



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Doctorado en Nutrición y Alimentos**

**Relación del estrés oxidativo con la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en hígado de ratas Wistar obesas insulino resistentes con enfermedad por hígado graso no alcohólica.**

**Tesis presentada como parte de los requisitos  
para optar al Grado de**

**Doctor en Nutrición y Alimentos**

**Programa Conjunto**

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,  
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de  
Nutrición y Tecnología de Alimentos

**Juan Guillermo Gormaz Araya**

Director de Tesis: **Dr. Ramón A. Rodrigo S.**

**Santiago-Chile**  
**2011**

**RELACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS  
GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN HÍGADO DE RATAS  
WISTAR OBESAS INSULINO RESISTENTES CON ENFERMEDAD POR  
HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICA**

**Por**

**Juan Guillermo Gormaz Araya**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado  
Académico de Doctor en Nutrición y Alimentos

**COMITÉ DE TESIS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

Prof. Dr. Ramón Rodrigo

\_\_\_\_\_

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS:**

Prof. Dra. Lilia Masson

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Alfonso Valenzuela

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marco Arrese

\_\_\_\_\_

Prof. Dra. María Sol Morales

\_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

*Quiero, siento y me veo en la obligación de dedicar esta tesis a todos aquellos grandes seres sin los cuales este trabajo hubiese sido imposible de materializar.*

*Al Señor y la Mater por toda la comprensión, iluminación y ayuda entregada cuando se necesitó asistencia divina para sortear aquellos obstáculos que parecían proyectarse más allá de mis humanas capacidades.*

*A mis Padres, Hermana y al Doctor Ramón Rodrigo por el magnánimo, incondicional y desinteresado apoyo que me proporcionaron durante toda la realización de la tesis.*

*A dos de las mujeres más ejemplares que he conocido en mi vida, quienes además de su fundamental colaboración en esta tesis han sido piedras angulares en mi formación humana, la Doctora Marcia Erazo, mi compañera de vida y la Doctora Lilia Masson, mi mentora en las ciencias de la nutrición y los alimentos.*

*A los grandes colegas Sra. Amaya Oyarzun y Doctor Francisco Pérez, que facilitaron su modelo de estudio para la realización de esta tesis.*

*A mis amigos y colaboradores Cesar López, Diego Soto, Rodrigo Valenzuela, Rodrigo Cabrera y Juan Luis Guillén, sin cuyo apoyo y diligencia se me habría dificultad mucho más recibirme de Doctor.*

*A mi comisión de tesis por toda la paciencia y disponibilidad a entenderme y ayudarme en los momentos más difíciles y cruciales de esta investigación.*

*A Merlín, mí gatito, por todas las alegrías que me brindo durante este largo período de crecimiento y consolidación personal.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente todo el apoyo académico, material y espiritual brindado por mi director de tesis, el Doctor Ramón Rodrigo y la Doctora Lilia Masson.

De manera especial agradezco también la Sra. Amaya Oyarzun y al Doctor Francisco Pérez por haberme facilitado su modelo de estudio para la realización de esta tesis.

Finalmente quisiera agradecer a la Doctora Marcia Erazo y Sr. Diego Soto por toda la colaboración entregada para la realización de esta tesis.

## **BIOGRAFÍA**

Mis padres, Guillermo y María Lucía, cuentan que a los 5 años les comuniqué que quería ser científico, porque me gustaban las estrellas y los dinosaurios. A los diez años, ellos me regalaron un juego para montar un pequeño laboratorio de electrónica en el que pasé gran parte de mi tiempo de infancia construyendo desde radios a galena hasta circuitos integrados. A fines de la enseñanza básica se unió a mi pasión por la electrónica el fascinante mundo de la biología, en donde la célula llamó mi atención desde un principio. En cuarto medio debí tomar una difícil decisión, optar entre las ciencias de la informática y las biológicas. A los 18 años entré a estudiar bioquímica en la Universidad de Chile, y durante esos años terminé de confirmar que me dedicaría a la ciencia, por lo que tan pronto egresé de pre-grado, entré a hacer el doctorado en Nutrición y Alimentos. En la actualidad, estoy combinando dos líneas de investigación, nutrición humana y acuícola con el fin de contribuir a mejorar los niveles de salud alimentario-nutricional de la población.

