotectores del DHA y de HT presentes en la literatura.

Figura 3.

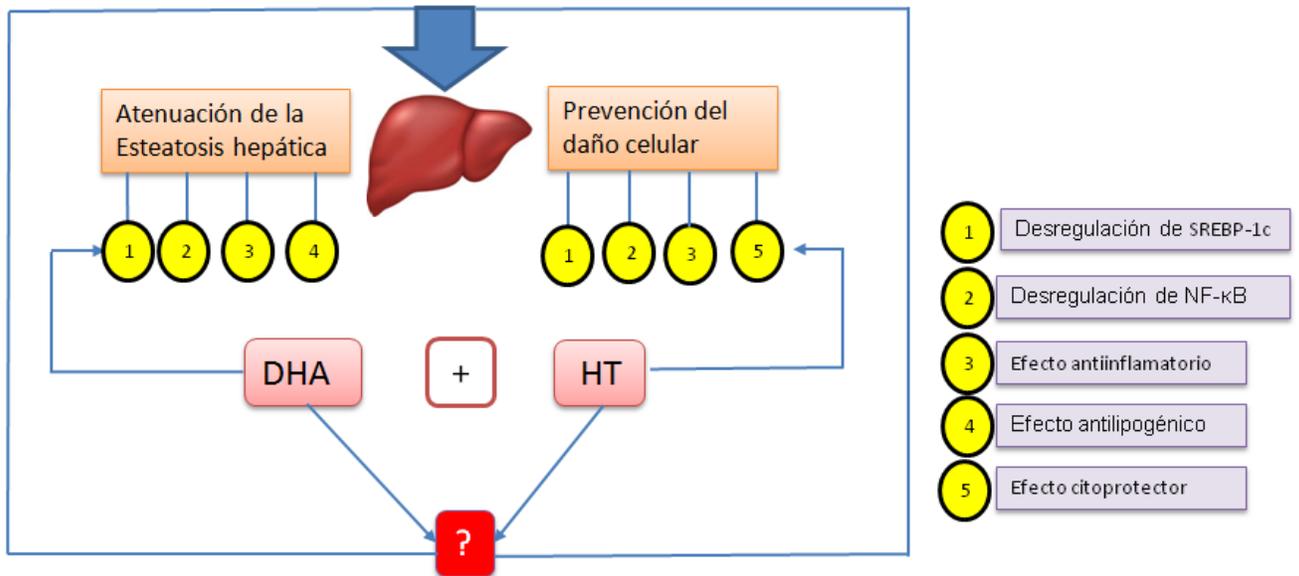


Figura 3. Se presenta el resumen de los efectos hepatoprotectores descritos en la literatura para DHA y HT en animales expuestos a HFD hasta la fecha, se representa además que el efecto conjunto de DHA + HT aún es desconocido.

En este contexto donde se conoce el efecto hepatoprotector del DHA y del HT, por separado, en ratones alimentados con HFD, surge como pregunta de investigación qué efecto tiene la suplementación conjunta de DHA + HT sobre la actividad del factor de transcripción lipogénico SREBP-1c y del factor de transcripción inflamatorio NF-κB en ratones con esteatosis hepática inducida por HFD, ya que, no existen datos al respecto aún en la literatura.

## **5. Hipótesis de trabajo y objetivos**

### **5.1 Hipótesis**

La suplementación dietaria con DHA + HT disminuye la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasa en ratón, inactivando los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y SREBP-1c.

### **5.2 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la suplementación dietaria con DHA+ HT sobre la actividad de NF- $\kappa$ B y SREBP-1c en ratones con esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasa.

### **5.3 Objetivos específicos**

1. Evaluar los cambios histológicos y el perfil de ácidos grasos hepáticos en ratones alimentados con HFD y suplementados con DHA más HT.
2. Evaluar el efecto de la suplementación combinada del DHA e HT sobre la actividad de unión al ADN de los factores de transcripción de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B en los ratones alimentados con HFD.
3. Evaluar el efecto de la suplementación de DHA junto con HT en los niveles hepáticos del ARNm de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B de los ratones alimentados con HFD.
4. Determinar el efecto de la intervención propuesta en los niveles hepáticos del ARNm de proteínas reguladas por SREBP-1c y NF- $\kappa$ B, específicamente FAS y ACA para SREBP-1c, y TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para NF- $\kappa$ B.

## **6. Metodología**

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

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).

### **6.2 Definición de la muestra**

Se utilizaron ratones machos C57BL/6J los cuales se obtuvieron del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Se trabajó con esta cepa de ratones dada su utilidad para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas por obesidad. El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el programa PRIMER versión 3.02 con un aumento esperado de la expresión génica del 50%, desviación residual de 25 y poder de 0,8. Se consideró un error alfa del 5%. El cálculo indicó que se necesitaban 9 animales por grupo en un total 8 grupos. De cada animal se obtuvieron muestras de sangre y tejidos, las que se utilizaron para más de un experimento.

### **6.3 Protocolo de intervención**

Se asignaron al azar a los animales en uno de los ocho grupos experimentales; dieta control (DC), DC+ DHA, DC + HT, DC + DHA + HT, Dieta alta en grasa (HFD), HFD+ DHA, HFD + HT, HFD + DHA + HT. Los animales fueron alojados en una habitación con temperatura controlada en un ciclo luz-oscuridad de 12 hr luz y 12 hr de oscuridad por 12 semanas. Al inicio de la intervención, los animales tenían 21 días de vida y un peso inicial de 12 a 14g. Los animales pertenecientes a cada grupo fueron asignados en jaulas separadas según grupo (n= 4 por jaula), con libre acceso a la dieta correspondiente, y fueron suplementados diariamente según su tratamiento específico vía oral. Las dietas fueron estandarizadas en aporte de micro y macronutrientes: *i*) Dieta de control (CD, Research Diet INC, USA #D12492; dieta de roedores con 10% de Kcal% de grasa total, equivalentes a 3,85 kcal/gr), *ii*) Dieta alta en grasa (HFD, Research Diet INC, USA #D12492; 60% de Kcal% de grasa total, equivalentes a 5,24 kcal/gr). El detalle de composición nutricional de la dieta en Anexo 1. La suplementación con DHA e HT fue administrada de forma oral, mediante técnica

manual con una jeringa en dosis de 50 mg/kg y 5mg/kg del peso corporal al día respectivamente. Los productos suministrados fueron; DHA Golden Omega-Chile, aceite rico en DHA obtenido a partir de aceite de anchoveta (70% DHA del total de AGPICL), el perfil de AG del aceite rico en DHA utilizado se presenta en el Anexo 2. El HT, aceite de la Vida 40%, DSM Nut Prod Chile S.A.-Chile, se obtuvo a partir de pulpa de aceitunas. 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. En la figura 4 se muestra un resumen de la intervención.

#### **6.4 Definición de variables**

##### Variables descriptivas

Tanto la dieta (variable interviniente) como la suplementación dietaria (variable independiente), fueron medidas por control de ingesta, siendo su indicador la ingesta.

El peso corporal, peso de hígado, ingesta de alimento e ingesta energética, fueron medidos mediante el peso en una balanza analítica, cuyo indicador fue expresado en gramos.

##### Variables dependientes

Tanto SREBP-1c, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , FAS y ACA (todos variables dependientes), fueron medidos por qPCR, siendo su indicador la expresión del mRNA hepático para cada caso. Mientras que el porcentaje de unión al ADN hepático fue medido por ELISA tanto para SREBP-1c como para NF- $\kappa$ B.

La esteatosis hepática fue medida mediante histología, siendo sus indicadores i) porcentaje de células con infiltración vesículas lipídicas y ii) presencia de esteatosis clasificada como ausente, leve, moderada o grave.

## **6.5 Procedimientos y técnicas**

### **Dieta y suplementación**

Las dietas fueron asignadas aleatoriamente y cada animal tuvo libre acceso a su dieta correspondiente. Si bien, las dietas se encuentran certificadas y estandarizadas con el mismo aporte de vitaminas y minerales, no son isocalóricas; DC aporta 3,85 kcal/gr, mientras que la HFD aporta 5,24 kcal/gr. La suplementación con DHA e HT fue administrada de forma oral en dosis de 50mg/kg y 5mg/kg de peso corporal al día respectivamente.

### **Evaluación de la esteatosis y marcadores de daño hepático**

1. Evaluación histológica: i) Evaluación cuantitativa: se utilizó microscopía óptica para analizar cortes de hígado previamente fijados en formaldehído (10%), incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina. Esta técnica fue realizada por un Tecnólogo Médico, quien determinó además si existía esteatosis macro o micro vesicular. ii) Evaluación cualitativa: realizado por un Médico Patólogo, quien, mediante un análisis ciego de los cortes histológicos, los clasificó de acuerdo a la presencia de inflamación, fibrosis y/o necrosis. Una vez obtenido el resultado, las muestras se clasificaron como ausentes, leves, moderadas o severas en función del grado de esteatosis e inflamación.

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

### **Cuantificación del contenido hepático de grasa total TG y AGL**

1. Grasa hepática total: se extrajo acorde al método de Bligh and Dyer (62) y cuantificación por gravimetría. Los valores fueron expresados como g/100 g de hígado.

2. TG hepáticos y AGL en el hígado: se utilizó un kit colorimétrico (#10010303, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA y #ab65341, Abcam, Cambridge, MA, USA; respectivamente). Los valores fueron expresados como mg/g de hígado y  $\mu\text{mol/g}$  de hígado, respectivamente.

## **Determinación del perfil de AG hepáticos**

1. Extracción y separación de lípidos tisulares: la extracción cuantitativa de los lípidos totales hepáticos se realizó de acuerdo con la técnica Bligh and Dyer (62). Las muestras fueron homogenizadas en ambiente frío y extraídas con cloroformo/metanol (2:1 v/v)
2. 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 (BF<sub>3</sub> 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.

## **Cuantificación de la actividad de unión al ADN de SREBP-1c y NF-κB al ADN hepático**

Se realizó mediante la implementación del kit ELISA específico para cada factor de transcripción SREBP-1c y NF-κB (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Los valores de unión para cada factor de transcripción se expresaron como % de unión respecto al control positivo Incluido en el kit. El ensayo de factor de transcripción específico de Cayman es un método no radiactivo y sensible para detectar actividad de unión al ADN del factor de transcripción específico. El factor de transcripción contenido en extractos nucleares y lisados de células completas se une a un elemento de respuesta de ADNds para el factor de transcripción estudiado (SREBP-1c o NF-κB) inmovilizado una placa de 96 pocillos. El factor de transcripción se detecta mediante la adición de un anticuerpo primario específico dirigido contra SREBP-1c o NF-κB. Finalmente, un anticuerpo secundario conjugado con HRP se usa para proporcionar una lectura colorimétrica sensible a 450 nm.

