

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



**NIVELES DE PERILIPINAS, ACOX-1 Y PPARS EN LA  
ESTEATOSIS HEPÁTICA: CAMBIOS ASOCIADOS A LA  
ADMINISTRACIÓN DE ACEITE DE ROSA MOSQUETA EN  
RATONES CON DIETA ALTA EN GRASA**

**CYNTHIA ANGELICA CADAGAN FUENTES**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLÓGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dra. Gladys Tapia Opazo**

**Co-tutora: Prof. Dra. Alejandra Espinosa Escalona**

**2016**

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

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

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

**CYNTHIA ANGELICA CADAGAN FUENTES**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis, como requisito para  
optar al Grado de **Magister en Fisiología**, en Examen de Defensa de Tesis  
rendido el día 04 de Agosto de 2016.

**Prof. Dra. Gladys Tapia O.**  
Director de Tesis  
Programa de Farmacología Molecular y Clínica  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**Prof. Dra. Alejandra Espinosa E.**  
Co-tutora de Tesis  
Departamento de Tecnología Médica  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DRA. PAOLA LLANOS**

**PROF. DRA. EMILIA SANHUEZA**

**PROF. DR. RODRIGO VALENZUELA**

**PROF. DRA. GINA SANCHEZ**

*Presidente Comisión de Examen*

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis en especial a mi amado hijo Leonardo, quien es mi felicidad, alegría y gran motivación para seguir creciendo personal y profesionalmente.

Se la dedico a Iván, Angélica, Esteban, Fernanda, Rodrigo, Karen, Macarena, Ricardo, Nicolás, Natalia, Jonathan y a mis sobrinos, mi maravillosa familia, quienes siempre me han apoyado sobre todo en cuanto al cuidado de mi hijo, en los tiempos difíciles y de mayor dedicación a esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi familia y amigos, por ser quienes me han apoyado en mis decisiones y sobre todo en este proceso. Agradecer a Aarón Cortés por la paciencia y empatía para ausentarme del trabajo y al grupo de laboratorio, quienes me ayudaron y enseñaron, aportaron su conocimiento y tiempo para poder lograr mis objetivos. Agradezco también especialmente, a dos de mis profesoras correctoras, Paola Llanos y Gina Sánchez, quienes brindaron su conocimiento para mejorar mi desempeño y finalmente, a mis tutoras Gladys Tapia y Alejandra Espinosa, quienes estuvieron siempre dispuestas a apoyar, guiar y aportar con su conocimiento.

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Enfermedad por hígado graso no alcohólico. ....	10
Patogenia de la EHGNA. ....	10
Rol de las perilipinas en la esteatosis hepática .....	11
<i>Perilipina 2</i> .....	12
<i>Perilipina 5</i> .....	12
<i>Perilipinas 1, 3 y 4</i> .....	13
<i>Acil CoA Oxidasa 1 (ACOX-1)</i> .....	13
Familia PPARs, como factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo de los lípidos y su asociación con las perilipinas .....	13
<i>PPAR-<math>\gamma</math></i> .....	13
<i>PPAR-<math>\alpha</math></i> .....	14
Ácidos grasos omega 3 y esteatosis hepática.....	14
Rosa Mosqueta ( <i>Rosa rubiginosa</i> ) como fuente de omega 3.....	15
Alcances e implicancias del estudio .....	15
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVOS.....	17
General.....	17

Específicos .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Animales de experimentación .....	18
2. Tratamiento previo de los animales: Administración dietaria.....	18
3. Procedimiento previo de preparación de las muestras.....	18
4. Grupos de experimentación.....	19
5. Procedimiento previo de determinación del perfil de ácidos grasos hepático.....	19
6. Estudio histológico .....	20
7. Medición de los niveles de proteínas Perilipinas 2 y 5 .....	21
7.1 Inmunofluorescencia indirecta .....	21
8. PCR en tiempo real para PLIN2, PLIN5 y PPAR- $\gamma$ .....	23
8.1 Extracción de RNA .....	23
8.2 Cuantificación e integridad del RNA extraído.....	23
8.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA .....	24
8.4 PCR en tiempo real utilizando sondas SYBR green .....	24
9. Medición de los niveles de PPAR- $\alpha$ .....	26
9.1 Inmunohistoquímica.....	26
10. Medición de los niveles de la proteína ACOX-1 .....	27
10.1 Western blot .....	27
11. Expresión de resultados y análisis estadístico .....	29
RESULTADOS .....	30

1. Prevención de la esteatosis hepática por la suplementación de aceite de RM.....	30
2. Menores niveles de mRNA y de PLIN2, asociados a la suplementación con aceite de RM..	31
3. Los niveles de mRNA de PPAR- $\gamma$ , no son modificados por la suplementación con aceite de RM.	32
4. Los niveles de la proteína PLIN5, no fueron modificados por la suplementación con aceite de RM.	33
5. Restauración de los niveles de PPAR- $\alpha$ , asociados a la suplementación con aceite de RM	34
6. Restauración de los niveles de ACOX1, asociados a la suplementación con aceite de RM	35
7. Correlación positiva entre PPAR- $\alpha$ y ACOX-1.....	36
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIÓN .....	42
PROYECCIONES A FUTURO.....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43
ANEXO 1 .....	51
ANEXO 2 .....	52
ANEXO 3 .....	53

## RESUMEN

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA), se caracteriza por una acumulación excesiva de triacilglicéridos, asociado principalmente a un desbalance metabólico inducido por la obesidad, resistencia a la insulina y por el síndrome metabólico. En dicha acumulación, participan las perilipinas (PLIN), necesarias para la formación de las gotas lipídicas, entre ellas, las PLIN 2 y 5, la primera, promueve el proceso de esteatosis y la segunda, facilita la degradación de la gota de lípidos. La expresión de ambas PLIN, es regulada por los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$  respectivamente, los cuales son reguladores del metabolismo de los ácidos grasos.

Una propuesta de tratamiento para la EHGNA, es la administración de los ácidos grasos omega 3 [ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA)] de origen marino y una segunda opción, estudiada en esta tesis, es el aceite de rosa mosqueta (RM), rico en ácido  $\alpha$ -linolénico, precursor de EPA y DHA, y antioxidantes. Estudios publicados de nuestro laboratorio, indican que la administración crónica de aceite de RM por vía oral, previene significativamente la esteatosis inducida por una dieta alta en grasa. Para entender mejor este proceso, se evaluó si hay cambios en los niveles de mRNA y/o de las PLIN 2 y 5, de la Acil-Coenzima Oxidasa 1 (ACOX-1) y en PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$ . Para ello, se utilizaron muestras de hígado de ratones de la cepa C57BL/6J (n=6-9), alimentados durante 12 semanas con: i) DC: Dieta estándar (10% de lípidos), ii) DC+RM: Dieta estándar más aceite de RM, iii) DAG: Dieta alta en grasa (60% en lípidos) y iv) DAG+RM: Dieta alta en grasa más aceite de RM. Se determinó el grado de esteatosis por histología hepática [tinción hematoxilina eosina (HE)], los niveles de perilipinas 2 y 5 (inmunofluorescencia indirecta (IFI) y PCR en tiempo real (qPCR), niveles de PPAR- $\gamma$  (qPCR), niveles de PPAR- $\alpha$  [inmunohistoquímica (IHQ)] y niveles de ACOX-1 por Western blot (WB).

En los ratones alimentados con DAG+RM respecto a aquellos alimentados sólo con DAG, se encontró: i) menor grado de esteatosis hepática y menores niveles de mRNA y de PLIN2 ( $p < 0,05$ ); ii) mayores niveles en PPAR- $\alpha$  y ACOX-1 ( $p < 0,05$ ); iii) que PPAR- $\gamma$  y los niveles de PLIN5 no mostraron diferencias.

El mecanismo de prevención de la esteatosis hepática, asociada a la suplementación con aceite de RM, podría estar relacionado, con la restauración de los niveles de PPAR- $\alpha$  y ACOX-1, ésta última, proteína relacionada con la degradación de los ácidos grasos.

## ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), it is characterized by an excessive accumulation of triglycerides, mainly associated to a metabolic imbalance induced by obesity, insulin resistance and metabolic syndrome. The perilipins (PLIN) are necessary for the formation of lipid droplets, being the PLIN 2 and 5 involved. PLIN 2 initiates the process of steatosis, and PLIN 5 helps in the degradation of the lipids droplet. Expression of both PLIN is regulated by the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\gamma$  and PPAR- $\alpha$  respectively, those factors are regulators of the metabolism of fatty acids.

One of the treatments proposed for NAFLD, is the administration of omega-3 fatty acids [eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA)] of marine origin and a second option studied on this thesis is Rosa Mosqueta oil (RM, *Rosa rubignosa*), high in  $\alpha$ -linolenic acid, which is the precursor of EPA, DHA, and antioxidants. Already published studies from our laboratory indicate that chronic oral administration of RM, significantly prevents steatosis induced by a high-in-fat diet. To better understand this process, the levels for mRNA and/or of PLIN 2 and 5, of Acyl-Coenzyme Oxidase 1 (ACOX-1) and PPAR- $\gamma$  and PPAR- $\alpha$  were evaluated. To this end, liver samples from mice of the strain C57BL/6J (n=6-9) were used, the animals were fed for 12 weeks with: i) CD: Control diet (10% fat), ii) CD+RM: Control diet plus Rosa Mosqueta oil, iii) HFD: High fat diet (60% lipid) and iv) HFD+RM: High fat diet plus Rosa Mosqueta oil. The degree of steatosis was determined by liver histology [Hematoxylin and eosin stain (HE)], perilipins levels 2 and 5 (indirect immunofluorescence (IIF) and Real-time PCR (qPCR), levels of PPAR- $\gamma$  (qPCR) , levels of PPAR- $\alpha$  [immunohistochemistry (IHC)] and ACOX-1 levels by Western blot.

In the mice fed with HFD+RM respect to those mice fed only HFD, it was found: i) lower degree of hepatic steatosis and lower levels of mRNA and PLIN2 ( $p < 0,05$ ); ii ) higher levels of PPAR- $\alpha$  and ACOX-1 ( $p < 0.05$ ) and iii) PPAR- $\gamma$  and PLIN5 levels showed no differences.

The mechanism of preventing of hepatic steatosis, associated supplementation with RM, could be linked, with the restoration of the levels of PPAR- $\alpha$  and ACOX-1, the latter related protein degradation acids fatty.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha visto un aumento importante de la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles, dentro de las cuales, dos de los factores de riesgo preocupantes, son la obesidad y la resistencia a la insulina (1). Ambos factores de riesgo, se encuentran asociados al síndrome metabólico (presente en el 35% de la población estudiada, según la encuesta nacional de salud 2009-2010), el cual tiene una relación estrecha con el desarrollo de la enfermedad conocida como hígado graso no alcohólico (EHGNA) (2).

La EHGNA es crónica no trasmisible y su primer estadio es la esteatosis hepática, que corresponde, a una acumulación anormal de triacilglicéridos en el hígado (sobre el 5% del peso del hígado) en ausencia de un consumo frecuente de alcohol (>20 g/día) y se considera la expresión hepática del síndrome metabólico (3, 4). En el proceso de esteatosis, uno de los mecanismos que subyace la acumulación de lípidos en el hígado, se asocia a la participación de un grupo de proteínas llamadas perilipinas (PLIN), que forman parte de la estructura de la gota lipídica, y dentro de las cuales, las PLIN 2 y 5 son altamente expresadas en el tejido hepático, la primera favoreciendo la acumulación de triacilglicéridos y la segunda, favoreciendo su oxidación (5).

El aumento de la incidencia de la esteatosis hepática, a pesar de los tratamientos disponibles, pone de relieve la necesidad de realizar estudios que permitan ampliar esta perspectiva y generar alternativas en la prevención de ésta alteración hepática. Es así, que a los pacientes con EHGNA, se les recomienda el consumo de los ácidos omega 3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), debido a que presentan una pérdida sustancial de éstos a nivel hepático y un alto índice omega 6/omega 3 (6-14).

La principal fuente de omega 3 de origen animal, es derivada de pescados grasos, que en Chile, su consumo, ha ido en disminución en los últimos años y una opción derivada de una fuente vegetal, es el aceite de rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) el cual presenta un alto contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico, precursor de EPA y DHA (8).

Nuestro grupo de investigación, demostró que la administración de aceite de RM, previene en forma significativa la esteatosis inducida por una dieta alta en grasa (15), y en ese contexto, esta tesis evaluó, si en este proceso, hay cambios en los niveles de mRNA y/o de las PLIN 2 y 5, ACOX-1 y en PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$ , factores reguladores de la expresión de estas proteínas.

## MARCO TEÓRICO

### Enfermedad por hígado graso no alcohólico.

La esteatosis hepática, es una de las primeras etapas de la EHGNA, el cual puede progresar a esteatohepatitis y en algunos casos, cirrosis, falla hepática y carcinoma hepatocelular (16).

La EHGNA, es una de las causas más comunes de alteración hepática crónica en el mundo, afectando aproximadamente a un tercio de la población, y su incidencia, sigue aumentando con la creciente prevalencia de otros trastornos metabólicos, como la diabetes tipo 2. Cifras reportadas en diferentes poblaciones, sugieren prevalencias de entre un 10% a 31% de EHGNA y en la población chilena de un 23,4% de hígado graso, diagnosticado por ecografía abdominal (1-3, 17). La esteatosis, se define por un contenido de grasa sobre el 5% del peso total del hígado, lo que puede ser consecuencia de un desequilibrio entre el consumo de lípidos y/o la síntesis *de novo* y la eliminación de ácidos grasos mediante  $\beta$ -oxidación o síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (17). Su patogénesis, está estrechamente asociada con la resistencia a la insulina y la dislipidemia, especialmente la hipertrigliceridemia (18, 19).

### Patogenia de la EHGNA.

***Resistencia a la insulina y acumulación de lípidos en el hígado.*** La EHGNA, está estrechamente relacionada a la obesidad, y a la resistencia a la insulina, ya que ésta favorece el incremento de los niveles de ácidos grasos circulantes, por el aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, los cuales van a diferentes tejidos, entre ellos el hígado, donde al no ser todos beta oxidados se acumulan (19-21). Además, asociado al aumento de la lipólisis, en la resistencia a la insulina se ha descrito, aumento hepático en la síntesis de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c), el cual potencia la expresión de genes que participan en la lipogénesis, aumentando la síntesis de ácidos grasos, y acelerando la acumulación de grasa hepática (22).