## **Cuantificación de la expresión hepática de mRNA de SREBP-1C, NF-κB y proteínas reguladas para cada uno de los genes; FAS, ACA para SREBP-1C y TNF-α e IL-1β para NF-KB**

La cuantificación de la expresión hepática del ARNm se realizó mediante la técnica de polimeraza en tiempo real (qPCR). Se utilizó el kit Brilliant II SYBR Verde pPCR Mastermix (Stratagene, Agilent Technologies) acoplado a un sistema Mx3000P qPCR (Stratagene, Agilent Technologies). Se utilizaron partidores específicos para cada uno de los genes:IL-1β (F: ACTCATTGTGGCTGTGGAGA, R: AGCCTGTAGTGCAGTTGTCT), SREBP-1c (F: TGCAGTCTGCTTTGGAACCT, R:AGCTGGTGCAGCTTATGGTA),FAS (F:

ACAAGCAACGTGAGCTCACT, R: TCAAGGTTTCAGGGTGCCATT); ACA (F: ACCAGGGCAAATGCATCAGT, R: TCGGAAAAGCATCGGGAAGT) y NF- $\kappa$ B (F: AGGAAGGCAAAGCGAATCCA. R: AGCGCCATGATTGCTAGACA) (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). Las muestras se amplificaron por triplicado. Los Ciclos fueron calculados automáticamente por el software pPCR de Agilent. Se utilizó como control interno el gen  $\beta$ -actina, ya que, ha demostrado ser un gen estable, expresarse en las células y tejidos hepáticos y que no muestra cambios en las condiciones experimentales.

## **6.6 Plan de análisis**

Los resultados fueron expresaron como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Se realizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre grupos, seguido de un test post-hoc Dunn's para la comparación entre grupos. Se determinó la significancia estadística con  $p < 0.05$ . Para estos análisis se utilizó el software Graph Pad Prism versión 6.0, San Diego, CA, USA.

Figura 4.

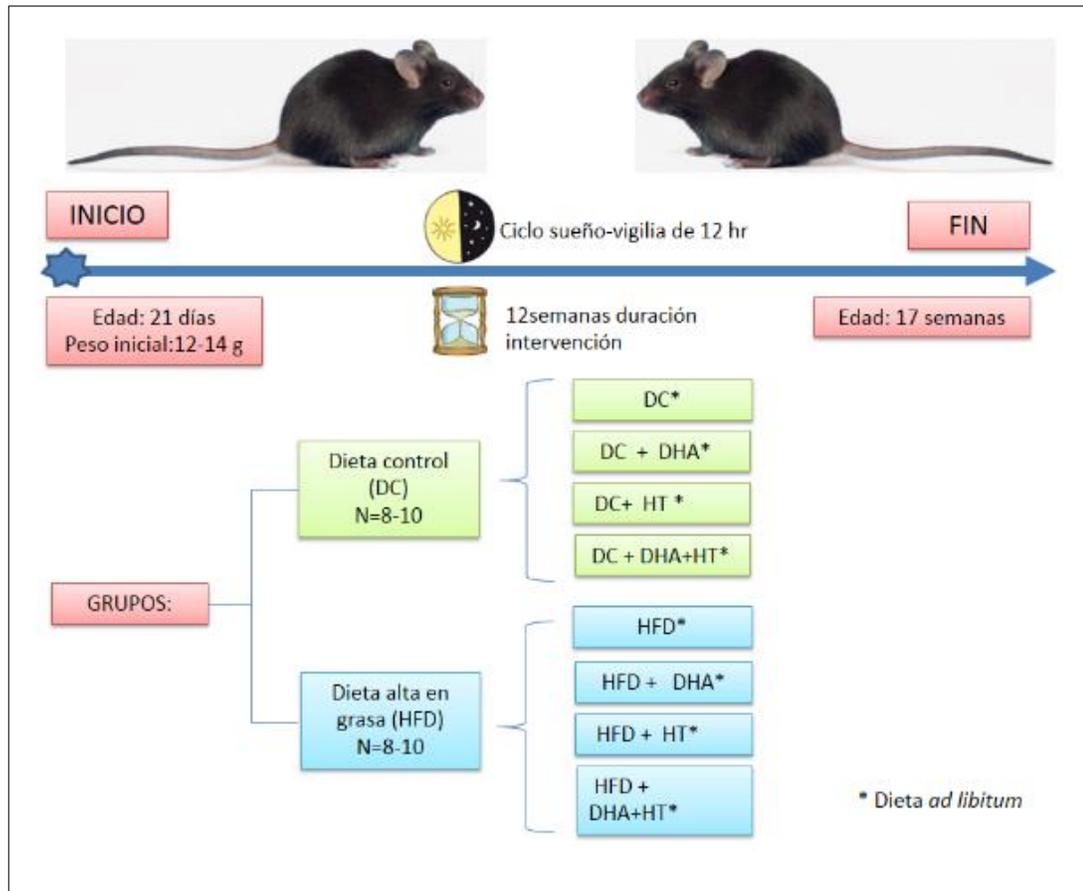


Figura 4. Resumen de la intervención. Se muestran las principales características de los animales, distribución de los grupos experimentales según las diferentes dietas, tiempo de intervención y ciclo sueño vigilia a los que fueron sometidos durante el periodo de la intervención.

## 7. Resultados

### 7.1 Efecto de la suplementación con DHA más HT en el peso corporal y peso del hígado en los ratones de los distintos grupos experimentales

Los resultados de las características generales de los animales se presentan en el anexo 3. El peso inicial de los ratones en los distintos grupos experimentales no presentó diferencias significativas, en oposición al peso corporal final donde sí se encontraron diferencias luego de 12 semanas de intervención. Específicamente, los ratones pertenecientes al grupo HFD (E) tuvieron un peso corporal significativamente mayor que el grupo control al final del tratamiento. Respecto al peso del hígado el grupo HFD + DHA + HT (H) presentó un peso significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el grupo HFD (E). En cuanto al tejido adiposo, los grupos HFD (E), HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) tuvieron un incremento significativamente mayor de tejido adiposo que los animales alimentados con dieta control con o sin suplementación.

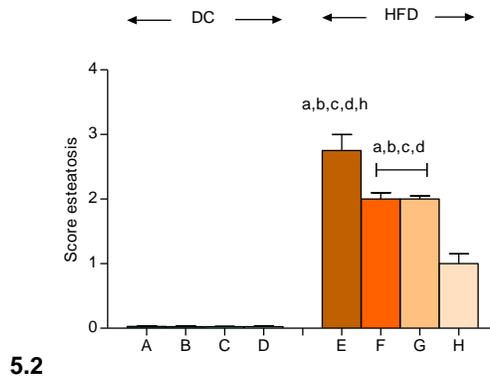
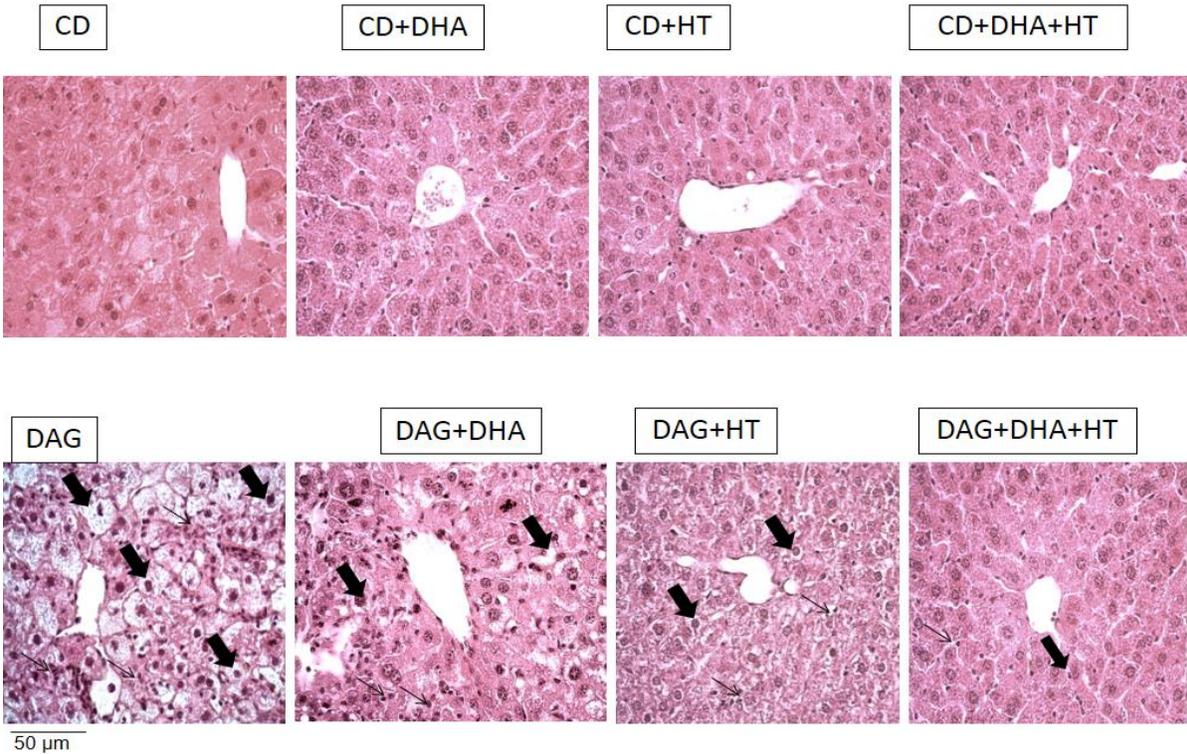
### 7.2 Efecto de la suplementación con DHA más HT en parámetros de esteatosis y daño hepático.

- Esteatosis hepática: El análisis de las imágenes histológicas representadas en la Figura 5.1 muestran que los ratones alimentados con DC, con y sin suplementación (A, B, C y D) presentan una histoarquitectura celular normal, sin presencia de focos de inflamación, necrosis o esteatosis hepática. En contraste, los cortes histológicos correspondientes al grupo alimentado con HFD (E) presentan un desplazamiento nuclear periférico, presencia de esteatosis hepática tanto micro como macrovesicular con focos de infiltración grasa superiores al 60% de los campos estudiados. Los grupos HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) presentaron, respectivamente, 40 y 50% de los campos estudiados con focos de esteatosis tanto micro como macrovesicular. Interesantemente, el grupo HFD + DHA + HT (H) presentó una disminución de los focos de esteatosis tanto micro como macrovesicular alcanzando sólo el 10 a 20% de los campos estudiados. El análisis del puntaje de esteatosis presente en la Figura 5.2, evidencia la infiltración grasa mayor al 66% en los animales del grupo HFD (E) mayor al 66%, entre el 33 y 66%, para los grupos HFD + DHA (F) y HFD+ HT (G) y menor del 33% en el grupo HFD + DHA + HT (H)

- Transaminasas hepáticas: Los niveles en suero de las enzimas AST y ALT (anexo 4) no presentaron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre ninguno de los grupos.