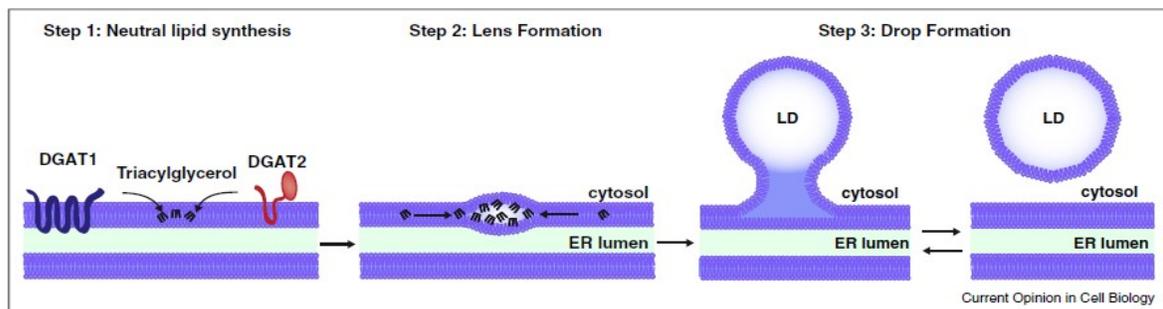
***Obesidad e hígado graso.*** En la obesidad se establece un estado pro-inflamatorio crónico del tejido adiposo visceral, el cual secreta adipoquinas que, en conjunto con la acumulación de lípidos en el hígado, promueven la inflamación vía el factor nuclear (NF)- $\kappa$ B,

contribuyendo a la permanencia e incremento de la resistencia a la insulina (3, 21). Tanto el exceso de ácidos grasos libres que se genera por el desbalance metabólico, como el estado inflamatorio crónico presente en la obesidad, contribuyen de manera directa a la generación de hígado graso no alcohólico (3).

### Rol de las perilipinas en la esteatosis hepática

Los triacilgliceroles, son la principal reserva energética del organismo y se almacenan normalmente en el tejido adiposo, en gotas lipídicas (23). Éstos, son organelos intracelulares que almacenan principalmente triacilglicerol, aunque también ésteres de colesterol, diacilglicerol, ésteres de retinol y colesterol libre. Las gotas lipídicas, se consideran estructuras dinámicas y contienen un núcleo de lípidos neutros, con una monocapa de lípidos como cubierta, que contiene fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y rodeados de proteínas. La composición de la superficie, es altamente relevante para la regulación del tamaño de la gota de lípido y su capacidad para interactuar con otras gotas u organelos, tales como el retículo endoplasmático (RE) (24).

Se han propuesto, diferentes modelos para la biogénesis de las gotas de lípidos y su crecimiento (25). Sin embargo, estos modelos consistentemente sugieren, que emergen del RE. El modelo más aceptado, es el que postula la acumulación entre la bicapa de la membrana del RE, impulsando la incipiente gota naciente (Fig. 1). Esto es apoyado por la acción de enzimas tales como diacilglicerol o-aciltransferasa 1 (DGAT1) acetil-Coenzima A acetiltransferasa 1 (ACAT1) (26, 27).



**Figura 1.** Modelo de la formación de la gota de lípido. Paso 1: Lípidos neutros son sintetizados en el RE y acumulados entre la bicapa lipídica. Paso 2: Una concentración local de lípidos neutros forman una ventana de fusión de fase oleosa. Paso 3: La bicapa se deforma y brota una gota de lípido naciente en el citoplasma (27).

La mantención del balance entre la formación y la degradación de la gota de lípido, es llevada a cabo gracias a las proteínas llamadas perilipinas (PLIN) o familia PAT. El acrónimo PAT, es derivado a partir de los tres primeros miembros de la familia identificados: PLIN1, con sus isoformas A, B y C, PLIN2 (ADRP- adipose differentiation related protein), y PLIN3 (TIP47-Tail interacting protein) descubriéndose después la PLIN4 (S3-12) y PLIN5 (OXPAT o alternativamente LSDP5 o MLDP) (28-30). En el desarrollo de la EHGNA, PLIN 2 y 5, se destacan del resto: PLIN2, favorece la formación y la mantención de la gota lipídica y PLIN5, favorece su degradación.

Diversos autores, mencionan que, PLIN2 limitaría la unión de la lipasa de triacilglicéridos de tejido adiposo (ATGL) a la gota de lípido, función y mecanismo asociado a la que realiza PLIN1 en el tejido adiposo, mientras que PLIN5 favorecería su unión al interactuar con ATGL y el coactivador de identificación de genes (CGI-58) y por relacionarse a la mitocondria mediante su extremo terminal C, a quien le entrega los lípidos, teniendo un papel inverso en el control del almacenamiento de los lípidos en la esteatosis hepática (5, 31, 32).

### ***Perilipina 2***

En los seres humanos y ratones, PLIN2 está fuertemente expresada durante el desarrollo del hígado graso (33, 34). En estudios *in vitro*, la sobreexpresión de PLIN2 (mRNA) promueve la absorción y la incorporación de lípidos en gotas de lípidos tanto en el tejido adiposo como en hígado (33, 35). En experimentos con ratones alimentados con dieta alta en grasa se observó, que PLIN2 también aumenta su expresión (mRNA) y éste aumento, se relacionó con la presencia de PPAR- $\gamma$ , al administrar un agonista para este factor de transcripción (30).

### ***Perilipina 5***

PLIN5 con sus tres denominaciones, proteína de gota de lípido miocárdica (MLDP), proteína de tejido oxidativo de la familia PAT (OXPAT) y proteína de almacenamiento de gotas de lípidos 5 (LSDP5), se expresa en tejidos con alta capacidad oxidativa como en corazón, músculo esquelético e hígado y durante estados con incrementos en la oxidación de ácidos grasos (31, 36). Se encuentra estable en el citosol y a través de su dominio C-terminal, facilita una estrecha proximidad entre las mitocondrias y las gotas de lípidos, para influir en la hidrólisis de los ácidos grasos (23, 36). La expresión de esta proteína, está regulada por PPAR- $\alpha$ ,

un factor de transcripción activado por ligando, que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos, por lo que algunos autores sugieren que PLIN5, participa en la regulación de la acumulación de lípidos en el hígado (36, 37).

### ***Perilipinas 1, 3 y 4***

Las PLIN 1,3 y 4, están presentes en el desarrollo de esteatosis hepática, pero cumplen roles distintos a las 2 y 5. PLIN1, cuya función es de mayor importancia en el tejido adiposo aumentando las gotas de lípidos y el almacenamiento de triacilglicéridos, formando una barrera que reduce el acceso de las lipasas solubles, inhibiendo así la hidrólisis de éstos, en el metabolismo basal (38), mientras que PLIN3 (TIP47) y PLIN4 (S3-12), favorecen el proceso de formación inicial de las gotas nacientes y son estables en el citosol (23, 39).

### ***Acil CoA Oxidasa 1 (ACOX-1)***

La ACOX-1, cataliza la reacción de la oxidación peroxisomal de ácidos grasos de cadena larga, su papel es fundamental, al ser la enzima limitante de este proceso, y su expresión es regulada por el factor de transcripción PPAR- $\alpha$ . Se ha demostrado que la suplementación con EPA y DHA utilizando un modelo similar al del presente estudio, produce un aumento en los niveles de ACOX-1 previniendo la esteatosis hepática y la inflamación inducida por una dieta alta en grasa (40, 41).

## **Familia PPARs, como factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo de los lípidos y su asociación con las perilipinas**

### ***PPAR- $\gamma$***

Es considerado uno de los reguladores maestros de la adipogénesis y tiene un rol fundamental en el almacenamiento de lípidos en tejido adiposo. Se encuentra ampliamente expresado en adipocitos maduros y en altos niveles en el desarrollo del hígado graso en animales (23, 42). Estudios en líneas celulares, han demostrado su relación con el aumento de PLIN2 a nivel hepático, favoreciendo la acumulación de lípidos además del aumento de otros factores como SREBP-1c (42).

### ***PPAR- $\alpha$***

En el hígado, juega un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos por la regulación positiva de la expresión de numerosos genes implicados en la oxidación mitocondrial y peroxisomal (43). La activación de PPAR- $\alpha$ , puede prevenir y disminuir el almacenamiento de grasa hepática. Ratones *knock-out* para PPAR- $\alpha$ , no pueden regular positivamente los sistemas de oxidación de ácidos grasos en el hígado y se ha visto que desarrollan esteatosis hepática grave (44). PPAR- $\alpha$ , también regula procesos inflamatorios, al inhibir a NF- $\kappa$ B e impedir la expresión de genes pro inflamatorios regulados por este factor de transcripción (45).

### **Ácidos grasos omega 3 y esteatosis hepática**

El  $\alpha$ -linolénico (ALA; 18:3 n-3), es un ácido graso omega 3 esencial para el ser humano, cuyo efectos se han visto en el sistema nervioso, favoreciendo la neurogénesis en el hipocampo (46-48) y en el hígado, modulando el desarrollo de esteatosis hepática (15, 49), entre otros efectos. Un estudio reciente en humanos, demostró que la ingesta de ALA, aumenta el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), conocido por sus efectos en la promoción de la neurogénesis y la supervivencia neuronal (50). Mediante enzimas específicas, como son las desaturasas  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6, y las elongasas 2 y 5, y procesos de  $\beta$ -oxidación peroxisomal, ALA se biotransforma a EPA y DHA, cuya función ha sido asociada a la mantención de la fluidez de la membrana, actuar como reguladores de procesos de transducción de señales y tener efectos anti-inflamatorios entre otros (49, 51). Se ha visto que EPA y DHA, son reguladores negativos de la lipogénesis hepática y pueden atenuar la esteatosis hepática incluso en deficiencia de leptina en ratones *ob/ob* (7, 24). Pacientes con esteatosis y esteatohepatitis, tienen más anormalidades metabólicas, asociadas a un mayor estrés oxidativo y menor cantidad de ácidos grasos omega3 en el hígado (52). Además, EPA y DHA, son ligandos del factor de transcripción PPAR- $\alpha$ , el cual estimula genes asociados a la lipólisis y la beta oxidación y de forma independiente tienen acción antiinflamatoria mediante la supresión de TNF- $\alpha$  e IL6 vía inhibición de NF- $\kappa$ B (52-54).

### **Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) como fuente de omega 3**

*Rosa rubiginosa* una de las especies de la llamada comunmente rosa mosqueta, es un arbusto silvestre que crece en los alrededores del río Bio-Bio en Chile, región del mundo en donde está en mayor abundancia y es el principal producto de recolección silvestre de exportación, enviándose principalmente a Europa y Norteamérica (25). El aceite de RM en general, contiene cerca de un 77% de ácidos grasos de cadena larga, y de éstos contiene entre un 41% a 50% de ácido linoleico (AL) y de un 26 a 37% de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) (55). El aceite ocupado en este estudio, contiene cerca de 33% de ácido  $\alpha$ -linolénico con una relación 1:1,2 aproximadamente entre ALA y AL (detalles en ANEXO 3), además de otros componentes como la vitamina C y E, siendo ampliamente utilizado en el ámbito de la dermatología por su contenido de antioxidantes (56).

### **Alcances e implicancias del estudio**

Es conocido que la presencia de factores de riesgo para el desarrollo de EHGNA, como son la resistencia a la insulina y la obesidad, están en aumento en la población y por ende, la incidencia del HGNA también. El proceso de esteatosis hepática, tiene una extensa implicancia metabólica, por lo que es importante conocer los procesos fisiológicos involucrados en su generación y el papel de las distintas estructuras relacionadas. Es así, que el papel de las PLIN 2 y 5, fue de interés en este estudio, ya que como se ha expuesto anteriormente, tienen una participación fundamental en la mantención y lipólisis de la gota lipídica, respectivamente, cuyos genes son regulados por la familia PPARs, y dentro del contexto de la prevención de la esteatosis hepática, mediante la administración de aceite de RM, resulta importante ver qué ocurre con estas proteínas.

Se han propuesto varias alternativas de tratamiento para la EHGNA, dentro de las cuales, uno de los enfoques, es a través de tratamientos farmacológicos. Este estudio, promueve una alternativa terapéutica adicional al recomendado para este tipo de pacientes (consumo de omega 3), dándole importancia a una fuente de origen vegetal, como es el aceite de RM y puede tener también una fuerte proyección a la posible regulación sobre las PLIN, pensando incluso a nivel del tejido adiposo (en donde se han descrito principalmente) y su implicancia en el tratamiento de la obesidad, generando resultados que soporten ideas para futuros proyectos de investigación.

Es importante recalcar también, que se ha producido un aumento considerable de publicaciones, donde se evalúa la administración de aceites ricos en ALA, demostrando su efecto neuro y hepatoprotector (15, 48-50).

## **HIPÓTESIS**

El aceite de rosa mosqueta, promueve menores niveles de mRNA y/o de perilipina 2 y PPAR- $\gamma$ , y mayores niveles de mRNA y/o de perilipina 5, ACOX-1 y de PPAR- $\alpha$ , en el hígado de un modelo experimental de esteatosis hepática en ratón.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar si en la prevención de la esteatosis hepática, mediante la administración de aceite de RM, se promueven cambios en los niveles de mRNA y/o de las Perilipinas 2, 5, ACOX-1 y en los receptores activados por proliferadores peroxisomales PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$ , en el hígado de un modelo experimental.

### **Específicos**

En muestras de hígado de ratón C57BL/6J:

1. Evaluar el grado de esteatosis y la histología del hígado mediante tinción con hematoxilina eosina (HE).
2. Determinar si el aceite de RM, promueve menores niveles de mRNA y/o de perilipina 2 y PPAR- $\gamma$ , en los ratones con dieta alta en grasa, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y PCR en tiempo real (qPCR).
3. Determinar si el aceite de RM, promueve mayores niveles de mRNA y/o de perilipina 5 y PPAR- $\alpha$ , en los ratones con dieta alta en grasa, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y PCR en tiempo real (qPCR).
4. Determinar si el aceite de RM, promueve mayores niveles de PPAR- $\alpha$  y ACOX-1 mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y Western blot (WB).
5. Correlacionar los niveles de los factores PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$  con los niveles de perilipinas 2, 5 y ACOX-1.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (46, 53) de 4-5 semanas de edad y 10-12 g de peso inicial, los cuales se obtuvieron del Bioterio Central (Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Se adjunta permiso de bioética N° 0639 FMUCH (Anexos 1 y 2).

En la investigación, se ocuparon muestras de hígado incluidas en Paraplast (Histosec®, Merck Millipore), para el estudio histológico e inmunofluorescencia indirecta y/o muestras congeladas para qPCR y Western blot (muestras a -80°C).

### **2. Tratamiento previo de los animales: Administración dietaria**

Los ratones tuvieron libre acceso a agua y alimento, bajo temperatura ambiental controlada y ciclos de luz/obscuridad de 12 horas. Se les administró las dietas y dosis de aceite de RM durante 12 semanas, consistentes en:

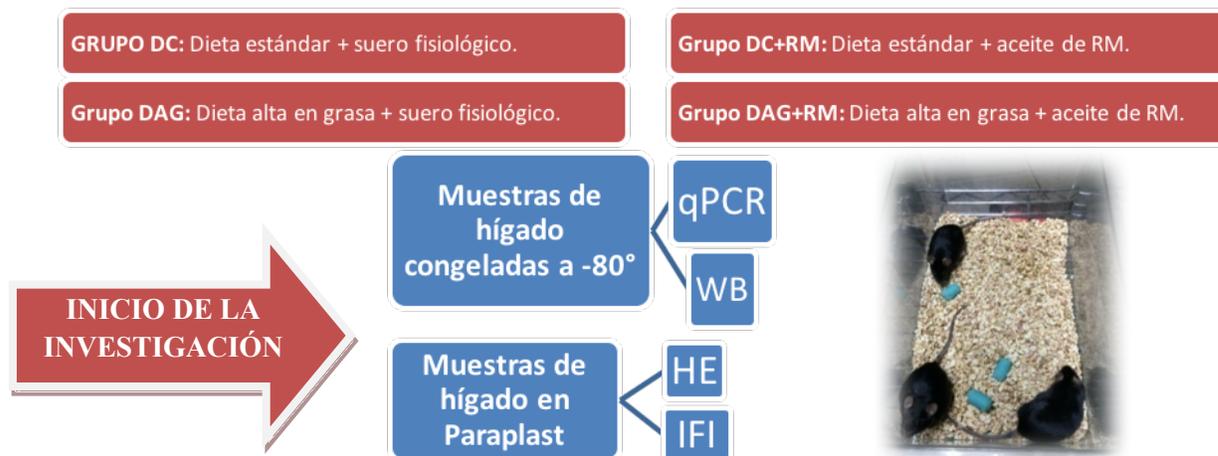
- Dieta alta en grasa: 60% grasa, 20% carbohidratos y 20% proteínas (*D12492 Research Diet INC, U.S.A.*) (53).
- Dieta estándar: 10% grasa, 20% proteínas y 70% carbohidratos (*D12450B Research INC, U.S.A.*) (46, 53).
- Suplemento de aceite de RM: 0,0388 g ALA /20 g/día de RM. (COESAM, Chile).

### **3. Procedimiento previo de preparación de las muestras**

En el laboratorio de estrés oxidativo y hepatotoxicidad, sector D, zócalo, Facultad de Medicina, los ratones fueron anestesiados con Zoletil 50® (80 mg/kg de peso, clorhidrato de tiletamina 125 mg y clorhidrato de zolazepam 125 mg) por vía intraperitoneal (IP) para obtener las muestras de hígado y sangre (corte pequeño del lóbulo más grande) mediante laparotomía abdominal, por lo que, debido a este procedimiento y a la extracción de la sangre, los ratones mueren por hipovolemia o anemia.

#### 4. Grupos de experimentación

Los ratones, fueron distribuidos en 4 grupos experimentales, de 6 a 9 ratones cada uno, siendo alimentados durante 12 semanas. La investigación comienza, a partir de las muestras procesadas, según el siguiente esquema (Fig. 2):



**Figura 2.** Durante 12 semanas, al grupo DC y DAG, se les administró la dieta estándar y dieta alta en grasa sin RM respectivamente y a los grupos DC+RM y DAG+RM, la dieta estándar y dieta alta en grasa más el suplemento oral de 0,0388 g ALA /20 g/día de RM (COESAM Chile).

Las muestras de hígado, fueron fijadas en formalina tamponada en buffer fosfato (10% p/v, pH 7,4 y 0,1 M) a 4°C durante 48 horas (57). Posterior a la fijación, las muestras fueron deshidratadas mediante una batería de etanoles pro análisis de graduación ascendente, hasta llegar al xilol puro (*Merck Millipore, Darmstadt, Alemania*). Una vez deshidratadas, las muestras fueron impregnadas en tres baños de Paraplast (*Histosec®*, *Merck Millipore, Darmstadt, Alemania*) y, posteriormente, incluidas en Paraplast (*Histosec®*, *Merck Millipore, Darmstadt, Alemania*) nuevo. Para las muestras congeladas, éstas fueron puestas en nitrógeno líquido posterior a la extracción del hígado y almacenadas a -80°C.

#### 5. Procedimiento previo de determinación del perfil de ácidos grasos hepático

Mediante prestación de servicios externos, se realizó el análisis de los ácidos grasos hepáticos y el contenido total de grasa de las muestras extraídas. Éste análisis fue realizado por

el Proyecto FONDECYT 1140547: “*Hepatoprotective mechanisms of Rosa rubiginosa oil (Rosa mosqueta) in preconditioning against ischemia reperfusion injury in healthy and steatotic liver and prevention of liver steatosis: role of Nrf2, PPAR-alpha, NF-κB and expression of cytoprotective genes*”, a cargo de la Dra. Gladys Tapia Opazo. El procedimiento fue el siguiente:

- Extracción de materia grasa: Los lípidos totales fueron obtenidos a partir de homogeneizados de hígado utilizando la técnica de extracción de Bligh y Dyer modificada. Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en agua destilada y los componentes lipídicos se extrajeron con una solución de cloroformo y metanol en una relación 2:1, seguido de centrifugación (2.000 x g, durante 10 minutos a temperatura ambiente). Después de la extracción de la fase clorofórmica, el disolvente se dejó evaporar y las muestras fueron almacenadas a -20°C.

- Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos: Previo al estudio de cromatografía de gas-líquida, los ácidos grasos y fosfolípidos de hígado, fueron metilados por incubación (100°C) con metanol BF<sub>3</sub> (14%) y los ésteres metílicos de ácidos grasos, se extrajeron con hexano. Después de una evaporación con nitrógeno y re-suspensión en diclorometano, las muestras fueron almacenadas a -20°C, para el estudio de cromatografía de gas-líquida. Los valores se expresaron como g de grasa/100 g de hígado.

- Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos: El análisis, se realizó mediante cromatografía de gas-líquida acoplada a ionización en llama, como método de detección. El equipo utilizado, fue un Hewlett-Packard, modelo 7890A, acoplado a una columna capilar (J and WDB-FFAP, 30 m, 60,25 mm; I.D. 0,25 mm), utilizándose hidrógeno como fase móvil. La identificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos, se llevó a cabo mediante comparación de sus tiempos de retención, con aquellos de los estándares individuales purificados. Los valores se expresaron como g/100 g de ésteres metílicos de ácidos grasos.

## **6. Estudio histológico**

Con la finalidad de evaluar la histología del tejido en las diferentes condiciones de los grupos experimentales (4 animales por grupo), de cada taco de inclusión, se obtuvieron cortes de 5

µm en porta-objetos limpios (EDLAB, cat. n°. 7105) y se dejaron secar en un canastillo durante 24 horas.

Los cortes, una vez secos y adheridos fueron sometidos al siguiente protocolo para tinción con hematoxilina eosina:

- Desparafinación en dos cambios con xilol (*Merck Millipore, Darmstadt, Alemania*) por 10 minutos cada uno y rehidratación con batería de etanoles (*Merck Millipore, Darmstadt, Alemania*) de graduación descendente (100°, 100°, 95°, 70° por 5 minutos cada uno) hasta llevar a agua destilada; luego, se procedió a teñir los cortes con solución de Hematoxilina de Mayer (Solución modificada según *Lillie, ScyTek Laboratories, Utah, U.S.A.*) para tinción nuclear (5 minutos), y se viró en agua corriente (10 minutos), más lavado rápido en agua destilada; después, se dejaron los cortes en Eosina Y (*Thermo Fisher Scientific, U.S.A.*) por 30 segundos, para después lavarlos en agua destilada. Finalmente, se deshidrataron los cortes con una batería de etanoles de graduación ascendente (70°, 95°, 100°, 100° por 1 minuto cada uno), seguidos de dos pasos por xilol (10 minutos cada uno) y se montaron con Entellán® (*Merck, Darmstadt, Germany*).

El conteo de las células hepáticas con vesículas lipídicas, se realizó mediante microscopía óptica de luz (*Olympus CX31, Tokio, Japón*). Se contabilizaron 10 campos a aumento mayor de 400x por corte. Al obtener estos datos se calculó el porcentaje de hepatocitos con vesículas lipídicas por cada placa.

## **7. Medición de los niveles de proteínas Perilipinas 2 y 5**

### **7.1 Inmunofluorescencia indirecta**

Con el objetivo de identificar las proteínas perilipinas 2 y 5, se utilizaron los anticuerpos policlonales ADFP Antibody anti- PLIN2 (rabbit IgG PA1-16972 *Thermo Fisher Scientific, Rockford, U.S.A.*) y LDSP5 (goat IgG T-12) anti-PLIN5 (sc-240627 *Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe*). De cada taco de inclusión de los grupos experimentales (4 animales por grupo), se obtuvieron cortes de 5 µm en porta-objetos cargados positivamente (*Suprefrost® Plus*

*Microscope Slides, Fisherbrand®*, *Fisher Scientific, U.S.A.*) y se dejaron secar en un canastillo durante 24 horas. Una vez secos y adheridos fueron sometidos al siguiente protocolo:

1. Desparafinación en dos cambios con xilol, por 15 minutos cada uno y rehidratación con batería de etanoles, de graduación descendente (100°,100°,95°,70° por 5 minutos cada uno para PLIN2 y 10 minutos para PLIN5) hasta llevar a agua destilada por 10 minutos.
2. Recuperación de antigenicidad: Se precalentaron los cortes en coplins, con buffer citrato a pH 6,1 (10 mM de citrato de sodio; 0,05% Tween-20) para PLIN2 y buffer EDTA a pH 8 (0,05% p/v) para PLIN5 hasta alcanzar 90°C-100°C en vaporera, durante 30 minutos (*Oster modelo 5711, FL, EE.UU.*), dejando enfriar posteriormente, a temperatura ambiente por 20 min, seguido de un lavado con agua destilada por 5 min. Luego, bloqueo con PBS/BSA 1% para PLIN2 y al 3% para PLIN5 durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Incubación con anticuerpo primario y secundario en cámara húmeda: Se utilizó una dilución de anticuerpo primario de 1:200 en PBS/BSA 1% para PLIN2 y dilución de 1:10 en PBS/BSA 3% más tritón X-100 al 0,01% para PLIN5, incubándose el control negativo, solo con PBS/BSA, durante toda la noche a 4°C. Luego de 10 lavados con PBS/BSA de 5 minutos cada uno, se procedió a la incubación de los cortes con anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 conjugated (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), *Thermo Fisher Scientific, Rockford, U.S.A.*) para PLIN2 y anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 conjugate (Donkey anti-Goat IgG (H+L), *Thermo Fisher Scientific, Rockford, U.S.A.*) para PLIN5, ambos en dilución 1:400 en PBS/BSA, por 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Se agregó DAPI (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, U.S.A.*) en dilución 1:400 para marcaje nuclear. Luego de 10 lavados con PBS/BSA por 5 minutos, finalmente los cortes se montaron con Dako (Dako Fluorescence mounting medium, *Agilent Thecnologies, California, U.S.A.*)

Para el análisis de las muestras, se utilizó el programa ImageJ, con el cual se determinó la relación de la cantidad de partículas por núcleo en 10 campos a aumento mayor de 400x, en cada uno de los cortes, utilizando el Microscopio confocal, C2 Plus Espectral Nikon (Modelo

eclipse TI, cámara Nikon). Se determinó el promedio de los núcleos por campo en cada placa y la cantidad de proteína presente en el campo respectivo.

## **8. PCR en tiempo real para PLIN2, PLIN5 y PPAR- $\gamma$**

### **8.1 Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA se utilizó el mini kit de extracción RNeasy Lipid Tissue (cat. No. 74804, *QIAGEN, U.S.A.*). A partir de las muestras de hígado congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se extrajo un trozo de 2-3 mm de diámetro (aproximadamente 15 mg) y se depositó en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml con 1 ml de QIAzol Lysis Reagent para homogenización, manteniéndolo a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se agregó 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo, agitándolo vigorosamente por 15 segundos, dejándose incubar a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Luego se procedió a centrifugar a 6000 rpm durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se traspasó el sobrenadante, cuidando de no tocar el pellet formado en el fondo, a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, estéril con 600  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y se agitó usando un vórtex, hasta obtener una mezcla homogénea. Se transfirieron 700  $\mu\text{l}$  de la mezcla a la columna RNeasy Mini spin con el tubo de recolección de 2ml, procediéndose a centrifugar a temperatura ambiente por 15 segundos a 10.000 rpm, descartando el filtrado. Posteriormente, se repitió el procedimiento con el resto de mezcla, descartando el filtrado. Se agregó 700  $\mu\text{l}$  de buffer RW1 a la columna RNeasy, centrifugándose por 15 segundos a 10.000 rpm, descartando el filtrado, luego se agregó 500  $\mu\text{l}$  de buffer RPE, centrifugando por 15 segundos a 10.000 rpm, descartando el filtrado. Posteriormente, se agregó 500  $\mu\text{l}$  de buffer RPE, centrifugándose por 2 minutos a 10.000 rpm. Finalmente, la columna RNeasy se colocó en un nuevo tubo de 1,5 ml, agregando 40  $\mu\text{l}$  de agua RNase-free y se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto, para luego conservar el filtrado que contiene todo el RNA capturado por la columna y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **8.2 Cuantificación e integridad del RNA extraído**

Se cuantificó el DNA extraído, con un lector de absorbancias (Espectrofotómetro *Epoch Bio-Tek, U.S.A.*) mediante el *software Gen5™ de BioTek, U.S.A.*, a una longitud de onda de 260 y 280 nm, el cual calcula automáticamente la concentración de RNA. Se limpió la placa con

etanol al 70% secando cuidadosamente. Se utilizó como blanco, 2 µl de agua libre de nucleasas y posteriormente se aplicó 2 µl de muestra en cada pocillo. Para la síntesis de cDNA, solo se utilizaron las muestras que tuvieron una relación RNA/proteínas mayor a 1,6.