## Figura 5

5.1



5.2

**Figura 5.1** Histología hepática de ratones alimentados con dieta control y alta en grasa con o sin suplementación de DHA e HT; secciones representativas de tejido hepático; n= 8-10. Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina (40X de aumento). Flechas gruesas (→) indican esteatosis macrovesicular y flechas delgadas (→) indican indican esteatosis microvesicular. **Figura 5.2** Score de esteatosis. n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$

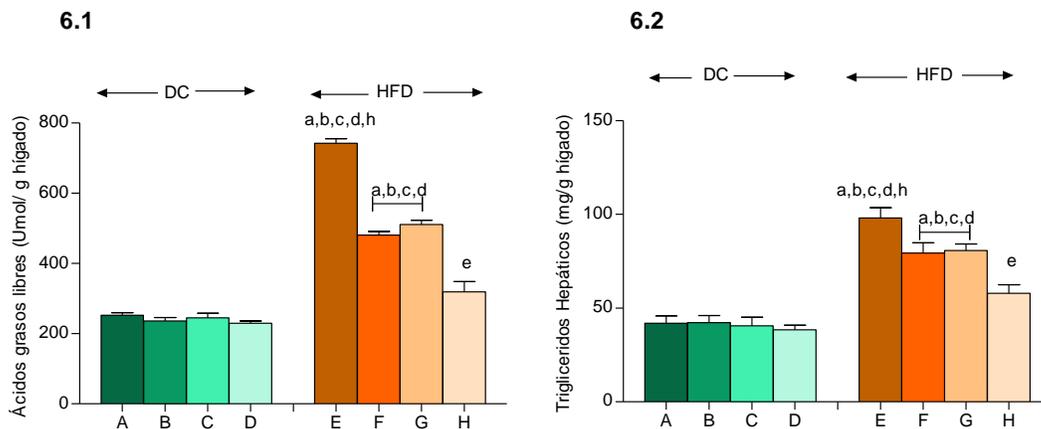
### **7.3. Efecto de la suplementación con DHA más HT en el contenido lipídico hepático.**

- Ácidos grasos libres (AGL) en el hígado: En la Figura 6.1 se observa el nivel de AGL para todos los grupos experimentales. No hubo diferencia entre los grupos controles con o sin suplementación. Los grupos HFD (E), HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) tuvieron un nivel significativamente mayor que los grupos con DC (A, B, C, D). Los animales alimentados con HFD y suplementados con DHA +HT tuvieron un menor nivel de AGL respecto al grupo HFD (E) ( $p < 0,05$ ).

- Triglicéridos (TG) hepáticos: En la Figura 6.2 se observan los niveles de TG hepáticos en todos los grupos experimentales. No hubo diferencia entre los grupos controles con o sin suplementación. Los grupos HFD (E), HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) tuvieron un nivel significativamente mayor que el grupo control ( $p < 0,05$ ). Los animales alimentados con HFD y suplementados con DHA +HT tuvieron un menor nivel de TG respecto al grupo HFD (E) ( $p < 0,05$ ).

- Perfil ácidos grasos: El perfil de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y los niveles de DHA, se encuentran en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas en la cuantificación de AGS entre grupos con DC (A, B, C, D). El grupo HFD + DHA (F) presentó mayor contenido de AGS que los grupos con DC. En el caso de los AG monoinsaturados (AGMI), no hubo diferencias significativas entre grupos. Respecto a los AGPI, el grupo HFD + DHA (F) presentó mayores niveles que los grupos con DC ( $p < 0,05$ ).

- Grasa total: En la Tabla 1, se presenta el contenido de ácidos grasos (AG) totales presentes en el hígado expresado en gramos de los ratones de todos los grupos intervenidos. El grupo HFD + DHA + HT (H) presentó incremento ( $p < 0,05$ ) respecto a todos los grupos controles (A, B, C, D).



**Figura 6.** Ácidos grasos libres (AGL) hepáticos ( $\mu\text{mol/g}$  hígado) (6.1) Triglicéridos (TG hepáticos ( $\text{mg/g}$  hígado) (6.2)  $n= 8-10$ . CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para coumparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p<0,05$ .

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos hepáticos de los diferentes grupos experimentales.

Principales AG	Ácidos grasos hepáticos (unidad)							
	CD (A)	CD + DHA (B)	CD + HT (C)	CD + DHA + HT (D)	HFD(E)	HFD + DHA (F)	HFD + HT (G)	HFD + DHA + HT (G)
AGS totales	0.45 (0.45-0.48)	0.5 (0.50-0.50)	0.44 (0.43-0.45)	0.42 (0.34-0.49)	0.56 (0.50-0.63) a	0.56 (0.54-0.59) a,c,d	0.54 (0.48-0.60)	0.44 (0.35-0.53)
C 16:0 ácido palmítico	0.30 (0.29-0.31)	0.35 (0.34-0.35)	0.31 (0.3-0.32)	0.32 (0.25-0.38)	0.44 (0.29-0.39)	0.35 (0.34-0.36)	0.33 (0.31-0.36)	0.30 (0.55-0.76)
AGMI totales	0.25 (0.24-0.27)	0.229 (0.22-0.23)	0.27 (0.25-0.28)	0.241 (0.19-0.28)	0.30 (0.3-0.36)	0,25 (0,24-0,26)	0,29 (0,28-0,29)	0,25 (0,25-0,26)
C18:2 n6 ácido linoleico (AL)	0.218 (0.20-0.23)	0.19 (0.19-0.21)	0.20 (0.17-0.29)	0.23 (0.17-0.29)	0.25 (0.21-0.28)	0.3 (0.28-0.31) b	0.29 (0.28-0.3)	0.20 (0.2-0.20)
C 18:3 n3 ácido linolénico (ALA)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.007 (0.00-0.00) b,c,d	0.006 (0.00-0.00) b,c,d	0.007 (0.00-0.00) b,c,d	0.002 (0.00-0.00)
C 20:4 n6 ARA	0.13 (0.13-0.13)	0.009 (0.09-0.10)	0.143 (0.13-0.14)	0.104 (0.89-0.11)	0.23 (0.22-0.24) b,d	0.16 (0.15-0.17)	0.23 (0.21-0.25) b,d	0.15 (0.14-0.16)
C 20:5 n3 EPA	0.025 (0.00-0.005)	0.18 (0.01-0.01) a	0.005 (0.0-0.0)	0.01 (0.00-0.21)	0.003 (0.002-0.004) a,b	0.01 (0.008-0.013)	0.002 (0.001-0.003) b	0.019 (0.017-0.021) e
C 22:6 n3 DHA	0.12 (0.10-0.13) d	0.24 (0.23-0.25) a,c	0.13 (0.12-0.14)	0.21 (0.18-0.24)	0.13 (0.12-0.13) b,h	0.21 (0.21-0.22)	0.13 (0.13-0.14) b,h	0.24 (0.24-0.25) a,e,g
AGPI	0.56 (0.49-0.51)	0.59 (0.57-0.61)	0.520 (0.49-0.55)	0.59 (0.48-0.70)	0.72 (0.67-0.76)	0.737 (0.72-0.75) a,c	0.71 (0.67-0.74)	0.63 (0.61-0.65)
AG totales	1.27 (1.19-1.24)	1.32 (1.30-1.34)	1.22 (1.17-1.28)	1.25 (1.02-1.48)	1.58 (1.39-1.77)	1.56 (1.50-1.61)	1.54 (1.44-1.63)	1.33 (1.26-1.51)

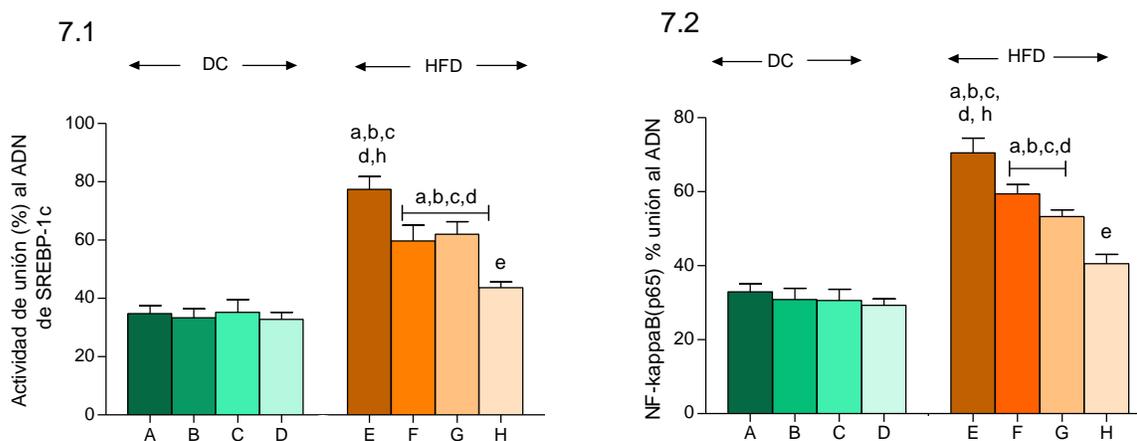
Perfil de ácidos grasos totales de Dietas de todos los grupos experimentales. n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$

#### 7.4 Efecto de la suplementación con DHA más HT en la actividad de unión al ADN de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B

- **SREBP-1c**: En la Figura 7.1 se presentan los resultados del porcentaje de actividad de unión al ADN de SREBP-1c para todos los grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con dieta control con o sin suplementación (A, B, C, D). Se observa un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el grupo HFD (E) respecto a todos los grupos con DC (A, B, C, D). El grupo HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) presentó un

incremento de significativo de la actividad de unión de SREBP-1c respecto a los grupos DC (A, B, C, D). El grupo alimentado con HFD + DHA+HT (H) disminuyó significativamente la actividad de unión al ADN de SREBP-1c respecto al grupo HFD (E) ( $p < 0,05$ ).

- **NF-κB**: En la Figura 7.2 se presentan los resultados del porcentaje de actividad de unión al ADN de NF-κB de todos los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dieta control (A, B, C, D). Se observa un incremento ( $p < 0,05$ ) en el grupo HFD (E) respecto a todos los grupos con DC (A, B, C, D). El grupo HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) presentó un incremento de significativo de la actividad de unión de NF-κB respecto a los grupos DC (A, B, C, D). El grupo alimentado con HFD + DHA+HT (H) redujo significativamente la actividad de unión al ADN de NF-κB respecto al grupo HFD (E) sin suplementación ( $p < 0,05$ ).



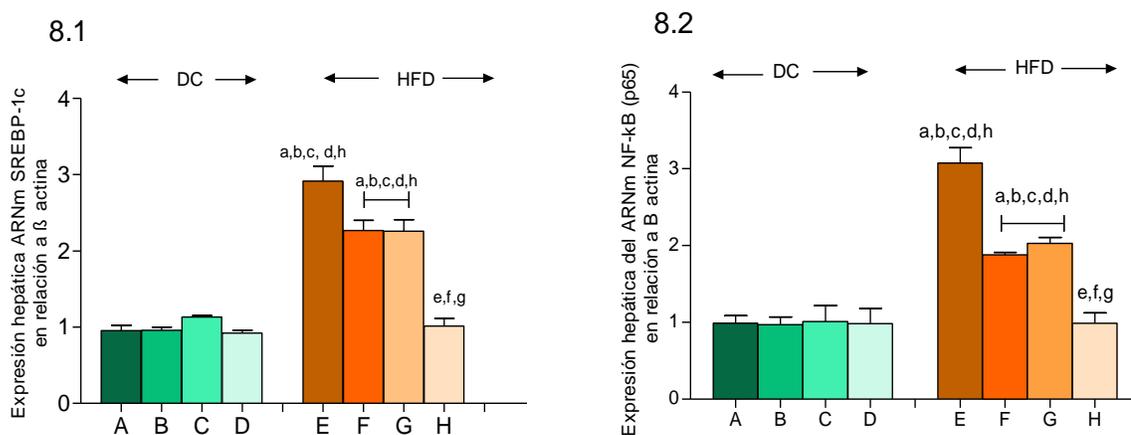
**Figura 7.** Porcentaje de actividad de unión al ADN de SREBP-1c (7.1) y Porcentaje de actividad de unión al ADN de NF-κB (7.2) en hígado. n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana ± rango intercuartilico. Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

### 7.5 Efecto de la suplementación con DHA más HT en los niveles de ARNm de SREBP-1c y NF-KB.

- **SREBP-1c**: La Figura 8.1 muestra los niveles hepáticos del ARNm de SREBP-1c en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con DC (A, B, C, D). Se observa un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el grupo HFD (E) respecto a todos los grupos con DC (A, B, C, D). Los grupos HFD + DHA (F) y HFD + HT (G) presentaron un aumento significativo del nivel de ARNm de SREBP-1c

respecto a todos los grupos con DC. El grupo HFD+ DHA+ HT (H) disminuyó significativamente el ARNm SREBP-1c respecto a los grupos HFD (E), HFD+ DHA (F) y HFD+ HT (G) ( $p < 0,05$ ) en todos los casos)

- **NF- $\kappa$ B**: La Figura 8.2 muestra los niveles hepáticos de ARNm de NF- $\kappa$ B en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con DC (A, B, C, D). El grupo expuesto a HFD sin suplementación presentó un mayor nivel de la expresión hepática del ARNm de NF- $\kappa$ B que todos los grupos controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ). El grupo HFD + HT (G) y el grupo HFD + DHA tuvieron un incremento significativo del nivel de ARNm de SREBP-1c respecto a todos los grupos con DC ( $p < 0,05$ ). El grupo HFD+ DHA+ HT (H) disminuyó significativamente el ARNm NF- $\kappa$ B respecto a los grupos HFD (E), HFD+ DHA (F) y HFD+ HT (G)  $p < 0,05$  en todos los casos.