### **8.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA**

Se hizo un mix de reacción por cada muestra de RNA: 1 µl de hexanucleótidos al azar como partidores (Random Primer 50 ng/µl, *Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, U.S.A.*), 0,5 µg de RNA total y dNTP 10 mM, el que se llevó a un volumen de 12 µl con agua DEPC.

Las muestras en los mix se desnaturaron por 5 minutos a 65°C y se pusieron en hielo. En seguida se les agregó 8 µl del master mix con las siguientes especificaciones por reacción:

- 4µl de 5X cDNA Synthesis Buffer, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40 U/µl), 1 µl de transcriptasa inversa thermoscript® RT (15 U/µl) (*Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, California, U.S.A.*) por reacción y finalmente 1 µl de agua DEPC, logrando un volumen de 20 µl. A continuación, se llevó a cabo la reacción de conversión a cDNA en el termociclador (Equipo Techne TC 5000, *Thermo® electron corporation, Milford, MA, U.S.A.*), utilizando el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 40 minutos a 55°C, 5 minutos a 85°C y mantenidas a 4°C hasta su almacenamiento final. El producto resultante (cDNA total) se almacenó a -20°C.

Con un lector de placas (Espectrofotómetro *Epoch Bio-Tek, U.S.A.*) se obtuvo la concentración de cDNA de cada muestra, para posteriormente ajustarlas a una concentración de 300 ng/µl en un volumen de 30 µl.

### **8.4 PCR en tiempo real utilizando sondas SYBR green**

Para medir los niveles de mRNA de PLIN2, PLIN5 y PPAR-γ, se desarrolló la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), basada en el agente intercalante de doble hebra fluorescente SYBR Green II Platinum, SYBER Green qPCR SuperMix UDG [(SYBR Green I, 60 U/ml Platinum Taq DNA polymerase, 40 mM Tris-HCl pH 4.8, 100 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dUTP, 40 U/ml UDG) de *Invitrogen, U.S.A.*]. Las moléculas de SYBR Green se introducen en la doble hélice de ADN

con alta afinidad, por lo que la intensidad de fluorescencia aumenta, de manera proporcional al ADN amplificado, en cada ciclo de la reacción. Como sistema de detección de fluorescencia se utilizó un agente intercalante de ADN de doble hebra, denominado SYBR Green I (*Invitrogen, U.S.A.*).

Se diseñaron partidores específicos para cada gen en estudio. Dichos oligonucleótidos fueron:

GEN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	T <sub>m</sub> F	T <sub>m</sub> R	Tamaño de amplicón (pb)
PLIN2	Forward: 5' AAGCCGAGCAACTATGAACG Reverse: 3' CTCCTGGCTCTTTTGTTTGG	55, 4°C	54°C	108
PLIN5	Forward: 5' ACCTTTGCTGATGCACACTG Reverse: 3' CCAAATCCAGGAACATCC	56,0°C	53,1°C	109
PPAR- $\gamma$	Forward: 5' ATGGAAGACCACTCGCATTC Reverse: 3' AACCATTGGGTCAGCTCTTG	55,0°C	50,0°C	114

Las muestras se amplificaron en triplicado en placas de 96 pocillos. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l con los siguientes elementos:

	Cantidad por cada tubo de reacción
Master mix SYBR Green	5 $\mu$ l
Primers 1 y 2 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	2 $\mu$ l
Muestra (templado)	2 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real marca Agilent Stratagene Mx3000<sup>®</sup>, USA.

Las condiciones térmicas de la amplificación fueron las siguientes:

1	2 (40 ciclos)	3
10 min 95°C	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C
	30 segundos a 60°C	30 segundos a 60°C
	30 segundos a 72°C	30 segundos a 72°C

Al final de cada reacción, se llevó a cabo un protocolo de disociación, para asegurar la presencia del producto de PCR específico que se intentaba amplificar. Cuando se observa sólo un peak entre 75°C y 85°C, quiere decir que el diseño del primer es específico. Los cambios en la expresión génica se calcularon empleando el método de cuantificación relativa de doble delta de CT ( $\Delta\Delta CT$ ) reportado por Livak y Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001), usando la siguiente ecuación:

$$\text{Nivel de expresión} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

donde  $\Delta\Delta CT = (CT, \text{ gen de interés} - CT, \text{ gen de referencia}) \text{ Tratamiento} - (CT, \text{ gen de interés} - CT, \text{ gen de referencia}) \text{ calibrador}$ . Como gen de referencia interna, se empleó la proteína  $\beta$ -actina, dado que se expresa de manera constitutiva a nivel hepático. El análisis de los resultados del producto amplificado, se realizó a través del programa *Stratagene Mx3000 Pro (U.S.A.)*.

## 9. Medición de los niveles de PPAR- $\alpha$

### 9.1 Inmunohistoquímica

Con el objetivo de identificar el factor de transcripción PPAR- $\alpha$ , se utilizó el anticuerpo primario policlonal anti-PPAR- $\alpha$  (rabbit IgG 70R-13953 *Fitzgerald Industries International, MA, U.S.A.*). De cada taco de inclusión, de los grupos experimentales (4

animales por grupo), se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  en porta-objetos cargados positivamente (*Suprefrost® Plus Microscope Slides, Fisherbrand®, Fisher Scientific, U.S.A.*) y se dejaron secar en un canastillo durante 24 horas. Una vez secos y adheridos, fueron sometidos al siguiente protocolo: Desparafinación en dos cambios con xilol por 10 minutos cada uno y rehidratación con batería de etanoles de graduación descendente (100°, 100°, 95°, 70° por 5 minutos cada uno) hasta llevar a agua destilada. Luego, se realizó el proceso de recuperación antigénica, incubando los cortes a 95°C en buffer EDTA (0,05% p/v, pH 8,0) en vaporera (*Oster modelo 5711, FL, EE.UU.*) por 45 minutos. Luego, bloqueo de peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno 3% por 20 minutos a temperatura ambiente. Después, bloqueo de uniones inespecíficas con solución de bloqueo ready-to-use (*ImmPress™ Reagent Anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories, CA., EE.UU.*) por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-PPAR- $\alpha$ , en dilución 1:250 en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Después, se incubaron los cortes con polímero marcado con peroxidasa (*ImmPress™ Reagent Anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA., EE.UU.*) por 20 minutos a temperatura ambiente. Por último, para revelar la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó una solución de DAB (*ImmPACT DAB, Vector Laboratories, CA., EE.UU.*). Para realizar el contraste nuclear, se utilizó Hematoxilina de Mayer (Solución modificada según *Lillie, ScyTek Laboratories, Utah, U.S.A.*). Finalmente, se deshidrataron los cortes con una batería de etanoles de graduación ascendente (70°, 95°, 100°, 100°), se aclararon con dos cambios con xilol y se montaron con Entellán® (*Merck, Darmstadt, Germany*).

El conteo de núcleos positivos, se realizó mediante microscopía óptica de luz (*Olympus CX31, Tokio, Japón*). Se contabilizaron 10 campos a aumento mayor 400x por corte. Al obtener estos datos se calculó un porcentaje de positividad de núcleos por cada placa.

## **10. Medición de los niveles de la proteína ACOX-1**

### **10.1 Western blot**

De las muestras de hígado obtenidas, que fueron congeladas a -80°C para su análisis, se extrajeron 150 a 500 mg de tejido hepático, el que luego fue homogeneizado en un buffer

de extracción de proteínas totales de fabricación propia (NP40 0.6%, NaCl 150 mM, Hepes pH 7,9 a 10 mM, EDTA pH 7,9 a 1 mM, PMSF 0,5 mM, inhibidores de proteasas: Benzamidina 2 mM, Peptatin A 5 µg/mL, Leupetina 5 µg/mL, Aprotinina 5 µg/mL y Ortovanadato 100 mM).

La concentración de proteínas totales de cada homogeneizado, se determinó mediante el método de Bradford, y se calculó la cantidad de buffer denaturante, conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS) para lograr una concentración constante de proteínas de 50 µg/ul.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con gel concentrador (Tris-HCl pH 6,8 a 0,5 M, SDS 0,4%, persulfato de amonio 10% y TEMED) y gel separador al 10% (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4%, acrilamida/bis acrilamida 30 0,8%, Persulfato de amonio 10% y TEMED), utilizando como amortiguador de corrida Tris base 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%. Se cargaron 10 ul de los extractos totales y se realizó la electroforesis a 100 v durante 1 hora y a 150 v hasta el final de la corrida. Luego, se realizó una transferencia de 1 hora a amperaje constante (350 mA) a una membrana de nitrocelulosa de poro de 45 µm (*adyantec MFS, USA*) en buffer de transferencia utilizado (Tris base 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8,3). Se comprobó la transferencia de proteínas utilizando Rojo Ponceau. Se realizó un bloqueo de una hora con Albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBS (Tris 0,1 M, NaCl 1M, pH 7,5). Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T (TBS + Tween-20 al 0,3%). Luego de esto, la membrana de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo primario Anti-ACOX-1 (Anticuerpo (H-140) sc-98499, *Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europe*) en dilución 1:500 preparado en BSA-TBS al 0,1%. Se incubó durante 3 noches y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Posterior a esto, se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721), *ABCAM, U.S.A.*) diluido en 1:10.000 preparado en BSA-TBS al 0,1%, durante 1 hora y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Para normalizar las proteínas medidas, se incubó durante una hora con Anticuerpo Anti-β-actina (Actin pan Antibody ACTN05 (C4), *Thermo Fisher Scientific, Rockford, U.S.A.*) con una dilución de 1:5000 con el mismo protocolo señalado anteriormente y con un anticuerpo secundario Anti-mouse 1:10.000 (Rabbit anti-Mouse IgG H&L HRP, ab97046, *ABCAM, U.S.A.*).

Se utilizó un sistema de detección con quimioluminiscencia (EZ-ECL kit Enhanced Chemiluminescence Detection Kit for HRP, *Biological Industries, U.S.A.*) con solución A de luminol/enhancer y solución B de peróxido de hidrógeno en una relación de 1:1.

La señal quimioluminiscente, fue capturada por el equipo C-Digit Blot® Scanner (*LI-COR, Inc., U.S.A.*) y digitalizada mediante el Software Image Studio™ (*LI-COR, Inc., U.S.A.*). El análisis densitométrico de las bandas, fue realizado mediante el Software UN-SCAN-IT gel™ (*Gel & Graph Digitizing Software, Versión 6.1 de Silk Scientific Corporation® 1988-2005, Utah, EE.UU.*). La expresión de los resultados está expresada como unidades densitométricas.

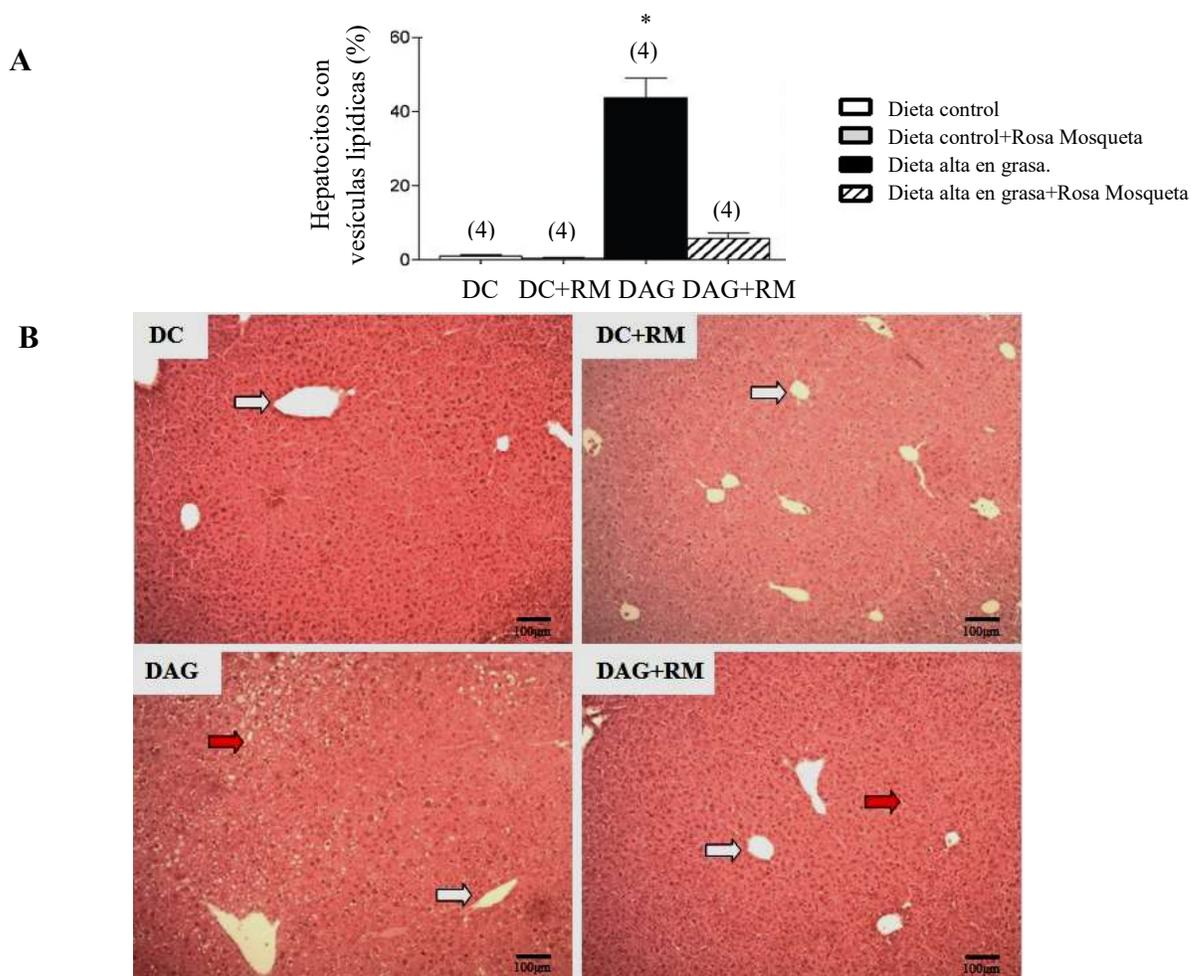
## **11. Expresión de resultados y análisis estadístico**

Los resultados finales se expresaron como promedios  $\pm$  el error estándar de la media para 4-9 animales por grupo experimental. La evaluación de la distribución normal de los datos, se realizó mediante el test Shapiro Wilk. Las diferencias entre los grupos experimentales, se evaluaron mediante el test de ANOVA unifactorial, seguido del test de Newman Keuls, con un límite de confianza de 5% ( $p < 0,05$ ). (*GraphPad Prisma Version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.*).

## RESULTADOS

### 1. Prevención de la esteatosis hepática por la suplementación de aceite de RM.

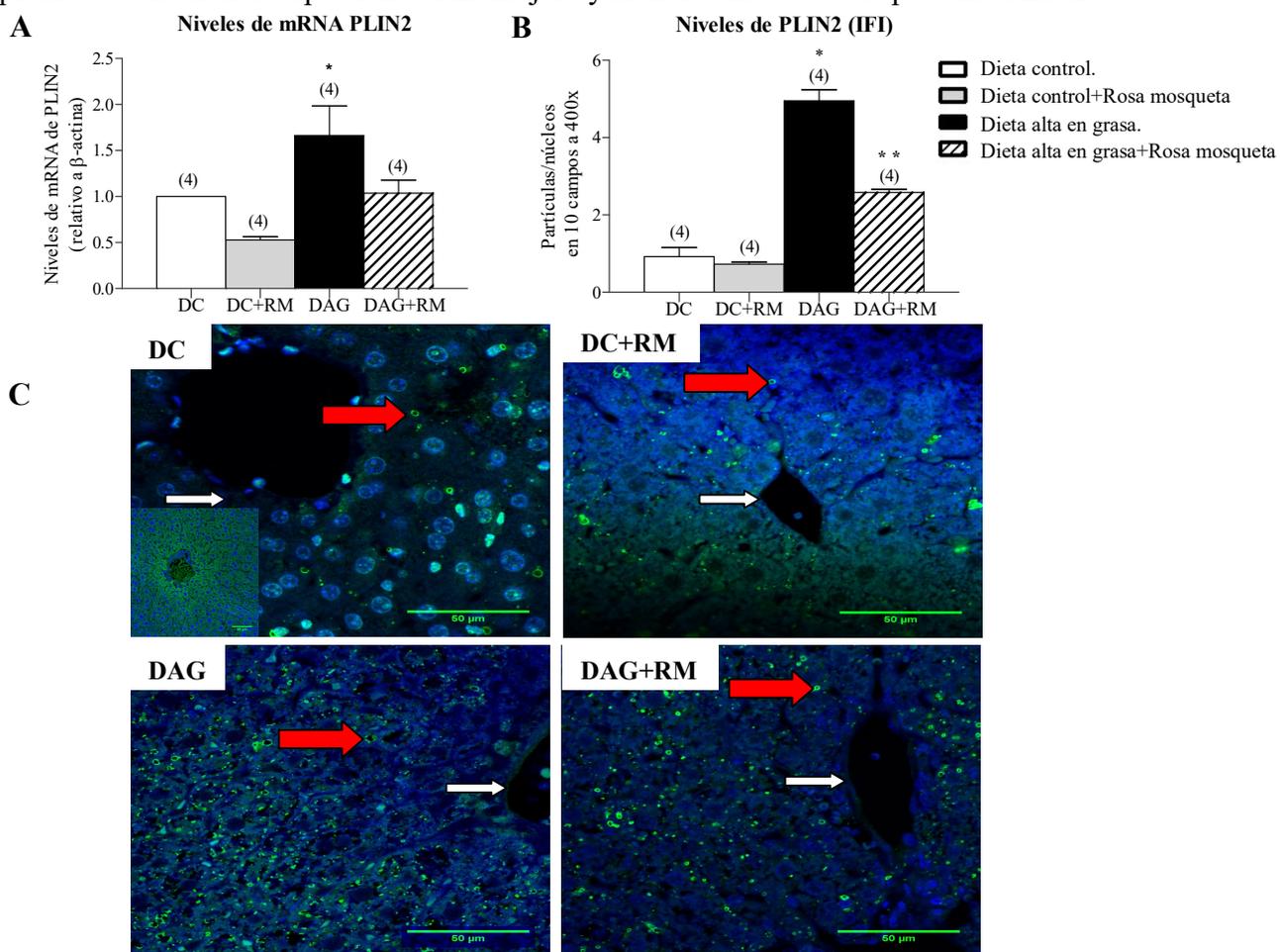
Con la finalidad de evaluar la histología del tejido y el grado de esteatosis hepática en las diferentes condiciones experimentales, se realizó la tinción HE y se evaluó el porcentaje de hepatocitos con vesículas lipídicas a través de microscopía de luz (Fig. 1). Los grupos DAG y DAG+RM, muestran esteatosis hepática, con un 43.8% y 6,2% de infiltración de grasa, respectivamente (Fig. 1A y B). En contraste, los grupos controles DC y DC+RM muestran una arquitectura normal, sin presencia de gotas lipídicas (Fig 1A y B). Estos datos sugieren que el aceite de RM, previene la esteatosis hepática generada por una dieta alta en grasa.



**Figura 1. Histología hepática.** (A) Cuantificación de los hepatocitos con vesículas lipídicas de los grupos. (B) Imagen representativa de cortes de tejido hepático de ratón, teñido con HE (hematoxilina-eosina). Flecha blanca: indica vena central, flecha roja: indica gotas lipídicas. La barra de calibración indica 100 µm. Los valores fueron expresados como promedio  $\pm$  EEM de 4-9 animales por grupo experimental. \* indica diferencia significativa respecto a todos los grupos experimentales ( $p < 0,05$  ANOVA unifactorial y prueba de Newman - Keuls).

## 2. Menores niveles de mRNA y de PLIN2, asociados a la suplementación con aceite de RM.

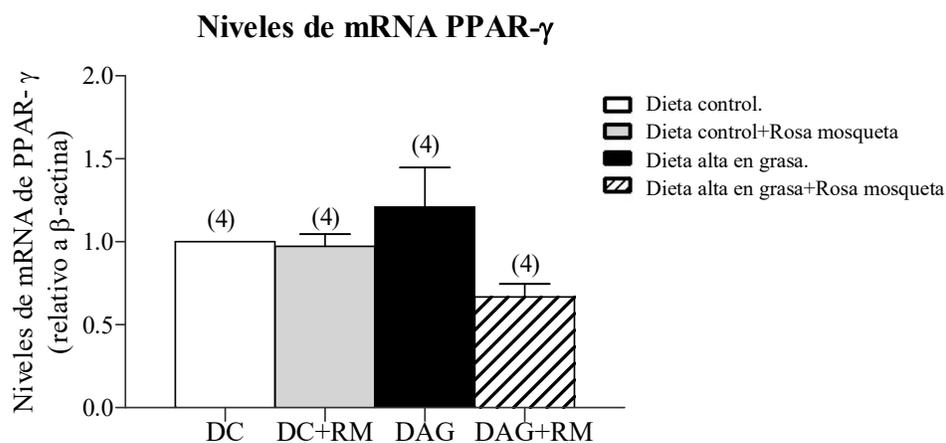
Con el objetivo de evaluar los cambios en la proteína PLIN2 en el hígado, se cuantificó los niveles de mRNA y de la proteína a través de qPCR e IFI, respectivamente. Como se muestra en la figura 2, los niveles de mRNA (Fig. 2A) y de PLIN2 (Fig. 2B y C) son menores significativamente en el grupo DAG+RM (barra achurada) con respecto al grupo DAG (barra negra). Interessantemente, no se observó cambios en el mRNA ni en los niveles de proteína en el grupo DC+RM (barra gris). Los resultados sugieren que la administración con aceite de RM, promueve una menor expresión del mensajero y menores niveles de la proteína PLIN2.



**Figura 2.** Cambios en la proteína PLIN2, asociados a la suplementación con aceite de RM. (A) Niveles de mRNA de PLIN2 por qPCR. (B) Análisis de la cuantificación de PLIN2 por inmunofluorescencia indirecta. La cuantificación de PLIN2, se realizó a través de la razón número de partículas/número de núcleos en 10 campos observados. (C) Imagen representativa de cada grupo, en azul: marcaje de núcleo con DAPI, en verde: marcaje de PLIN2. Flecha roja: PLIN2. Flecha blanca: Vena central. En grupo DC, el recuadro amplificado muestra el control negativo. Barra de calibración corresponde a 50  $\mu$ m. Los valores fueron expresados como promedio  $\pm$  EEM de 4-9 animales por grupo experimental. \* indica diferencia significativa sobre todos los grupos experimentales; \*\* indica diferencia significativa respecto los grupos DC y DC+RM ( $p < 0,05$ ; ANOVA unifactorial y prueba de Newman - Keuls).

### 3. Los niveles de mRNA de PPAR- $\gamma$ , no son modificados por la suplementación con aceite de RM.

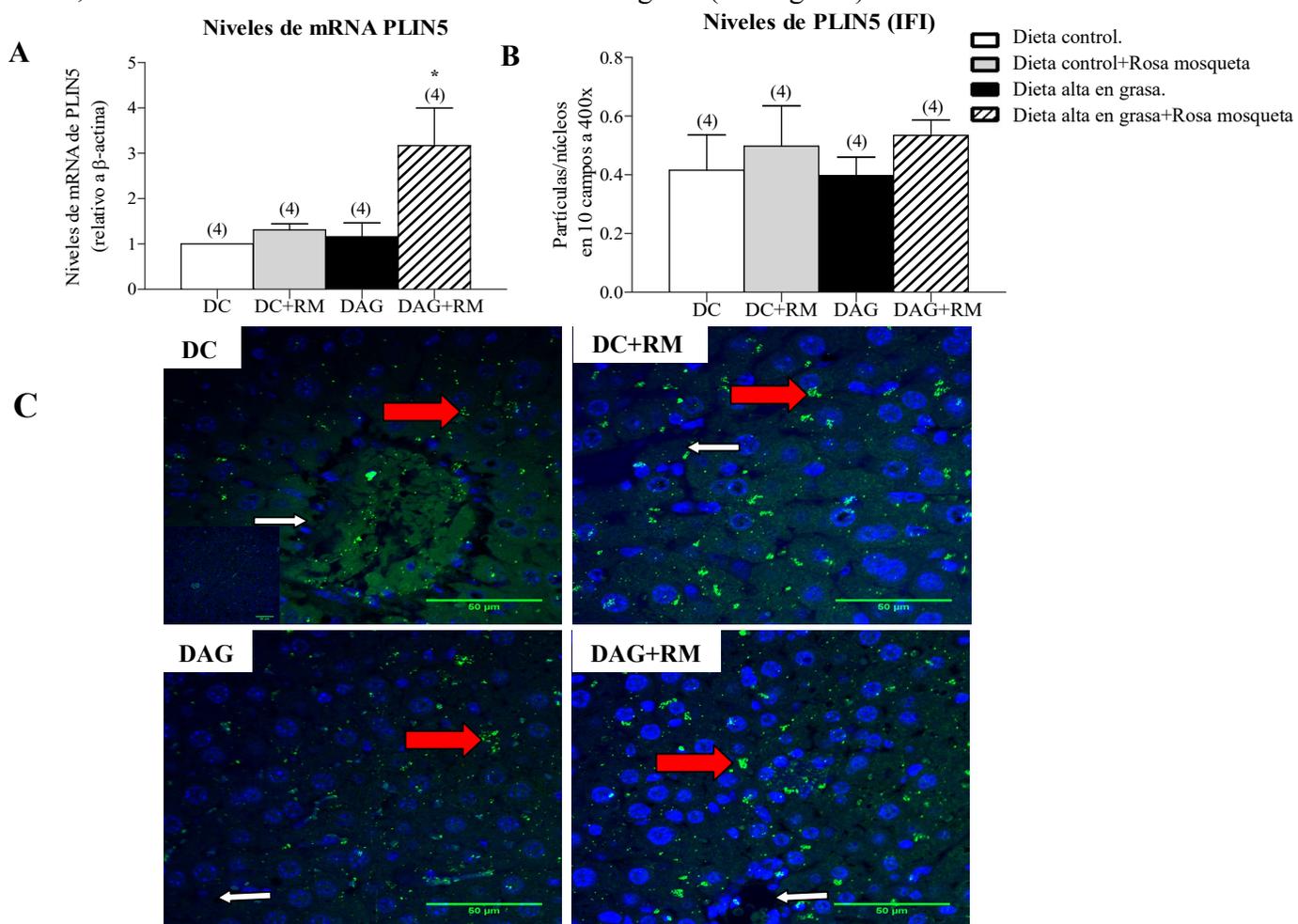
Con el objetivo de evaluar los cambios en los niveles de mRNA de PPAR- $\gamma$  en el hígado, se realizó la técnica de qPCR en los grupos experimentales. Como se observa en la figura 3, los niveles de mRNA de PPAR- $\gamma$ , no tienen diferencias estadísticamente significativas, entre ninguno de los grupos experimentales.



**Figura 3. Cambios en PPAR- $\gamma$ , asociados a la suplementación con aceite de RM.** En el gráfico se muestra el análisis de la determinación de mRNA de PPAR- $\gamma$  por qPCR. Los valores fueron expresados como promedio  $\pm$  EEM de 4-6 animales por grupo experimental. ( $p < 0,05$ ; ANOVA unifactorial y prueba de Newman - Keuls).