**Figura 8.** Expresión hepática del ARNm de SREBP-1c (8.1) y NF- $\kappa$ B (8.2) en hígado. n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

### 7.6 Efecto de la suplementación con DHA más HT en la expresión génica de genes regulados por SREBP-1C; FASy ACA y regulados por NF- $\kappa$ B; IL1- $\beta$ y TNF- $\alpha$

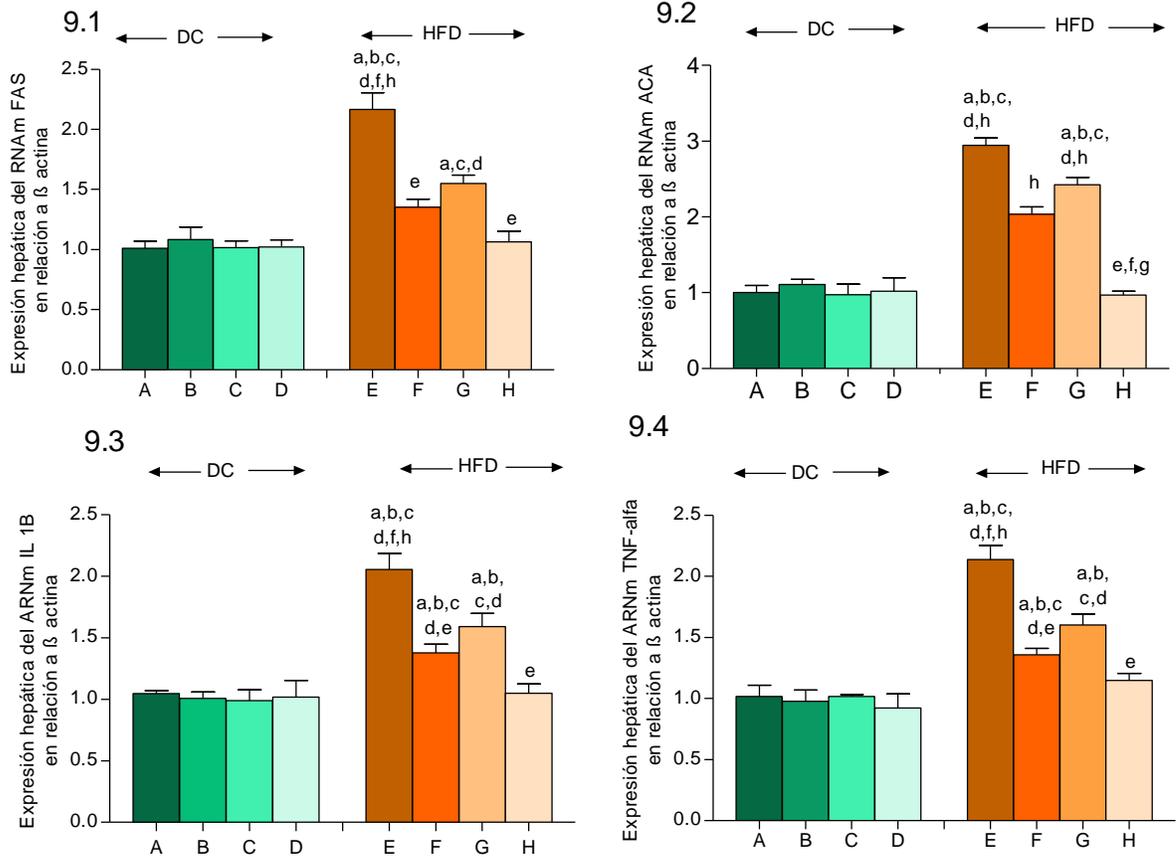
- **Ácido graso sintasa (FAS)**: En la Figura 9.1 se observan los niveles de ARNm de FAS en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dieta control. Tanto el grupo expuesto a HFD (E) como HFD + HT (G) presentaron mayor nivel de la expresión hepática del ARNm de FAS que todos los grupos

controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ). Tanto el grupo HFD + DHA (F) como el HFD + DHA + HT (H) disminuyeron significativamente el ARNm de FAS respecto al grupo HFD (E) ( $p < 0,05$ ).

- Acetil CoA Carboxilasa (ACA): En la Figura 9.2 se observan los niveles de ARNm de ACA en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dieta control. El grupo expuesto a HFD (E) sin suplementación presentó un mayor nivel de la expresión hepática del ARNm de ACA que todos los grupos controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ). El grupo HFD + HT (G) tuvo un aumento significativo respecto que todos los grupos controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ). La suplementación conjunta en HFD con DHA +HT disminuyó significativamente el ARNm de ACA respecto a HFD (E), HFD + DHA (F) y HFD + HT (G).

- Interleuquina 1 Beta (IL1- $\beta$ ): En la figura 9.3 se observan los niveles de ARNm de IL1- $\beta$  en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dieta control. El grupo expuesto a HFD (E) sin suplementación presentó un mayor nivel de la expresión hepática del ARNm de IL1- $\beta$  que todos los grupos controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ) y que el grupo HFD + DHA (F). El grupo HFD + HT (G) presentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) respecto a todos los grupos controles (A, B, C, D). La suplementación conjunta en HFD con DHA +HT disminuyó significativamente el ARNm de IL1- $\beta$  respecto a HFD (E).

- Factor de necrosis tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ): En la figura 9.4 se observan los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con dieta control. El grupo HFD expresó un nivel superior de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) respecto a todos que todos los grupos controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ) y que el grupo HFD + DHA (F). El grupo HFD + HT (G) presentó mayor nivel de la expresión hepática del ARNm de TNF- $\alpha$  que todos los grupos controles (A, B, C, D) ( $p < 0,05$ ). La suplementación conjunta en HFD con DHA +HT disminuyó significativamente el ARNm de TNF- $\alpha$  respecto a HFD (E).



**Figura 9.** Niveles hepáticos de ARNm FAS (9.1), ACA (9.2), IL1-β (9.3), TNF-α (9.4) n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B) ; CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana ± rango intercuartílico. Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn´s para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa p<0,05

## 8. Discusión

### 8.1 Efecto de la suplementación con HT y DHA en características generales y dietarias de los grupos experimentales

Los animales alimentados con HFD tuvieron tanto un peso corporal final y una ganancia de tejido adiposo mayor (Anexo 3) que aquellos alimentados con DC, similar a lo reportado en estudios anteriores (7,44,45). En este estudio si bien hubo una disminución en el peso corporal final de los ratones alimentados con HFD + DHA, HFD + HT y HFD + DHA + HT, ésta no fue significativa respecto al grupo solo con HFD. Esto es contrario a lo reportado por Natakani y cols. 2003 (47), quienes realizaron un estudio en ratones C57BL/6J alimentados con HFD y suplementados con diferentes dosis de aceite de pescado (7% EPA y 24% DHA) y de aceite de cártamo (46% AO y 45% AL), donde observaron una relación lineal inversa entre dosis de aceite de pescado y disminución de peso corporal. Interesantemente en este estudio, el análisis de ingesta (anexo 5) evidencia que el grupo alimentado solo con HFD presentó una menor ingesta que los demás grupos HFD con suplementación (HFD + DHA, HFD + HT o HFD + DHA + HT), estos resultados son concordantes con Chida D, y cols., 2006 (47) y Valenzuela y cols., 2017 (44) donde se asocia el incremento de citoquinas pro inflamatorias TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$  (Figura 9.3 y 9.4), con un efecto anorexígeno. Esta manifestación de disminución del apetito fue reportada por Plata-Salamán y cols., 1988 (48) mediante una inyección intracerebrovascular de IL1- $\beta$ , provocando la supresión del comportamiento de alimentación en ratas. Una de las vías implicadas puede ser que IL1- $\beta$  y TNF- $\alpha$  tienen un efecto a nivel central provocando la disminución de apetito (49), estas citoquinas pueden modular las actividades gastrointestinales de motilidad y vaciado gástrico y también pueden inducir la liberación de mediadores químicos implicados en la alimentación, tales como las hormonas colesistoquinina, glucagón, insulina y leptina (50). En este estudio el peso del tejido adiposo fue significativamente mayor en HFD, HFD + DHA y HFD + HT que en DC, sin embargo, el grupo HFD + DHA + HT tuvo una disminución significativa respecto al grupo HFD, resultados en línea con lo reportado por Valenzuela y cols., 2017 (44) donde atribuyen el efecto antilipogénico de la suplementación conjunta de DHA + HT a una activación de PPAR- $\alpha$ , lo que promueve la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (44) y disminuye a SREBP-1c, disminuyendo por lo tanto, la activación de genes prolipogénicos (47,51,52). En este estudio, el peso del hígado no tuvo cambios entre el grupo DC versus HFD, este hallazgo

difiere de otros estudios en que los ratones alimentados con HFD tienen un peso de hígado mayor que el grupo control o que los animales con HFD suplementados con AGPICL n-3 (53).

## **8.2 Efecto de la suplementación con HT y DHA sobre parámetros de esteatosis y daño hepático**

En línea con resultados anteriores, en este estudio, los animales alimentados con HFD produjeron esteatosis hepática (53-55). Los grupos suplementados con DHA + HT exhibieron una mayor protección en comparación con los grupos de HFD solo con DHA o solo con HT, con una reducción significativa en la esteatosis hepática concordante con una disminución de los TG hepáticos y AGL. Este resultado es similar a lo reportado por Valenzuela y cols., 2016 (56) donde informaron que la suplementación conjunta con aceite de pescado 400 mg/kg/día (200mg EPA+ 200 mg DHA) y AOEV (100 mg/kg/día), en ratones alimentados con HFD por 12 semanas, evitó el desarrollo de esteatosis hepática (54). Respecto al mecanismo implicado en el desarrollo de esteatosis hepática inducida por la HFD, se ha propuesto que el estrés de retículo endoplasmático juega un rol fundamental tanto en la patogenia como en la progresión de la EHGA a etapas más severas (56), además, las vías de señalización activadas por el estrés de retículo se han relacionado con lipotoxicidad, IR, inflamación y muerte celular apoptótica (57). Se ha reconocido al retículo endoplasmático (RE) como un punto de control de calidad, donde solo las proteínas correctamente plegadas pueden salir del RE y pasar por la vía secretora, por lo tanto, cualquier evento que altere la capacidad de plegamiento del RE, como la síntesis excesiva de proteínas, la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente, la depleción de calcio en el RE o un cambio en el estado redox inducirá una reacción fisiológica a proteínas mal plegadas conocida como UPR (del inglés *unfolded protein response*) (57). Al respecto, Bobrovnikova-Marjon et al., 2008 (58) informaron que la vía de señalización de la UPR tiene un efecto prolipogénico, mediante la activación de la vía PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 aumentando la expresión de las enzimas lipogénicas como la FAS, ATP-citrato liasa y SCoAD-1 y disminución de la actividad de PPAR- $\alpha$  por activación de PERK (del inglés *Proteinkinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*). En línea con lo anterior, Oyadomari S et al., 2008 (59) relacionaron la vía de señalización de la UPR con aumento de la expresión del receptor adipogénico del receptor nuclear proliferador de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) por activación del factor de iniciación de traducción en eucariontes 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), además se ha relacionado la vía UPR con un incremento de genes PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, ACA y FAS en el hepatocito

producto de la activación del factor de transcripción 4 (ATF4) (60). El efecto antiesteatótico producido por la suplementación conjunta de DHA + HT, podría estar mediado por una sinergia en el efecto antilipogénico de ambos en la activación del factor de transcripción PPAR- $\alpha$  (40) y la disminución de la actividad del factor SREBP-1c (37). Al respecto, Valenzuela R y cols., 2016 (54), informaron que la suplementación conjunta de DHA + HT tuvo una reducción mayor de la esteatosis hepática, TG y AGL en el hígado respecto a los animales con HFD solo con DHA o HT por separado (45). Ahagi N y cols., 2002 (28) informaron que ratones *ob/ob* knockout para SREBP-1c no desarrollaron esteatosis masiva característica de los ratones *ob/ob*. Por lo tanto, SREBP-1c es necesario y suficiente para el desarrollo de la esteatosis inducida por HFD. En este sentido el rol del DHA sobre la inhibición de SREBP-1c es fundamental; Takeuchi Y y cols., 2010 (39) usaron ensayos con reportero in vivo de la actividad de transcripción de SREBPs, donde mostraron que el mecanismo primario para la supresión mediada por AGPCL está en el nivel de procesamiento proteolítico, disminuyendo la transcripción del ARNm de SREBP-1c. En línea con los resultados de este estudio donde los animales con HFD+ DHA + HT lograron disminuir significativamente los niveles de AGL (figura 3,1) y TG (figura 3.2) respecto a HFD, normalizando el valor respecto a la DC. Al respecto, SREBP-1c puede activar la expresión de más de treinta genes que regulan enzimas implicadas en la síntesis de AG y TG, como la FAS, ACA, SCoaD-1 (21-23), por lo tanto, su inhibición tiene directo efecto sobre la síntesis de AG y esterificación a TG. Tanto HT como DHA tienen un efecto antilipogénico dado por la promoción de la  $\beta$ -oxidación de AG mediante del incremento de la actividad de PPAR- $\alpha$  (39,40,44). Este último, aumenta la expresión de Cyp4a (del inglés *cytochrome P450-4*), un citocromo fuente de EROs, y mejora el recambio de lípidos hepáticos, específicamente elimina los AG como sustrato para la peroxidación lipídica, disminuye el estrés de retículo y es lo suficientemente potente como para prevenir el desarrollo de esteatohepatitis (61). Otro mecanismo importante de producción de esteatosis por HFD tiene relación con el EO. La HFD proporciona exceso de AGS, especialmente, ácido palmítico, una condición que desencadena la oxidación mitocondrial AG y la producción de especies de oxígeno reactivo (EROs), en un proceso conocido como lipotoxicidad (62, 63). El exceso de AGS libres en el tejido hepático refleja un importante desequilibrio en el estado redox de origen nutricional que también es observado en sujetos obesos con esteatosis hepática (14). En este trabajo no se midió el estado de EO ni producción de EROs, sin embargo, Rincón-Cervera y cols. 2016 (45), informaron que la HFD indujo estrés oxidativo hepático, disminución significativa en el contenido de equivalentes totales de GSH (del

inglés *Reduced glutathione*) y la relación GSH / GSSG (del inglés *Glutathione disulfide*), junto con mejoría de los indicadores pro-oxidantes, carbonilos proteicos, F2-isoprostanos, TBAR (del inglés *Thiobarbituric acid reactive substances*) y reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes en ratones machos C57 BL / 6J que fueron alimentados con una HFD durante 12 semanas (60% de grasa, 20% de proteína, 20% de carbohidratos). Como un mecanismo patógeno central, el EO puede desencadenar alteraciones secundarias que incluyen (i) agotamiento de AGPICL n-3, una característica que está asociada con una mayor concentración de peroxidación lipídica de estos AG y / o menor síntesis de AGPICL n-3 debido a la reducción en la actividad de  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas (11, 45); (ii) desarrollo del estrés del RE (61); y (iii) IR que son relevantes en el desarrollo de la esteatosis hepática (11). EL HT, por su parte, ha mostrado disminuir el EO. Al respecto, Covas y cols. 2006 (64) realizaron un estudio clínico controlado randomizado en humanos con 200 voluntarios hombres adultos aparentemente sanos, a los que 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. Rincón-Cervera et al., 2017 (45) reportaron que el efecto neto de la suplementación conjunta EPA + HT versus el de la suplementación solo con HT no presentó diferencias significativas sobre los parámetros de estrés oxidativo en el hígado de ratones sometidos a HFD por 12 semanas, otorgando el efecto antioxidante al HT. El HT además mejoró la actividad de las  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas en ratones alimentados con HFD, este podría ser el fundamento de la sinergia de la suplementación conjunta de DHA + HT en el efecto antilipogénico.

Respecto a las transaminasas, en este estudio no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales para ninguna de las dos transaminasas (AST, ALT (anexo 4), esto puede deberse a que los niveles séricos de 46 transaminasas son poco sensibles para el diagnóstico de EHNA en 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 (54), no constituyendo un examen para un diagnóstico temprano de esteatosis hepática.

### **8.3 Efecto de la suplementación dietaria con HT y DHA sobre el perfil hepático de AG**

En este estudio el grupo HFD + DHA + HT tuvo un contenido hepático de DHA significativamente mayor en comparación al grupo HFD sin suplementación. Al respecto, Tanakay cols., 2008 (65), evaluó la eficacia y seguridad de EPA altamente purificado (2700 mg/día) durante 12 meses en 23 pacientes con EHGNA 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 ARA. En este estudio hubo un aumento de la concentración de ARA en HFD respecto a la DC ( $p < 0,05$ ). Estos resultados podrían deberse a que la HFD aporta mayor cantidad de AL que ALA, estos AG en el organismo van a producir AGPICL n-6 (ARA) y n-3 (EPA y DHA) respectivamente, a través de una serie de reacciones en el RE que contemplan desaturaciones, elongaciones y retroconversión metabólica a través de  $\beta$ -oxidación (acortamiento de la cadena hidrocarbonada) en los peroxisomas (13). En este proceso las enzimas  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasa son fundamentales (7), particularmente en pacientes con EHGNA (11); se ha visto que tienen además una actividad disminuida, por lo que se produce una competencia entre los AG y al haber mayor cantidad de AL en la dieta, éste tendería a tener una mayor conversión hacia sus derivados como ARA (13,15).

### **8.4 Efecto de la suplementación con DHA y HT sobre parámetros asociados al metabolismo lipídico**

En este estudio la HFD indujo el incremento de la actividad de SREBP-1c (figura 7.1), de la expresión de SREBP-1c (figura 8.1) y se sus genes regulados FAS y ACC (figura 9.1 y 9.2) significativamente respecto a la DC ( $p < 0,05$  para todos los casos). Los resultados muestran una correlación positiva tanto entre la actividad de unión al ADN de SREBP-1c y nivel hepático de ARNm de FAS ( $p=0,94$  y  $r^2=0,88$ ) como del nivel hepático de ARNm de SREBP-1c y ARNm de FAS ( $p=0,93$  y  $r^2=0,87$ ) (anexo 6.1 y 6.2 respectivamente). El estado prolipogénico inducido en el hígado por la HFD puede ser contribuido por varios factores, entre ellos: *i*) regulación al alza de la expresión del ARNm y unión a ADN de SREBP-1c dependiente del ácido palmítico (66), *ii*) disminución en la actividad de las desaturasas  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6, evento que se asocia con inducción de EO, producción de radicales libres y carbonilación de proteínas que desencadenen un mal plegamiento de proteínas conduciendo a estrés de RE e inducción de la escisión proteolítica de SREBP-1c (66) y *iii*) resistencia a la insulina que desencadena la lipólisis periférica con optimización de flujos

de AG y glicerol al hígado aumentando la lipogénesis (8). Existe por lo tanto una interrelación entre estrés oxidativo, el ER y la IR concomitante con trastorno en la síntesis y disponibilidad de AGPICL n-3 en el hígado y tejidos extrahepáticos y una regulación aumentada de SREBP-1c con el desarrollo de esteatosis hepática. A nivel molecular, la suplementación conjunta de HFD + DHA + HT fue capaz de disminuir significativamente tanto la actividad de unión al ADN (figura 7.1) como la expresión del ARNm de SREBP-1c (figura 8.1) y sus genes regulados FAS (figura 9.1) y ACA (figura 9.2) respecto a los ratones con HFD ( $p < 0,05$  para todos los casos), normalizando los valores del ARNm de SREBP-1c y sus proteínas reguladas respecto a la DC. Estos resultados evidencian que el efecto antilipogénico podría deberse tanto a una acción a nivel de la proteína madura activa SREBP-1c como en el precursor. Al respecto, Hyoun-Ju Kim y cols., 1999 (67) informaron que una dieta rica en aceite de pescado (60% aceite de pescado con 7% EPA y 24% DHA, 14% de carbohidratos, 24% proteínas) disminuyó el nivel de ARNm de SREBP-1c en el hígado en un 86% en ratones respecto a los ratones alimentados con aceite de cártamo (60% aceite de cártamo, 14% de carbohidratos, 24% proteínas), atribuyendo la acción del aceite de pescado a una disminución de la forma madura de SREBP al disminuir la expresión de ARNm de SREBP-1c. Takeuchi Y y cols., 2010 (39) usando ensayos reporteros in vivo, mostraron que el mecanismo primario para la supresión de SREBP-1c dada por los AGPICL n-3 ocurre a nivel del procesamiento proteolítico y que esta supresión a su vez disminuye la transcripción de ARNm a través de la reducción de la unión de SREBP-1 al elemento de unión SREBP en el promotor, impidiendo la maduración. Dossiy cols., 2014 (40) sometieron a ratones C57BL / 6J machos a DC o HFD por 12 semanas, luego cambiaron la HFD a DC + AGPICL n-3 con una dieta normocalórica por 8 semanas más, la suplementación de AGPICL n-3 suprimió la mejora inducida por HFD en las relaciones hepáticas SREBP-1c / PPAR- $\alpha$ , sugiriendo un cambio en el estado metabólico del hígado desde un estado lipogénico a uno que favorece la oxidación de ácidos grasos. En este estudio, la suplementación conjunta de HFD + DHA + HT produjo una disminución en los niveles de TG y AGL (figura 3.1 y 3.2) concomitante con la reducción del ARNm de FAS y ACA, enzimas implicadas en la síntesis de AG. Si bien en este estudio no se midió la actividad de PPAR- $\alpha$ , el efecto de la suplementación con DHA + HT sobre su actividad se encuentra documentado (39, 40), al respecto, Hernández-Rodas y cols. 2017 (66), informaron que la suplementación durante 12 semanas con DHA (50 mg / kg / día) + AOEV (50 mg / kg / día) previno la disminución de la actividad y expresión del ARNm de PPAR- $\alpha$ , inducido por la HFD, junto con una disminución en la actividad de unión y expresión del

ARNm de SREBP-1c y sus proteínas reguladas FAS y ACA. Bajo estas condiciones, la recuperación de los niveles de ACPICL n-3 por DHA + HT estimulan la  $\beta$ -oxidación de AG mitocondrial y peroxisomal a través de la activación de PPAR- $\alpha$ , aumentando la Acil-CoA oxidasa (ACOX) y la transcripción de la Carnitina palmitoil transferasa I (CPT-1), junto con una regulación negativa de PPAR- $\alpha$  sobre SREBP-1c que se encuentra aumentado en HFD, lo que explicaría la disminución de los AGL y TG y por ende el efecto antilipogénico (figura 3.1 y 3.2). Los efectos hepatoprotectores del HT también están relacionados con la estimulación de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal hepática de AG (68) e inhibición de la síntesis de TG (68), promoviendo la salida de TG del hígado, atenuando la resistencia a la insulina y disminuyendo el flujo de AG del tejido adiposo al hígado (69) (imagen 5).