#### 4. Los niveles de la proteína PLIN5, no fueron modificados por la suplementación con aceite de RM.

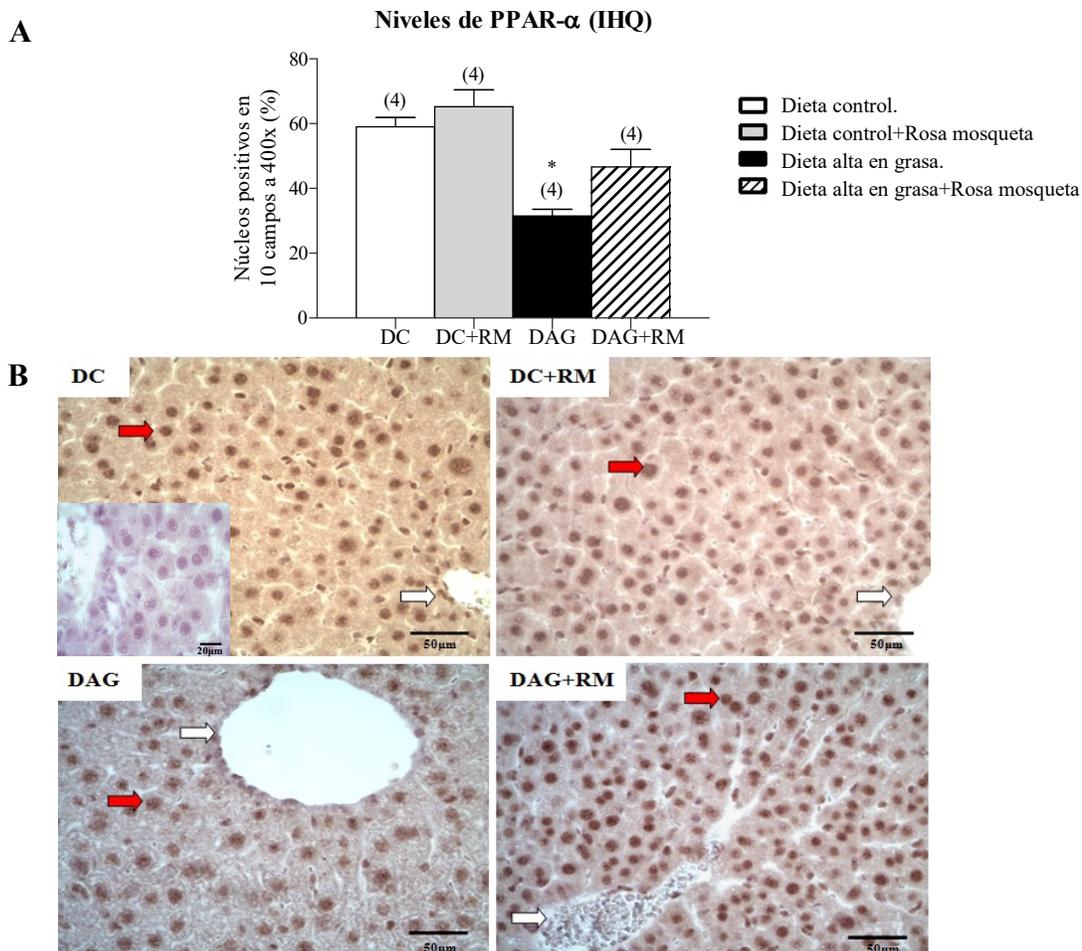
Con el objetivo de cuantificar los cambios en la proteína PLIN5, se realizó la medición de los niveles de mRNA y de esta proteína a través de qPCR e IFI, respectivamente. Los niveles de mRNA de PLIN5 fueron mayores en el grupo DAG+RM (Fig. 4A, barra achurada), respecto a todos los grupos experimentales. En contraste, no se observaron diferencias significativas en los niveles de la proteína (Fig. B y C). Estos resultados sugieren un papel inverso de la suplementación con aceite de RM sobre los niveles de mRNA de PLIN5 y PLIN2, en los animales alimentados con dieta alta en grasa (ver Fig. 2A)



**Figura 4. Cambios en la proteína PLIN5, asociados a la suplementación con aceite de RM.** (A) Niveles de mRNA de PLIN5, por qPCR. (B) Análisis de la cuantificación por inmunofluorescencia indirecta. La cuantificación de PLIN5, se realizó a través de la razón número de partículas/número de núcleos en 10 campos observados. (C) Imagen representativa de cada grupo estudiado, en azul: marcaje de núcleo con DAPI, en verde: marcaje de PLIN5. Flecha roja: PLIN5. Flecha blanca: Vena central. En grupo DC, el recuadro amplificado muestra el control negativo. Barra de calibración corresponde a 50  $\mu$ m. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM de 4-9 animales por grupo experimental. \* indica diferencias significativas respecto a los grupos experimentales. ( $p < 0,05$ ; ANOVA unifactorial y prueba de Newman - Keuls).

## 5. Restauración de los niveles de PPAR- $\alpha$ , asociados a la suplementación con aceite de RM.

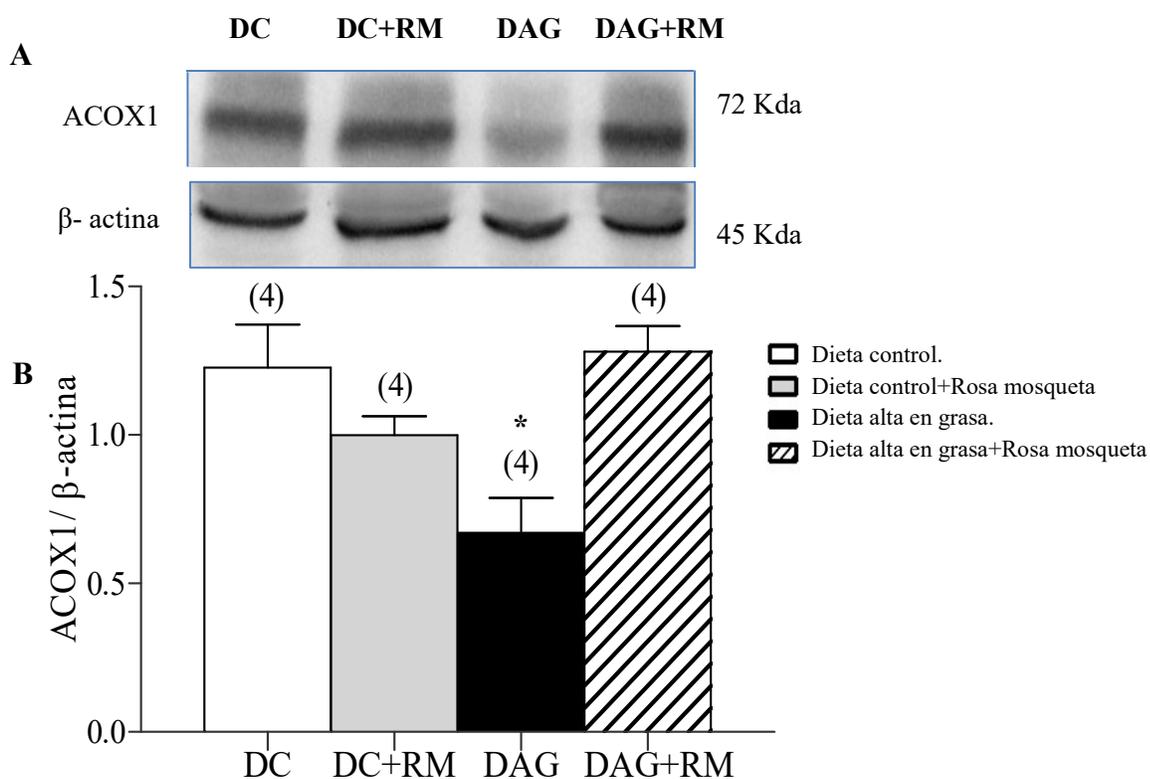
Con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con aceite de RM en los niveles de PPAR- $\alpha$ , se llevaron a cabo IHQ en cortes de hígado. Como se esperaba, el grupo DAG mostró una disminución de la marca positiva nuclear para PPAR- $\alpha$  comparado al grupo DC (Fig. 5A y B). Interesantemente, la suplementación con aceite de RM en el grupo DAG+RM (barra achurada), restableció los niveles de PPAR- $\alpha$  a valores similares a los encontrados en los grupos controles (barra blanca y gris). Los resultados sugieren que el aceite de RM, revierte el efecto generado por la dieta alta en grasa sobre los niveles de PPAR- $\alpha$  en el hígado.



**Figura 5. Cambios en PPAR- $\alpha$ , asociados a la suplementación con aceite de RM. (A)** Niveles nucleares hepáticos de PPAR- $\alpha$ , por IHQ. La medición de PPAR- $\alpha$  se realizó mediante el conteo de núcleos positivos en 10 campos por corte. **(B)** Imagen representativa de los grupos experimentales. Flecha roja: núcleos positivos para PPAR- $\alpha$ . Flecha blanca: vena central. En grupo DC, el recuadro amplificado muestra el control negativo. Barra de calibración corresponde a 50  $\mu$ m. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM de 4-9 animales por grupo experimental. \* indica diferencia significativa sobre los grupos experimentales. ( $p < 0,05$ ; ANOVA unifactorial y prueba de Newman - Keuls).

## 6. Restauración de los niveles de ACOX1, asociados a la suplementación con aceite de RM.

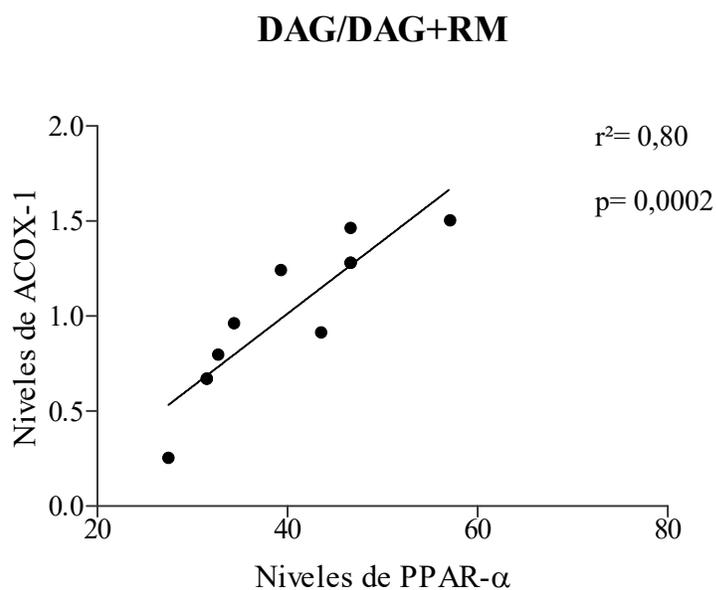
Con la finalidad de evaluar el efecto de la suplementación con aceite de RM en los niveles hepáticos de ACOX-1, se cuantificó esta proteína a través de WB. Los niveles de ACOX-1 (Fig. 6A y B), fueron menores en el grupo DAG respecto a todos los grupos experimentales. Como se esperaba, la suplementación con aceite de RM restableció los niveles de ACOX-1 en el grupo DAG+RM a valores controles (grupo DC y DC+RM). En conjunto estos datos sugieren que el aceite de RM, podría favorecer la oxidación de los ácidos grasos por el restablecimiento de los niveles de ACOX-1, en los animales alimentados con dieta alta en grasa.



**Figura 6. Cambios en ACOX1, asociados a la suplementación con aceite de RM.** (A) Imagen representativa de Western blot contra ACOX-1 en los grupos estudiados. (B) Análisis densitométrico de las bandas, donde se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  EEM de 4-9 animales por grupo experimental. \* indica diferencia significativa respecto a los grupos experimentales. ( $p < 0,05$ ; ANOVA unifactorial y prueba de Newman - Keuls).

## 7. Correlación positiva entre PPAR- $\alpha$ y ACOX-1.

Con la finalidad de evaluar si PPAR- $\alpha$  y ACOX-1 muestran una relación entre sí, se realizó un gráfico de correlación para el grupo DAG y DAG+RM (Fig. 7). Ambas moléculas, presentaron una correlación positiva en los grupos. Los resultados sugieren que ambas moléculas están relacionadas entre sí en forma positiva, a mayores niveles de PPAR- $\alpha$ , mayores niveles de ACOX-1 y que comparten un 80% de su varianza.



**Figura 7. Correlación entre PPAR- $\alpha$  y ACOX-1.** Se muestra la correlación de los niveles de PPAR- $\alpha$  y ACOX-1 en los grupos DAG y DAG+RM. ( $p < 0,05$  indica significancia estadística).

## DISCUSIÓN

La EHGNA, es una patología crónica que ha ido en aumento en los últimos años, asociado a alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y la obesidad. La esteatosis hepática se considera asintomática y reversible, por lo mismo ha sido un foco de investigación importante, con el fin de prevenir la progresión a estados irreversibles de alteración hepática.

Estudios previos en el laboratorio donde se realizó esta tesis, muestran que la administración de aceite de RM previene de manera significativa el desarrollo de esteatosis hepática, en un modelo de obesidad, inducido por la alimentación con dieta alta en grasas (15). Los mecanismos responsables de estos efectos no han sido descritos totalmente, por lo que este estudio tuvo por objetivo, determinar si en la prevención de la esteatosis hepática mediante la administración de aceite de RM, se promueven cambios en los niveles y/o expresión génica de las perilipinas 2, 5, ACOX-1 y en los receptores activados por proliferadores peroxisomales PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\alpha$ .

Al evaluar el grado de esteatosis hepática, mediante la cuantificación de los hepatocitos con gotas lipídicas (resultados de la Fig. 1), se confirmó que el aceite de RM previene el desarrollo de la esteatosis en forma significativa, tal como se publicó en estudios previos del grupo de laboratorio, en los que se observó que: i) aumenta los niveles de EPA y DHA hepáticos, ii) reduce el peso de los ratones y las alteraciones en los niveles de insulina, glicemia y triglicéridos, iii) previene la infiltración hepática de lípidos que conllevan a la esteatosis, y iv) disminuye el estrés oxidativo producido por la dieta alta en grasa (15). En contraste a este resultado, mediante la cuantificación del perfil lipídico de los hígados de cada grupo experimental, se observó el mismo efecto sobre el grado de esteatosis hepática, en el grupo DAG+RM, respecto al grupo DAG.