### **8.5 Efecto de la suplementación con HT y DHA sobre parámetros inflamatorios**

En relación con el estado proinflamatorio, los ratones sometidos a HFD + DHA + HT normalizaron la actividad de unión a ADN de NF- $\kappa$ B, y la expresión hepática de NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  respecto al grupo DC. Además, hubo una correlación positiva tanto entre la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B y nivel hepático de ARNm de TNF- $\alpha$  ( $p=0,89$  y  $r^2=0,78$ ) como del nivel hepático de ARNm de NF- $\kappa$ B y ARNm de TNF- $\alpha$  ( $p=0,87$  y  $r^2=0,76$ ) (anexo 6.3 y 6.4 respectivamente). Específicamente, la HFD posee un alto contenido de AGS, especialmente, ácido palmítico, el consumo constante de este ácido graso desencadena la oxidación mitocondrial de AG, aumento de la producción de especies de oxígeno reactivo (ERO), activación de NF- $\kappa$ B y lipotoxicidad (40-42). Si bien, en este estudio, no se evaluaron parámetros de estrés oxidativo, Rincón-Cervera y cols., 2016 (45) informaron que la HFD indujo una disminución significativa en el contenido de equivalentes totales de GSH y la relación GSH / GSSG, con niveles mejorados de los indicadores pro-oxidantes, carbonilos proteicos, F2- isoprostanos, y TBAR, y reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes. Hernández-Rodas et al. 2017 (66) informaron que la suplementación conjunta de HFD + AOEV fue capaz de disminuir significativamente parámetros relacionados con el estrés oxidativo en animales alimentados con HFD, además de normalizar la capacidad de unión ADN de Nrf2, el nivel de ARNm de GST y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutasa) y GSH, además de mejorar la actividad de las  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas. Se ha documentado que el efecto antiinflamatorio de los AGPICL (EPA y DHA), tiene relación con la formación de un complejo no funcional entre PPAR- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B, evitando la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación

de NF-κB (66). Además, el DHA es precursor de mediadores antiinflamatorios tales como las resolvinas de la serie D (36) y protectinas que son sintetizadas a partir del 17S-hidroxi-DHA (producto intermedio de DHA) (36), los cuales pueden inhibir las vías de señalización inflamatorias. El resumen de las vías implicadas en el efecto hepatoprotector de la suplementación conjunta de DHA + HT en HFD se encuentran en la figura 10. El DHA también es un agonista de FFA4 (del inglés *Free fattyacid receptor-4*), reduciendo la inflamación inducida por los macrófagos a través de la inhibición tanto del ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor containing pyrin domain 3 inflammasome*) como de la activación de NF-κB (70, 71). El HT por su parte, disminuye la expresión de genes proinflamatorios mediante la regulación negativa de NF-κB (45). Se ha demostrado además que el HT inhibe la vía PERK, evitando el estrés del RE la autofagia y la respuesta lipogénica (46).

**Figura 10.**

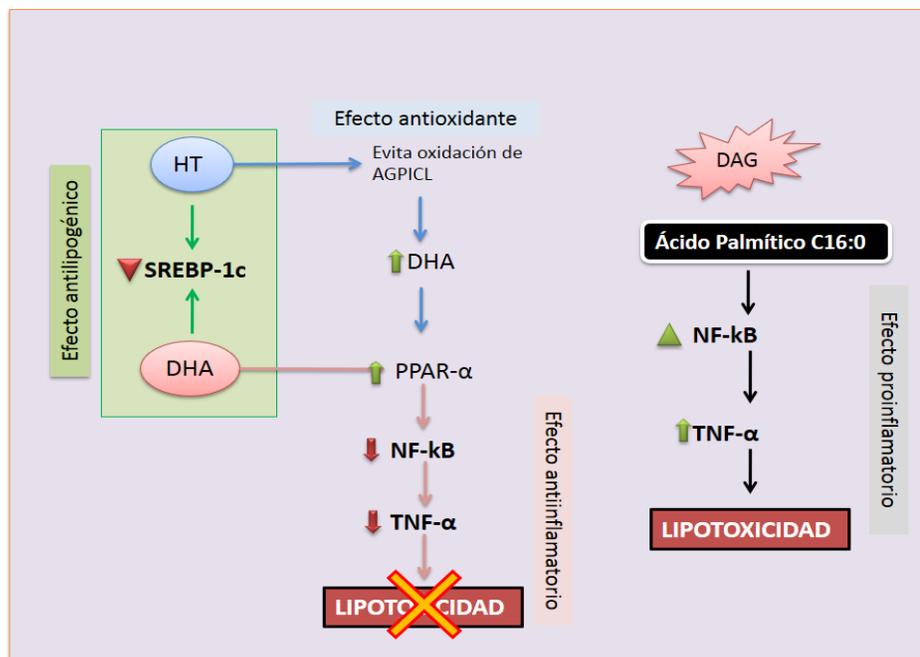


Figura 10. Resumen de vías metabólicas implicadas en efecto hepatoprotector de la suplementación conjunta de DAG+ HT en HFD. Donde el efecto atilipogénico está dado tanto por HT como por DHA al inactivar a SREBP-1c. El efecto antiinflamatorio está dado a dos niveles, el HT ejerce un efecto antioxidante que aumenta la concentración de DHA y el DHA por su parte que activa a PPAR-α, lo que genera una inactivación de NF-κB y sus mediadores proinflamatorios TNF-α. El efecto proinflamatorio está dado en HFD por el consumo constante de ácido palmítico que desencadena oxidación mitocondrial de AG, aumento de la producción de especies de oxígeno reactivo (EROs), activación de NF-κB y lipotoxicidad.

## 9. Conclusión

En conclusión, la suplementación con DHA + HT atenuó los trastornos metabólicos hepáticos, mitigando los efectos prolipogénicos y proinflamatorios inducidos por la HFD; la desregulación del metabolismo de los AGPICL n-3, el aumento de la expresión de SREBP-1c y NF- $\kappa$ B y disminución de PPAR-  $\alpha$ , todos factores que conducen al desarrollo de esteatosis hepática. Identificamos un sinergismo en la acción antilipogénica y antiinflamatoria del DHA y HT sobre SREBP-1c, NF- $\kappa$ B y sus genes diana, FAS y ACA para SREBP-1c e IL-1 $\beta$  y TNF para NF- $\kappa$ B.

Este trabajo constituye un innovador aporte al conocimiento respecto al comportamiento de factores de transcripción implicados en la lipogénesis e inflamación; SREBP-1c y NF- $\kappa$ B en HFD y como la suplementación con DHA y HT puede modular su actividad, normalizando a valores de ratones con dieta control. Se sugiere realizar estudios en humanos con dieta occidental con suplementaciones de DHA y HT en cantidades equivalentes. El cálculo y discusión de la dosis de suplementación de HT y DHA extrapolada a seres humanos se discute en el anexo 7.

## Referencias

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine J.E, Diehl A.M, Brunt E.M., Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association Hepatology 2012;(55): 2005–2023.
2. Sanjaya K, Satapathy, Arun J. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Semin Liver Dis 2015;35(03):221-235.
3. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. J Hepatol 2012; 56:1384–1391.
4. Ratziu V, et al. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL. special conference. J Hepatol 2010; 53:372-84
5. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, J Hepatol 2012; 55: 2005–2023
6. Hernandez-Rodas MC, Valenzuela R, Videla LA Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci. 2015;16(10):25168-98.
7. Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. Nutrients 2013;5(8):2901-23
8. Valenzuela R, Videla LA. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. Food Funct 2011; 2:644-8.
9. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown M S, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. 2000; 14: 2819–2830

10. Videla LA, Liver NF- $\kappa$ B and AP-1 activation and PPAR- $\alpha$  expression are negatively correlated in obese patients: pro-inflammatory implications, *Clin. Nutr.*, 2010, 29, 687-688
11. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik, J, Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free RadicBiol Med.* 2004, 37, 1499-1507.
12. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaiss et al., Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature.* 2012, 482, 179–8
13. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1343-51.
14. Videla LA, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106:261-8.
15. Chen Z, Yu R, Xiong Y, Du F, Zhu S A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease *Lipids Health Dis.* 2017 Oct 16;16(1):203. doi: 10.1186/s12944-017-0572-9
16. Aronis A, et al. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free RadicBiol Med* 2005; 38:1221-30.
17. Berlanga A, Guiu-jurado E. Porras JA, Aguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 2014;(7):221-239
18. Horton JD et al. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109:1125-31.
19. Kim, J. B., G. D. Spotts, Y. D. Halvorsen, H. M. Shih, T. Ellenberger, H. C. Towle, and B. M. Spiegelman. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15: 2582–2588
20. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Hasty AH, Okazaki et cols. Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:31078–31085.

21. Talukdar S, Hillgartner FB. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- $\alpha$  gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 2451–2461
- 22 Nelson DL, Cox MM, principios de Bioquímica de Lehninger 5 ed. Artmed 2011. Chu K,
23. Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM. 2006. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* 26: 6786–6798
24. Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., and Fofelle, Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *F.Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:12737–12742
25. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 3155–3160
26. Li, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107, 3441–3446
27. Haas, J.T., Miao, J., Chanda, D., Wang, Y., Zhao, E., Haas, M.E., Hirschey, M., Vaitheesvaran, B., Farese, R.V., Jr., Kurland, I.J., et al. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metab.* 2012; 15, 873–884
28. Ahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *J Biol Chem* 277 :19353 –19357, 2002
29. Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 18:6853–6866,
30. Karin, M. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature*, 2006, 441, 431-436.].

31. Videla LA, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli P, Haim D, Santibañez C, et al. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(5):973-9.
32. Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signaling. *Semin Immunol* 2000; 12:85–98
- 33 Karin M, Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol* 2002; 3:20–26
34. Glosli H, Gudbrandsen OA, Mullen AJ, et al. Down-regulated of NF-kappa B signalling by microbial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(4):291–306.]
35. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 2992- 3002
36. Simopoulos A, Di Nicolantonio. The importance of a balanced  $\omega$ -6 to  $\omega$ -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Heart* 2016;3(2): e000385
37. Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.* 274: 25892–25898
38. Hannah, V. C., J. Ou, A. Luong, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate SREBP isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* 276: 4365–4372,
39. Takeuchi, Y. *et al.* Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J. Biol. Chem.* 2000; 285, 11681–11691
40. Dossi G, Tapia G S, Espinosa A, Videla L. Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR- $\alpha$  and SREBP-1c. *J. Nutr Biochem* 2014; 25:977–84.
41. Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2015; 62, 720–733

42. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent antiinflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010;142: 687–698.
43. Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=39458>
44. Valenzuela, R; Illesca, P; Echeverria, F; Espinosa, A; RincónCervera, MÁ; Ortiz, M; Hernandez-Rodas, MC; Valenzuela, A; Videla, LA. Molecular adaptations underlying the beneficial effects of hydroxytyrosol in the pathogenic alterations induced by a highfat diet in mouse liver: PPAR- and Nrf2 activation, and NF-B down-regulation. *Food. Funct.* 2017, 8, 1526-1537
45. Rincón-Cervera, M.A.; Valenzuela, R.; Hernandez-Rodas, M.C.; Marambio, M.; Espinosa, A.; Mayer, S.; Romero, N.; Barrera, C.; Valenzuela, A.; Videla, L.A. Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of desaturation capacity in mice fed a high-fat diet: Effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues. *Nutrition*, 2016, 32, 1254-1267.
46. Giordano, E.; Davalos, A.; Nicod, N.; Visioli, F. Hydroxytyrosol attenuated tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cells. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 2014, 58, 954-962
47. Chida D, Osaka T, Hashimoto O, Iwakura Y. Combined Interleukin-6 and Interleukin-1 Deficiency Causes Obesity in Young Mice. *Diabetes*. 2006; 55:971–7.
- KANRA, G.Y., OZEN, H. & KARA, A. (2006) Infection and anorexia. *Turkish Journal of Pediatrics*, 48: 279–287
48. PLATA-SALAMÁN, C.R., OOMURA, Y. & KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Research*, 1988; 448: 106–114. doi:10.1016/0006-8993(88)91106-7
49. Plata-Salamán CR. Immunoregulators in the nervous system. *NeurosciBiobehavRev* 1991; 15: 185 – 215
50. Plata-Salamán CR. Anorexia during acute and chronic disease. *Nutrition* 1996; 12: 69 – 78
51. Cunnane SC, McAdoo K R, Horrobin DF, n-3 Essential fatty acids decrease weight gain in genetically obese mice. *Br J Nutr.* 1986, 56, 87–95.

52. Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: A mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999, 60, 351–356.
53. Soni NK, Nookaew I, Sandberg A-S, Gabrielson BG. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched highfat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis* 2015;14(74):1–13
54. 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
55. Espinosa, A., Campos, C., Díaz-Vegas, A., Galgani, J. E., Juretic, N., Osorio Fuentealba, C., Bucarey, J.L., Tapia, G., Valenzuela, R., Contreras-Ferrat, A., Llanos, P., Jaimovich, E., Insulin-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is higher in muscle fibers of mice fed with a high-fat diet. *Int J Mol Sci*. 2013, 14, 15740–15754
56. Zheng Z, Zhang C, Zhang K. Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J Hepatol* 2010;2(6):203–7. 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
57. 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.
58. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Bobrovnikova-Marjon E, Hatzivassiliou G, Grigoriadou C, Romero M, Cavener DR, Thompson CB, Diehl JA Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21; 105(42):16314-9,
59. Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D Cell Metab*. 2008 Jun; 7(6):520-32
60. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. Seo J, Fortunato ES 3rd, Suh JM, Stenesen D, Tang W, Parks EJ, Adams CM, Townes T, Graff JM *Diabetes*. 2009 Nov; 58(11):2565-73.

61. Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq L. Central role of PPAR $\alpha$ -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2003 Jul;38(1):123-32.
62. Nissar AU, Sharma L, Tasduq SA. Palmitic acid induced lipotoxicity is associated with altered lipid metabolism, enhanced CYP450 2E1 and intracellular calcium mediated ER 719 stress in human hepatoma cells. *Toxicol Res*. 2015; 4: 1344-58
63. Rial, E., L. Rodríguez-Sánchez, E. Gallardo-Vara, P. Zaragoza, E. Moyano, and M.M. González-Barroso. 2010. Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 800–806. doi:10.1016/j. bbabio.2010.04.001
64. Covas M-I, Nyssönen K, Poulsen H, Kalkkonen J, Zunft HF, Kieseewetter 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
65. 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.
66. Hernández-Rodas MC, Valenzuela R, Echeverría F, Rincón-Cervera MA, Espinosa A, et al., Supplementation with docosahexaenoic acid and extra virgin olive oil prevents liver steatosis induced by a high-fat diet in mice through PPAR- $\alpha$  and Nrf2 upregulation with concomitant SREBP-1c and NF- $\kappa$ B downregulation
67. Hyoun-Jukim Gentile CL, Fyye MA, Pagliassotti MJ. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in 745 nonalcoholic fatty liver diseases. *Biofactors* 2011; 37: 8-16 66 Fish Oil Feeding Decreases Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein 1 (SREBP-1) by Down-regulation of SREBP-1c mRNA in Mouse Liver A POSSIBLE MECHANISM FOR DOWN-REGULATION OF LIPOGENIC ENZYME mRNAs
68. Echeverría, F., Ortiz, M., Valenzuela, R., Videla, L. A., Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016, 114, 28–34
69. Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., Grosovski, M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2009, 15, 1809–1815

70. Zúñiga, J., Cancino, M., Medina, F., Varela, P., Tapia, G., Videla, L.A., Fernández, V. N3 PUFA supplementation triggers PPAR- $\alpha$  activation and PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B interaction: Antiinflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. PLoS One. 2011, 6, e28502

71. Moniri, N.H., Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): cellular and molecular function and its role in metabolic disorders. BiochemPharmacol. 2016, 110-111, 1-15

## Anexos

### Anexo 1.

#### Información nutricional de las dietas experimentales

	Dieta control		High fatdiet	
	g	kcal%	g	kcal%
Proteínas	19,2	20	26,2	20
Carbohidratos	67,3	70	26,3	20
Lípidos	4,3	10	34,9	60
Total		100		100
kcal/g		3,85		5,24
<b>Ingrediente</b>	<b>g</b>	<b>kcal</b>	<b>g</b>	<b>kcal</b>
Caseína, 30 Mesh	200	800	200	800
L-Cisteína	3	12	3	12
Almidón de maíz	315	1260	0	500
Maltodextrina 35 140	35	140	125	275.2
Sacarosa				
Celulosa, BW200	50	0	50	0
Aceite de soya	25	223	25	225
Manteca de cerdo**	20	180	245	2205
Mezcla de minerales S10026	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato de calcio	5.5	0	5.5	0
Citrato de potasio, 1 H2O	16.5	0	16.5	0
Mezcla de vitaminas V10001	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2	40	2	40
Tartrazina (FD&C yellow dye #5)	0.05	0	0.05	0
Total	1055.05	4057	773.85	4057

## Anexo 2 Perfil ácidos grasos totales del aceite utilizado como fuente de DHA

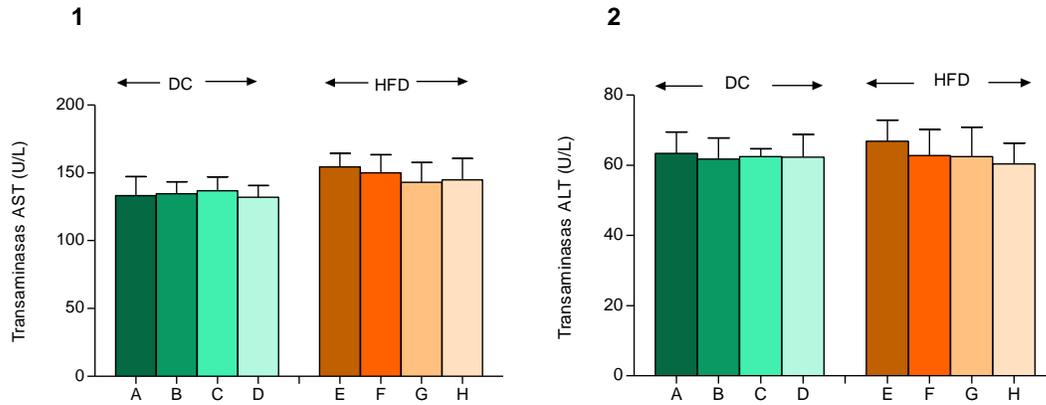
	% Metil Ester	AG g/100g
C10:0 Ácido Decanoico	0	0
C12:0 Ácido dodecanoico	0	0
C14:0 Ácido Tetradecanoico	0.241	0.198
C16:0 Ácido Palmítico	0.272	0.222
C18:0 Ácido Esteárico	5.422	4.442
C20:0 Ácido Eicosanoico	0.450	0.369
C22:0 Ácido Docosanoico	0.220	0.180
C24:0 Ácido Tetracosanoico	0	0
<b>Total Ac. Grasos Saturados</b>	<b>6.606</b>	<b>5.412</b>
Ácidos Grasos Monoinsaturados		
C14:1 Ácido Tetradecenoico	0	0
C16:1 Ácido Palmitoléico	1.049	0.693
C18:1 Ácido Oléico	1.403	0.927
C20:1 n9 Ácido Eicosaenoico	1.829	1.209
C22:1 n9 Ácido Erúico	1.076	0.711
C24:1 Ácido Tetracosaeico	3.476	2.298
<b>Total Ac. Grasos Monoinsaturados</b>	<b>8.833</b>	<b>5.838</b>
Ácidos Grasos Poliinsaturados		
C18:2 n-6 Ácido Linoléico	0.150	0.099
C18:3 n-6 Ácido $\gamma$ – Linolénico	0	0
C18:3 n-3 Ácido $\alpha$ – Linolénico	0.156	0.103
C20:2 n-6 Ácido Eicosadienoico	0.258	0.171
C20:3 n-6 Ácido Di-homo- $\gamma$ -Linolénico	0.145	0.096
C20:3 n-3 Ácido 11, 14, 17 Eicosatrienoico	0.264	0.174
C20:4 n-6 Ácido Eicosatetraenoico	0.710	0.469
C20:5 n-3 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	16.116	10.651
C22:5 n-3 Ácido Dososapentaenoico	10.039	6.635
C22:6 n-3 Ácido Docosahexaenoico (DHA)	58.215	38.476
<b>Total Ac. Grasos Poliinsaturados</b>	<b>86.053</b>	<b>56.875</b>

### Anexo3. Características generales de los animales.

n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartilico. Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$ .