Los mayores niveles de mRNA y de PLIN2, solo en el grupo con dieta DAG, se asocia a la esteatosis observada en este grupo de animales (Fig. 2) y concuerda con estudios en modelos de ratón *Knock out* para PLIN2, en donde éstos se ven protegidos de la esteatosis hepática (58). En modelos celulares y murinos, en los que se administra una dieta alta en grasa para inducir esteatosis, el mRNA de esta proteína, está altamente expresado, ya que se asocia con la formación de la gota lipídica (33, 34, 58). En cultivos celulares hepáticos de rata, la sobre expresión de PLIN2, incrementa el almacenamiento intracelular de lípidos, mientras que la

disminución de su expresión, la disminuye (59). Diversos modelos han sido propuestos para la acción de PLIN2, uno de éstos, es que es capaz de disminuir la interacción entre ATGL y la gota de lípido. Se propone la posibilidad de que favorecería un cambio conformacional de la superficie de la gota, evitando la unión de otras proteínas, al desplazar a los fosfolípidos de membrana, haciendo menos hidrófoba la superficie (32).

No hubo cambios en los niveles de mRNA de PPAR- $\gamma$  (Fig. 3). PPAR- $\gamma$ , es considerado un regulador maestro de la adipogénesis, expresándose abundantemente en adipocitos maduros, encontrándose también presente en hígados de animales que desarrollan esteatosis hepática. Estudios en células hepáticas de ratón, en que se induce este factor de transcripción, revelan también el aumento de genes adipogénicos y lipogénicos como son SREBP-1c y de PLIN2, asociando la presencia de PPAR- $\gamma$  a la regulación positiva de PLIN2, favoreciendo el desarrollo del hígado graso (60). En los resultados, se esperaba que los niveles de este factor fueran mayores en el grupo DAG y menores significativamente en el grupo DAG+RM, correlacionándose con PLIN2. Algunos estudios mencionan que, no sólo este factor de transcripción influye en la regulación de la expresión de PLIN2 (61). Se ha descrito en células en cultivo con fructosa, que el aumento de los ácidos grasos libres y de TNF- $\alpha$  vía JNK/AP-1, favorecen el aumento de la expresión génica de PLIN2, y que agonistas del receptor farnesoideo X (FXR), miembro de la familia de receptores nucleares, favorecen su disminución (61, 62). Por lo que, si bien en esta tesis, no pudo establecerse una relación directa entre los niveles de PPAR- $\gamma$  y PLIN2, en el grupo DAG, los mayores niveles de PLIN2 podrían ir por vía del aumento TNF- $\alpha$  descrito previamente.

Por otro lado, que el grupo DAG+RM, presente menores niveles de mRNA y de PLIN2 respecto al grupo DAG (Fig. 2), podría ser explicada por el aumento de la oxidación de los ácidos grasos presentes en la gota lipídica, mediante PPAR- $\alpha$ , el que a su vez, al inhibir NF- $\kappa$ B, disminuiría a TNF- $\alpha$  (el cual favorece la expresión génica de PLIN2) o a una mayor afinidad de unión de ATGL a la gota de lípido, posiblemente potenciada por una mejoría de la fluidez de la membrana mediante la incorporación de fosfolípidos por los ácidos omega 3 (63, 64).

Los resultados obtenidos en esta tesis, no muestran cambios en los niveles de PLIN5 (Fig. 4). En la literatura, se le atribuye una función dual a PLIN5, considerándola como reguladora de la lipólisis, principalmente en tejido muscular y más recientemente en hígado; según estos

estudios, PLIN5, favorece el crecimiento de la gota lipídica y posteriormente influye en su hidrólisis (23). Usando cultivos celulares de miocardiocitos, se observó un link directo entre PLIN5 y la mitocondria, en donde se demuestra que la proteína recluta a las mitocondrias a la superficie de la gota de lípido, a través de su región C-terminal y que en condiciones basales, limita la hidrólisis de los ácidos grasos al unirse en forma independiente a ATGL y al coactivador de identificación de genes comparativo (CGI-58), pero que en condiciones de alta demanda energética, mediada por proteína kinasa A (PKA), incrementa el flujo de ácidos grasos a la mitocondria y facilita la interacción de las lipasas a la superficie de la gota lipídica (5, 65).

Por otro lado, el aumento de los niveles de mRNA de PLIN5, es mediado a través de la activación del factor de transcripción PPAR- $\alpha$ , que a su vez, se ve estimulado frente al aumento de la exposición de ácidos grasos, favoreciendo su oxidación, asociación probable en este estudio. El no observar cambios en los niveles de la proteína, puede ser debido a factores post traduccionales, como es la regulación de otras moléculas o a la degradación de la proteína. En un estudio, en ratones *Knock out* de PLIN5, se observó que es necesaria para evitar la acumulación de ácidos grasos libres, la lipotoxicidad y el daño hepático, pero otros estudios, no muestran daño o desarrollo de esteatosis hepática (66, 67). En la actualidad, los estudios *in vivo* son escasos, y además muchos autores ponen de manifiesto que, la interacción de las proteínas lipolíticas que ocurre en la gota lipídica es transitoria, por lo que es posible que no sobrevivan a los análisis realizados mediante técnicas como son la inmunoprecipitación o la inmunohistoquímica (65).

Los niveles de ACOX-1 y de PPAR- $\alpha$  en el grupo DAG+RM, no difieren de los grupos control, lo cual podría mostrar un posible mecanismo por el cual el aceite de RM, previene la esteatosis hepática, inducida por una dieta alta en grasa. Estos efectos, podrían ser producidos gracias a la bioconversión hepática del ALA a EPA y DHA, que son ligandos del factor de transcripción PPAR- $\alpha$ , conocido por ser un regulador maestro de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, favoreciendo la expresión de genes diana prolipolíticos, como son ACOX-1 y CAT-1 (41, 68). Bajo este punto de vista, diversos estudios han demostrado los beneficios del consumo de omega 3 para el tratamiento de la EHGNA. Por un lado, favorece la fluidez de membrana, favoreciendo la unión y la señalización de las proteínas que se unen a ésta (69). En el hígado, estimulan la lipólisis e inhiben la lipogénesis *de novo*, suprimiendo la transcripción

de genes lipogénicos al disminuir la unión al DNA de SREPB 1c y al aumento del catabolismo al estimular a PPAR- $\alpha$  (53). Son sustrato para resolvinas y protectinas (70). La serie E de resolvinas son mediadores lipídicos enzimáticos derivados de EPA y comprenden a la resolvina E1 (RvE1) y resolvina E2 (RvE2). La serie D de resolvinas se derivan enzimáticamente a partir de DHA, ambas tienen un efecto anti-inflamatorio, ya que regulan el tráfico y activación de las células que causan la inflamación, tales como granulocitos, macrófagos, y linfocitos (70). Las protectinas comprenden otro grupo de mediadores lipídicos, generados a partir de 17S-hidroxi-DHA, que es un producto intermediario de DHA. Las protectinas, tienen un papel semejante a la de las resolvinas, en la regulación de la inflamación (71). A nivel hepático, algunos estudios sugieren que los ácidos omega 3, favorecerían el potencial antioxidante de las células, incrementando la actividad de enzimas clave como son la glutatión reductasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa (72).

Por otro lado, en estudios no publicados del laboratorio, en donde se ocupa el mismo modelo de esta tesis, se ha determinado que el aceite de RM: i) disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en plasma, en el grupo DAG+RM en comparación al grupo DAG, alcanzando valores comparables a los del grupo control. Concluyendo que, disminuye la inflamación sistémica en ratones alimentados con dieta alta en grasa, ii) disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo e hígado, iii) restablece los niveles del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y Hemooxigenasa-1 (HO-1) a valores control en el grupo DAG+RM, respecto al grupo DAG. Por lo tanto, la suplementación con aceite RM previene la disminución en los niveles hepáticos de Nrf2 y HO-1 en los ratones alimentados con dieta alta en grasa.

De los resultados anteriores y de los de esta tesis, es importante mencionar, que el aceite de RM, podría estar generando estos efectos, no solo mediante la conversión hepática del ALA en EPA y DHA, sino que también debido a sus otros componentes, como la vitamina C, E, el ácido retinoico y compuestos fenólicos. En la literatura, no se reportan datos en esta área de investigación (esteatosis hepática) sobre los efectos del aceite de RM, pero se conoce su utilización, en el tratamiento de heridas (ratas con heridas cutáneas en la espalda, presentaron mejoras en la cicatrización y reducción de la actividad inflamatoria), osteoartritis y cosmetología (73, 74).

Diversas investigaciones mencionan que la función del ácido retinoico, un derivado de la vitamina A, es mediada por el receptor de ácido retinoico (RAR) y por el receptor retinoideo

X (RXR). El ácido retinoico, inhibe la diferenciación de preadipocitos en animales, mediante la activación del RAR y la regulación negativa de PPAR- $\gamma$ , RXR $\alpha$ , y SREBP 1-c. En cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1, se observó que su administración, disminuía la expresión de PLIN2, resultando en una menor diferenciación y acumulación de ácidos grasos en los adipocitos (75). Un estudio, en donde se administró polifenoles extraídos de la semilla de *Euterpe oleracea* (palma de asaí), rica en compuestos fenólicos, en un modelo de ratón que indujo esteatosis hepática con una dieta alta en grasa, encontró que ésta redujo la ganancia de peso, la ingesta de alimentos, niveles de glucosa, la acumulación de colesterol y triacilglicéridos en el hígado, asociándolo con una reducción de la esteatosis hepática. El mecanismo propuesto, fue la reducción de las expresiones génicas de SREBP-1c y al aumento de la expresión génica de la proteína quinasa dependiente de AMP fosforilada (AMPKp) y al aumento de la actividad antioxidante de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT), sugiriendo un efecto antioxidante (76).

El aceite de RM, contiene aproximadamente 943 mg/kg de  $\gamma$ - tocoferol, valores similares a los encontrados en la literatura (976 mg/Kg) (77). Los tocoferoles mejoran los niveles séricos de algunas enzimas como la alanina amino transferasa y la aspartato amino transferasa (marcadores de daño hepático), disminución de marcadores inflamatorios y de esteatosis en la EHGNA (78). En varios estudios en modelos animales pre-clínicos, han mostrado los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de  $\gamma$ -tocoferol, mediante su capacidad de formar un metabolito activo, otorgándole dos posibles métodos de protección frente al estrés oxidativo: (i) mediante la acción directa, atrapando especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, y (ii) mediante su transformación hepática a  $\gamma$ -carboxymetil-hidroxicromanol. Ambos mecanismos, inhiben el aumento del Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), de TNF- $\alpha$  y la generación de ROS, contribuyendo significativamente a la detención del desarrollo de esteatohepatitis (79). Por último, se ha descrito que tiene la capacidad de aumentar la actividad de Nrf2, factor de transcripción asociado a múltiples mecanismos citoprotectores (80).

## CONCLUSIÓN

De acuerdo a lo observado en esta tesis, se puede concluir que:

- En la prevención de la esteatosis hepática, asociada a la suplementación con aceite de RM, participaría ACOX-1 la cual es regulada por PPAR- $\alpha$ .
- La esteatosis hepática, se asocia a altos niveles de PLIN2 y que,
- Los cambios en los niveles de las proteínas estudiadas, pueden ser resultado de un efecto sumativo o potenciador de los componentes presentes en el aceite de RM.

En resumen, esta tesis muestra uno de los posibles mecanismos por el cual el aceite de RM previene la esteatosis hepática.

## PROYECCIONES A FUTURO

Es necesario realizar estudios, que permitan definir los efectos del aceite de RM, en relación a sus componentes: ALA y su bioconversión en EPA y DHA y antioxidantes entre otros. En el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, ya se están haciendo algunos, en donde se excluyeron los tocoferoles, con el fin de evaluar el efecto neto de los omega 3.

Esto permitirá destacar el potencial terapéutico del aceite de RM, para el tratamiento no sólo del EHGNA, sino de otras condiciones metabólicas relacionadas, como son la resistencia a la insulina y la obesidad.

De esta tesis, surgen nuevas preguntas relacionadas a la regulación de las proteínas PLIN 2 y 5, por lo que es necesario hacer estudios que evalúen su vida media y mecanismos de degradación. Es importante potenciar estudios *in vivo* y otras técnicas como la microscopia electrónica, que podrían mejorar la detección de éstas proteínas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Milic S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis*. 2012;30(2):158-62.
2. Rector RS. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(2):185.
3. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Aug;34(3):274-85.
4. Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Jul;87(7):679-95.
5. Wang H, Bell M, Sreenivasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem*. 2011 May 6;286(18):15707-15.
6. Yong-Ning Xin S-YX. Omega -3 polyunsaturated fatty acids A specific live drug for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Medical Hypotheses*. 2008 November;71(5):820–1.
7. Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010 Apr;31(7):679-92.
8. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Manan D, et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR-alpha upregulation and NF-kappaB DNA binding abrogation. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Jun;58(6):1333-41.
9. Alisi A, Feldstein AE, Villani A, Raponi M, Nobili V. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Mar;9(3):152-61.
10. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012 Apr;56(4):944-51.
11. Li Y, Chen D. The optimal dose of omega-3 supplementation for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2012 Aug;57(2):468-9; author reply 9-70.

12. Bouzianas DG, Bouziana SD, Hatzitolios AI. Potential treatment of human nonalcoholic fatty liver disease with long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Nutr Rev.* 2013 Nov;71(11):753-71.
13. Nobili V, Alisi A, Della Corte C, Rise P, Galli C, Agostoni C, et al. Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: randomised controlled trial in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013 Nov;23(11):1066-70.
14. Wojciech Janczyk PS, Dariusz Lebensztein. Omega-3 fatty acids for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: design and rationale of randomized controlled trial. *BMC Pediatrics.* 2013;13:85-94.
15. Despessaille A. DC, Espinosa A., Gonzalez D., Tapia G. Dietary Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oil prevents high diet-induced hepatic steatosis in mice. *Food & Function.* 2015;FO-ART-06-2015-000741.
16. Nobili V, Carpino G, Alisi A, De Vito R, Franchitto A, Alpini G, et al. Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2014;9(2):e88005.
17. Mavrogiannaki AN, Migdalis IN. Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: newer data. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:1-8.
18. Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? *Dig Liver Dis.* 2004 Mar;36(3):165-73.
19. Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec;91(12):4753-61.
20. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S99-S112.
21. Milic S, Lulic D, Stimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* 2014 Jul 28;20(28):9330-7.
22. Iichiro Shimomura MM, Robert E. Hammer, Yuriy Bashmakov, Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein. Decreased IRS-2 and Increased SREBP-1c Lead to Mixed Insulin Resistance and Sensitivity in Livers of Lipodystrophic and ob/ob Mice. *Molecular Cell.* 2000;6:77-86.
23. Nishika Sahini JB. Review: Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Progress in Lipid Research* 2014 54:86–112.