Parámetros/ Grupos	CD (A)	D+DHA (B)	CD+HT (C)	CD+DHA+HT (D)	HFD (E)	HFD+ DHA (F)	HFD+HT (G)	HFD+DHA+HT (H)
Peso tejido adiposo (g)	0,998 (0,94- 0,05)	0,942 (0,854-1,06)	1,005 (0,978- 1,088)	0,979 (0,88-1,072)	4,095 (3,709- 4,567) a,b,c,d,h	3,025 (2,945-3,161) a,b,c,d	3,125 (2,854-3,735) a,b,c,d	2,004 (1,889-2,104) a,e
Peso hígado (g)	1,272 (1,157-1,43)	1,44 (1,405-1,52)	1,305 (1,146-1,393)	1,335 (1,212-1,508)	1,405 (1,365- 1,45) h	1,26 (1,11-1,355)	1,377 (1,27-1,4)	1,274 (1,231-1,287) e
Peso corporal final (g)	27,7 (26,90- 28,70)	30,15 (29,33- 32,08)	27,85 (26,7-29,58)	29,95 (28,03-31,83)	35,20 (34,02- 36,02) a,c,d	29,30 (27,60-33,15)	33,35 (29,32-36,42) a	30,75 (28,03-34,30)
Peso corporal inicial (g)	14,75 (13,75-15,70)	14,20 (13,30-15,10)	14,40 (13,50-15,20)	14,20 (13,50-15,38)	14,20 (13,30- 14,7)	13,85 (13,45-14,95)	14,30 (13,28-15,08)	14,30 (13,35-14,55)

## Anexo 4. Transaminasas



Niveles de aspartato transaminasa (AST) (1) y alanina transaminasa (ALT) (2) en suero (U/L). n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); DAG (E); DAG + DHA (F); DAG + HT (G); DAG + DHA + HT (H). Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartilico. Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$

## Anexo 5. Control de ingesta

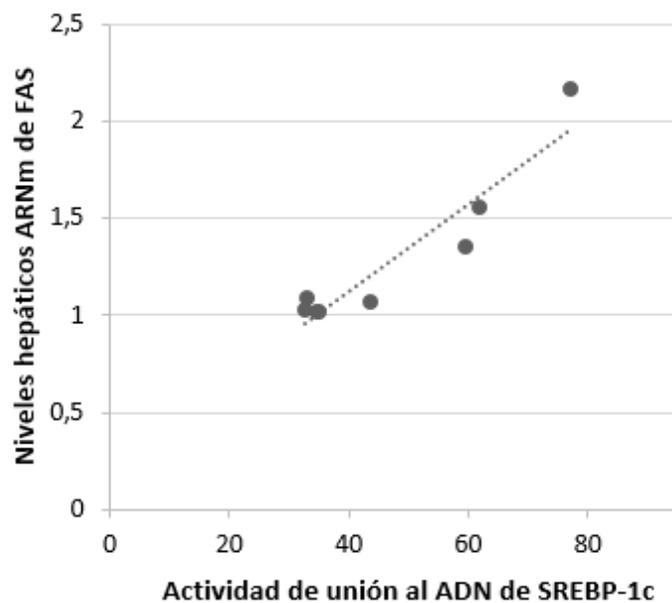
Datos presentados como mediana  $\pm$  rango intercuartílico de ingesta dietaria (g/día), ingesta energética (g/día), ingesta proteica (g/día), ingesta CHO (g/día), ingesta lípidos (g/día). n= 8-10. CD (A); CD + DHA (B); CD + HT (C); CD + DHA + HT (D); HFD (E); HFD + DHA (F); HFD + HT (G); HFD + DHA + HT (H). Diferencias significativas establecidas según Test Kruskal Wallis, seguido por test Dunn's para comparaciones múltiples; las letras minúsculas indican contra que grupo existe diferencia significativa  $p < 0,05$

Grupos/ Parámetros	CD (A)	CD+DHA (B)	CD+HT (C)	CD+DHA+ HT (D)	HFD (E)	HFD+ DHA (F)	HFD+HT (G)	HFD+DHA +HT (H)
Ingesta dietaria (g/día)	3,89 (3,77-3,98)	3,81 (3,64- 3,89)	3,96 (3,79- 3,99)	3,48 (3,18- 3,59)	3,2 (3,78- 3,88)	3,82 (3,78- 3,88)	3,86 (3,78-3,94)	3,82 (3,78- 3,92)
Ingesta energética (g/día)	14,99 (0,73- 0,77)	14,67 (14,01- 14,99)	14,84 (14,58-15,28)	14,4 (14,08- 14,34)	17,42 (17,22- 17,89) a,b,c,d	20,01 (19,81- 20,30) a,b,c,d	20,18 (19,77- 20,66) a,b,c,d	20,04 (19,92- 20,54) a,b,c,d
Ingesta proteica (g/día)	0,75 (0,73- 0,77)	0,74 (0,70- 0,75)	0,74 (0,73-0,76)	0,74 (0,73-0,76)	0,94 (0,90- 0,97) a,b,c,d	1,01 (0,99-1,02) a,b,c,d	1,01 (0,99-1,03) a,b,c,d	1,00 (0,99- 1,03) a,b,c,d
Ingesta CHO (g/día)	2,63 (2,54- 2,68)	2,57 (2,45- 2,63)	2,6 (2,55- 2,67)	2,5 (2,50- 2,55)	0,94 (0,90- 0,97) a,b,c,d	1,00 (0,99-1,02) a,b,c,d	1,01 (0,99-1,03) a,b,c,d	1,00 (0,99-1,03) a,b,c,d
Ingesta lípidos (g/día)	0,17 (0,16- 0,17)	0,16 (0,16- 0,17)	0,17 (0,16-0,17)	0,16 (0,16-0,17)	1,10 (1,07- 1,13) a,b,c,d	1,33 (1,32- 1,36) a,b,c,d	1,35 (1,32-1,38) a,b,c,d	1,33 (1,32- 1,37) a,b,c,d

## Anexo 6.

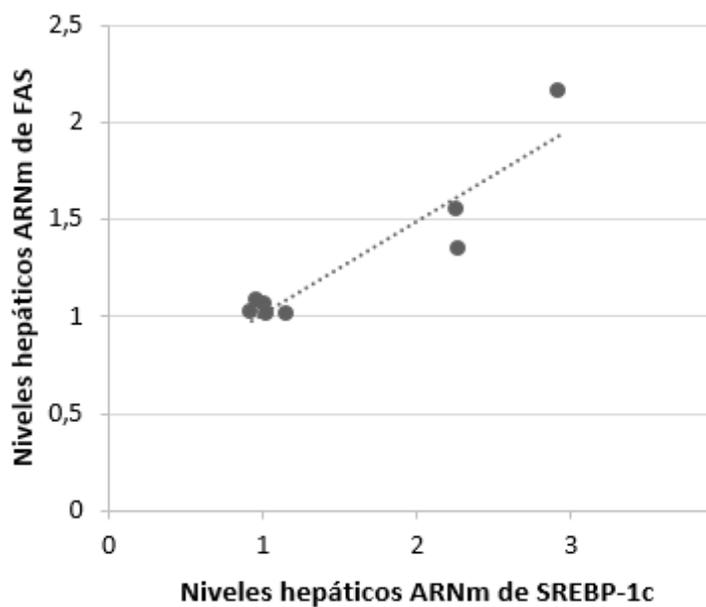
### Correlaciones

#### 6.1 Correlación actividad de unión al ADN de SREBP-1c y niveles ARNm hepático de FAS



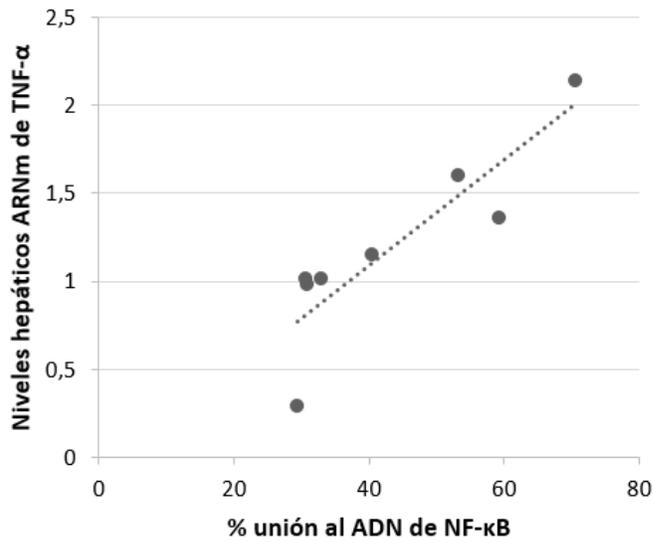
Actividad de unión al ADN de SREBP-1c y niveles hepáticos de ARNm de FAS de todos los grupos experimentales. Donde  $p=0,94$   $r^2=0,89$   $y = 0,022x + 0,2099$

#### 6.2 Correlación Niveles hepáticos ARNm de SREBP-1c y FAS



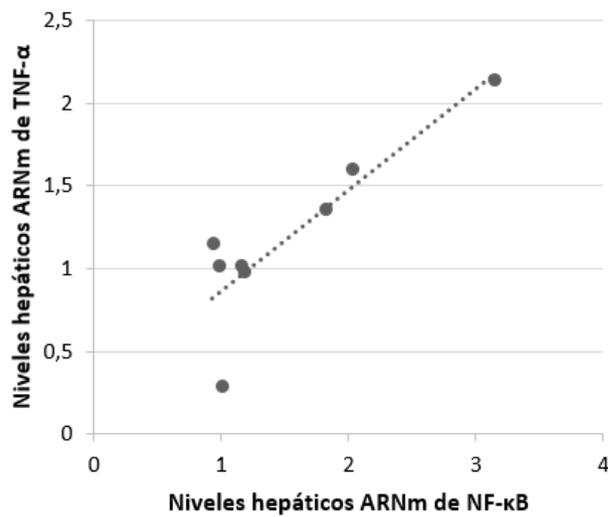
Niveles hepáticos de ARNm de SREBP-1c y FAS de todos los grupos experimentales. Donde  $p=0,93$   $r^2=0,87$   $y = 0,4809x + 0,5301$

### 6.3 Correlación actividad de unión al ADN de NF-κB y niveles hepáticos de ARNm de TNF-α



Actividad de unión al ADN de NF-κB y niveles hepáticos de ARNm de TNF-α de todos los grupos experimentales. Donde  $p = 0,89$   $r^2 = 0,7761$   $y = 0,0301x + 0,1123$

### 6.4 Correlación Niveles hepáticos ARNm de NF-κB y TNF-α



Niveles hepáticos de ARNm de NF-κB y TNF-α de todos los grupos experimentales. Donde  $p = 0,87$   $r^2 = 0,7562$   $y = 0,607x + 0,2638$

**Anexo 7.** Cálculo y discusión de la dosis de suplementación de HT y DHA 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):  $M = 70W^{3/4}$

donde:

M: Tasa metabólica en Kilocalorías (kcal)/día  
W: Masa corporal en Kilogramos (kg)

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

Considerando un peso de ratón de 30 g y de un humano de 70 kg, el cálculo sería el siguiente:

Hidroxitiroso

En ratón de 30 g: 5mg/kg peso → 0,15 mg en 0,03 kg de ratón → 0,15mg en 0,03 kg  $^{0,75} = 2,08 \text{ mg/kg}^{0,75}$

En humano de 70 kg:  $2,08 \times 70 \text{ kg}^{0,75} = 50,33 \sim 50\text{mg} \rightarrow 50/70 \text{ kg} = \mathbf{0,71 \text{ mg/kg}}$

DHA

En ratón de 30 g: 50mg/kg peso → 1,5 mg en 0,03 kg de ratón → 1,5mg en 0,03 kg  $^{0,75} = 20,8 \text{ mg/kg}^{0,7}$

En humano de 70 kg:  $20,8 \times 70 \text{ kg}^{0,75} = 503,36 \sim 500\text{mg} \rightarrow 500/70 \text{ kg} = \mathbf{7,14 \text{ mg/kg}}$

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 DHA en humano = 7,14 mg/kg en humano (500mg/día en humano de 70 kg).**

Las dosis planteadas se traducen a 10 cucharaditas de aceite de oliva al día y consumo de pescados grasos 2 veces por semana