24. Thiele C, Spandl J. Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Aug;20(4):378-85.
25. Walther TC, Farese RV, Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1791(6):459-66.
26. Barber T. Post-translational Regulation of Perilipin Expression. STABILIZATION BY STORED INTRACELLULAR NEUTRAL LIPIDS. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(14):9378-87.
27. Wilfling F, Haas JT, Walther TC, Farese RV, Jr. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2014 Aug;29:39-45.
28. Hickenbottom SJ, Kimmel AR, Londos C, Hurley JH. Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure.* 2004 Jul;12(7):1199-207.
29. Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 2005 Jan;87(1):45-9.
30. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1791(6):419-40.
31. Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5126-35.
32. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res.* 2007 Dec;48(12):2751-61.
33. Motomura W, Inoue M, Ohtake T, Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, et al. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 24;340(4):1111-8.
34. Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, et al. Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology.* 2013 Mar;62(4):617-31.
35. Straub BK, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology.* 2008 Jun;47(6):1936-46.

36. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Croce MA, Gropler MC, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3418-28.
37. Yamaguchi T, Matsushita S, Motojima K, Hirose F, Osumi T. MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14232-40.
38. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*. 2000 Dec 8;275(49):38486-93.
39. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett*. 2006 Oct 9;580(23):5484-91.
40. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;65:952-68.
41. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Mañán D, et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- $\alpha$  upregulation and NF- $\kappa$ B DNA binding abrogation. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(6):1333-41.
42. Susan E. Schadinger NLRB, Barbara M. Schreiber and Stephen R. Farmer. PPAR $\gamma$  2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *AJP Endocrinol Metab*. 2005;288:E1195–E205.
43. Be' Atrice Desvergne LMaWW. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol Rev*. 2006;86:465–514.
44. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem*. 2000 Sep 15;275(37):28918-28.
45. Gervois P, Kleemann R, Pilon A, Percevault F, Koenig W, Staels B, et al. Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):16154-60.

46. Mary Ziotopoulou CSM, Stanley M. Hilema and Jeffrey S. Flier. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279 E838–E45.
47. Nicolas Blondeau OP, Stella Manta, Valerie Giordanengo, Pierre Gounon, Regis Bordet, Michel Lazdunski, Catherine Heurteaux. Polyunsaturated Fatty Acids Are Cerebral Vasodilators via the TREK-1 Potassium Channel. *Circ Res* 2007;101:176-84.
48. Blondeau N. Review: The nutraceutical potential of omega-3 alpha-linolenic acid in reducing the consequences of stroke. *Biochimie* 2015;doi:10.1016/j.biochi.2015.06.005:1-7.
49. Danielle Hank PZ, Suresh K. Mohankumar, Jaime L. Clark, Carla G. Taylor. A diet high in  $\alpha$ -linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. *Prostag, Leukot and Essent Fatty Acids.* 2013;89:391–401.
50. Mahmoudreza Hadjighassem BK, Nima Shekarriz, Argavan Baseerat, Nima Molavi, Masoud Mehrpour, Mohammad Taghi Joghataei, Mahdi Tondar, Fatemeh Ahmadipour and Goh Yong Meng. Oral consumption of  $\alpha$ -linolenic acid increases serum BDNF levels in healthy adult humans. *Nutrition Journal* 2015;14(20):1-5.
51. Brenna JT. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002 5(2):127-32.
52. Johane P. Allard EA, Saira Mohammed, Maitreyi Raman, Ghazal Avand, Bianca M. Arendt, Pegah Jalali, Thileep Kandasamy, Nita Prayitno, Morris Sherman, Maha Guindi, David W.L. Ma, Jenny E. Heathcote. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) A cross-sectional study. *Journal of Hepatology* 2008;48:300–7.
53. Dossi CG, Tapia GS, Espinosa A, Videla LA, D'Espessailles A. Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR-alpha and SREBP-1c. *J Nutr Biochem.* 2014 Sep;25(9):977-84.
54. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014;7:221-39.
55. J. Concha CS, R. Chamy and M.E. Zúñiga. Effect of Rosehip Extraction Process on Oil and Defatted Meal Physicochemical Properties. *JAACS.* 2006;83:771–5.

56. Tapia O G, Valenzuela B R, Gormáz JG, Masson S L, Vizcarra M, Cornejo Z P, et al. Evaluation of the hepatic bioconversion of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed with oils from chia (*Salvia hispánica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*). *Grasas y Aceites*. 2012;63(1):61-9.
57. Wiśniewski JR. Proteomic Sample Preparation from Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissue. *Journal of Visualized Experiments*. September 2013;79(e50589):1-5.
58. McManaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, Jackman M, MacLean PS, Cain S, et al. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res*. 2013 May;54(5):1346-59.
59. Magnusson B, Asp L, Boström P, Ruiz M, Stillemark-Billton P, Lindén D, et al. Adipocyte Differentiation-Related Protein Promotes Fatty Acid Storage in Cytosolic Triglycerides and Inhibits Secretion of Very Low-Density Lipoproteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(7):1566-71.
60. Susan E. Schadinger NLRB, Barbara M. Schreiber and Stephen R. Farmer. PPAR 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *AJP Endocrinol Metab*. 2005;288:E1195–E205.
61. Liu X, Xue R, Ji L, Zhang X, Wu J, Gu J, et al. Activation of farnesoid X receptor (FXR) protects against fructose-induced liver steatosis via inflammatory inhibition and ADRP reduction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;450(1):117-23.
62. Crunk AE, Monks J, Murakami A, Jackman M, MacLean PS, Ladinsky M, et al. Dynamic regulation of hepatic lipid droplet properties by diet. *PloS one*. 2013;8(7):e67631.
63. Masuda Y, Itabe H, Odaki M, Hama K, Fujimoto Y, Mori M, et al. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *Journal of lipid research*. 2006;47(1):87-98.
64. Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H, et al. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(52):42841-7.
65. Mason RR, Watt MJ. Unraveling the roles of PLIN5: linking cell biology to physiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015;26(3):144-52.
66. Wang C, Zhao Y, Gao X, Li L, Yuan Y, Liu F, et al. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology*. 2015;61(3):870-82.

67. Okumura T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *Journal of physiology and biochemistry*. 2011;67(4):629-36.
68. Pettinelli P, Del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV, Smok G, et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-alpha ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Nov;1792(11):1080-6.
69. Das U. Biological significance of essential fatty acids. *JOURNAL-ASSOCIATION OF PHYSICIANS OF INDIA*. 2006;54(R):309.
70. Kohli P, Levy BD. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British journal of pharmacology*. 2009;158(4):960-71.
71. Serhan C. Nuevos mediadores químicos en la resolución de la inflamación: resolvinas y protectinas. *Anesthesiology Clin N Am*. 2006;24:341-64.
72. Zúñiga J, Venegas F, Villarreal M, Núñez D, Chandía M, Valenzuela R, et al. Protection against in vivo liver ischemia-reperfusion injury by n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in the rat. *Free radical research*. 2010;44(8):854-63.
73. Santos JSd, Vieira ABD, Kamada I. A Rosa Mosqueta en el tratamiento de heridas abiertas: una revisión. *Rev bras enferm*. 2009;62(3).
74. Marchini FB, Martins DMFS, Teves DCd, Simões MdJ. Efecto del aceite de rosa mosqueta en la cicatrización de heridas abiertas.. *Rev paul med*. 1988;106(6):356.
75. Mizoguchi Y, Moriya M, Taniguchi D, Hasegawa A. Effect of retinoic acid on gene expression profiles of bovine intramuscular preadipocytes during adipogenesis. *Animal Science Journal*. 2014;85(2):101-11.
76. De Oliveira PRB, Da Costa CA, Grazielle F, Cordeiro VS, Santos IB, De Carvalho LC, et al. Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. *PloS one*. 2015;10(12):e0143721.
77. Jiménez P, Masson L, Quitral V. Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista chilena de nutrición*. 2013;40(2):155-60.

78. Sato K, Goshio M, Yamamoto T, Kobayashi Y, Ishii N, Ohashi T, et al. Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*. 2015;31(7):923-30.
79. Chung M-Y, Yeung SF, Park HJ, Volek JS, Bruno RS. Dietary  $\alpha$ -and  $\gamma$ -tocopherol supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory-related responses in an obese mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21(12):1200-6.
80. Pall ML, Levine S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Sheng Li Xue Bao*. 2015;67(1):1-18.

## ANEXO 1



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

---

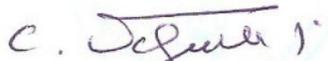
### CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“Hepatoprotective mechanisms of Rosa rubiginosa oil (Rosa mosqueta) in preconditioning against ischemia reperfusion injury in healthy and steatotic liver and prevention of liver steatosis: role of Nrf2, PPAR-alpha, NF-κB and expression of cytoprotective genes”* cuya investigadora responsable es la **Dra. Gladys Tapia Opazo** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (**Protocolo CBA# 0639 FMUCH**).

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

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2014.

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

  
**Dr. Carlos Valenzuela Y.**  
Presidente

Santiago, 26 de Septiembre de 2013

## ANEXO 2

Santiago, 17 de Junio 2013.-

Señores  
FONDECYT 2013.  
**PRESENTE**

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dra. Gladys Tapia Opazo, para su estudio el proyecto titulado "*Hepatoprotective mechanisms of Rosa rubiginosa oil (Rosa mosqueta) in preconditioning against ischemia reperfusion injury in healthy and steatotic liver and prevention of liver steatosis: role of Nrf2, PPAR-alpha, NF-kB and expression of cytoprotective genes.*" se encuentra actualmente en proceso de revisión del cumplimiento de lo establecido en las normas de bioseguridad para todos los participantes del proyecto antes mencionado.

Tomé conocimiento: **Dra. Gladys Tapia Opazo**



**Profesora Mónica Acuña Patzke**  
**Directora Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad**

## ANEXO 3



Unidad de Lípidos  
Avenida Independencia #1027 – Independencia – Santiago – Chile  
Casilla 70000, Santiago 7, Chile  
Fono: 56-02-29786085/6047/6714

(Pagina 1-2)

Código informe 854/14

### INFORME ANALISIS PERFIL ACIDOS GRASOS

Resultados expresados como:  
Porcentaje de Area de Metil Ester Reconocido  
g/100g y mg/100gr

<b>Fecha</b>	I Diciembre 2014
<b>Tipo de Muestra</b>	Aceite Rosa Mosqueta 13-11-14
<b>Muestreado por</b>	El solicitante
<b>Metodología</b>	Cromatografía Gaseosa con detector FID Método AOCS Ce 1-62
<b>Solicitante</b>	Dr. Rodrigo Valenzuela

<b>Acidos Grasos Saturados</b>			
	<b>% Metil Ester</b>	<b>g/100g</b>	<b>mg/100g</b>
C10:0 Acido Decanoico	0,000	0,000	0,000
C12:0 Acido Dodecanoico	0,000	0,000	0,000
C14:0 Acido Tetradecanoico	0,043	0,042	41,932
C16:0 Acido Palmítico	3,564	3,489	3488,738
C18:0 Acido Estearico	1,816	1,778	1777,915
C20:0 Acido Eicosanoico	0,762	0,746	746,389
C22:0 Acido Docosanoico	0,163	0,159	159,341
C24:0 Acido Tetracosanoico	0,069	0,067	67,091
<b>Total Ac. Grasos Saturados</b>	<b>6,417</b>	<b>6,281</b>	<b>6281,406</b>

Código informe 854/14

<b>Acidos Grasos Monoinsaturados</b>			
	<b>% Metil Ester</b>	<b>g/100g</b>	<b>mg/100g</b>
C14:1 Acido Tetradecenoico	0,000	0,000	0,000
C16:1 Acido Palmitoleico	0,120	0,117	117,409
C18:1 Acido Oleico	14,726	14,416	14416,205
C20:1n9 Acido Eicosaenoico	0,360	0,352	352,228
C22:1n9 Acido Erucico	0,000	0,000	0,000
C24:1 Acido Tetracosanoico	0,000	0,000	0,000
<b>Total Ac. Grasos Monoinsat.</b>	<b>15,206</b>	<b>14,886</b>	<b>14885,842</b>

<b>Acidos Grasos Poliinsaturados</b>			
	<b>% Metil Ester</b>	<b>g/100g</b>	<b>mg/100g</b>
C18:2n6 Acido Linoleico	44,059	43,131	43131,204
C18:3n6 Acido $\gamma$ -Linolenico	0,000	0,000	0,000
C18:3n3 Acido $\alpha$ - Linolenico	34,241	33,520	33520,401
C20:2n6 Acido Eicosadienoico	0,000	0,000	0,000
C20:3n6 Acido Di-homo- $\gamma$ -Linolenico	0,000	0,000	0,000
C20:3n3 Acido 11,14,17 Eicosatrienoico	0,000	0,000	0,000
C20:4n6 Acido Eicosatetraenoico	0,000	0,000	0,000
C20:5n3 Acido Eicosapentaenoico (EPA)	0,000	0,000	0,000
C22:5n3 Acido Docosapentaenoico	0,000	0,000	0,000
C22:6n3 Acido Docosahexaenoico (DHA)	0,000	0,000	0,000
<b>Total Ac. Grasos Poliinsaturados</b>	<b>78,300</b>	<b>76,652</b>	<b>76651,605</b>



**Ing. Patricio Muñoz T.**  
 Ing. Biotecnología Molecular  
 Patriciomun@yahoo.com

“ Se autoriza solo el uso técnico de estos resultados, cualquier otro uso debe ser convenido previamente”