**Financiamiento**

FONDECYT 1060105

INNOVA-CORFO 07CT9Z-04

## ÍNDICE GENERAL

N°	Sección	Página
	ÍNDICE GENERAL	vii
	ÍNDICE DE TABLAS	xi
	ÍNDICE DE FIGURAS	xi
	LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
	RESUMEN	xv
	ABSTRACT	xvi
	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga	1
1.2	Enfermedad por hígado graso no alcohólica	2
1.2.1	Anormalidades metabólicas Asociadas a EHGNA	2
1.2.1.1	Balance energético positivo y obesidad	3
1.2.1.2	Resistencia a la insulina	3
1.2.1.2.1	Mecanismo lipogénico de la insulina en el hepatocito	4
1.2.2	Inflamación y EOX asociados a EHGNA	5
1.3	Inducción de EHGNA en roedores	7
1.3.1	Modelos monogénicos de obesidad en roedores	8
1.3.2	Modelos nutricionales de obesidad en roedores	8
1.3.2.1	Dieta de cafetería alta en grasas saturadas	8
1.3.2.2	Etiología de la EHGNA en roedores alimentados con dieta de cafetería	8
1.4	Disminución de la biodisponibilidad de AGPCL en EHGNA	9
1.4.1	Antagonismo de los AGPCL con la EHGNA	9
1.4.2	Modulación genómica del metabolismo lipídico	9
1.4.3	Modulación genómica de la inflamación y EOX	10
1.4.4	Factores que modifican la biodisponibilidad de AGPCL	11
1.5	Actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas	12
1.5.1	Mecanismo de desaturación	13
1.5.2	Regulación de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas	15
1.5.2.1	Regulación nutricional de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$	16

1.5.2.2	Regulación hormonal de las actividades $\delta$ y $\epsilon$ desaturasas	16
1.5.2.3	Control bioquímico y metabólico de las actividades $\delta$ y $\epsilon$ desaturasas	17
1.6	Actividad desaturasa, estrés oxidativo y EHGNA	18
	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	20
2.1	Hipótesis	20
2.2	Objetivo General	20
2.3	Objetivos específicos	20
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
3.1	Definición del modelo para la determinación de los efectos del EOx asociado a EHGNA sobre las actividades $\delta$ y $\epsilon$ desaturasas, en ratas obesas insulino resistentes.	21
3.1.1	Tipo y diseño del estudio	21
3.1.2	Grupos experimentales	23
3.1.3	Confirmación diagnóstica	23
3.1.3.1	Obesidad	23
3.1.3.2	EHGNA	23
3.1.3.3	Resistencia a la insulina	23
3.2	Definición y evaluación operacional de las variables de estudio	24
3.2.1	Variables independientes	24
3.2.1.1	Estatus REDOX intracelular	24
3.2.1.2	Lipoperoxidación	24
3.2.1.3	Defensas antioxidantes enzimáticas celulares	24
3.2.1.4	Expresión génica de la enzima $\delta$ desaturasa	24
3.2.2	Variables dependientes	24
3.2.2.1	Actividades $\delta$ y $\epsilon$ desaturasas	24
3.2.3	Variables potenciales de interacción o confundentes	25
3.2.3.1	Presencia de obesidad	25
3.2.3.2	Presencia de EHGNA	25
3.2.3.3	Presencia de resistencia a la insulina	25
3.3	Metodologías bioquímicas, histoquímicas y moleculares	26
3.3.1	Toma de muestras	26
3.3.2	Determinación de la concentración de proteínas	26

3.3.3	Determinación del contenido de grasa total del hígado	27
3.3.4	Evaluación histopatológica del tejido hepático	28
3.3.5	Determinación de la insulinemia plasmática	28
3.3.6	Determinación de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas hepáticas	30
3.3.6.1	Ensayo bioquímico	30
3.3.6.2	Extracción lipídica y aislamiento de los ácidos grasos	32
3.3.6.3	Análisis de la composición de ácidos grasos de la muestra	32
3.3.6.4	Validación de la metodología para la determinación de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas	33
3.3.6.4.1	Ensayo preliminar de la actividad $\Delta^6$ desaturasa en biopsias humanas	34
3.3.6.4.2	Ensayo preliminar de la actividad $\Delta^6$ desaturasa en necropsias de ratas	34
3.3.6.4.3	Desarrollo de un modelo biológico para la estandarización de la metodología para la determinación simultánea de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas.	35
3.3.7	Determinación de la expresión génica de la enzima $\Delta^6$ desaturasa	40
3.3.8	Determinación de parámetros asociados a EOX	41
3.3.8.1	Estatus REDOX intracelular	41
3.3.8.2	Lipoperoxidación	42
3.3.9	Evaluación de las defensas antioxidantes enzimáticas celulares	43
3.3.9.1	Actividad SOD	43
3.3.9.2	Actividad CAT	44
3.3.9.3	Actividad GSH-Px	45
3.4	Procesamiento y análisis de la información	46
3.4.1	Cálculo del tamaño muestral	46
3.4.2	Procesamiento de datos	47
3.4.3	Estrategia de análisis	47
3.4.3.1	Análisis exploratorio de los datos y exclusión de animales en base estadística	47
3.4.3.2	Estimación de correlaciones	48
	<b>RESULTADOS</b>	49
4.1	Caracterización de las variables independientes y de interacción o confusión	49
4.1.1	Variables continuas	49

4.1.2	Comparación histopatológica de los grupos de estudio	50
4.2	Efecto de la patología sobre las variables dependientes	51
4.3	Análisis de correlación entre las distintas variables	52
4.3.1	Correlaciones entre parámetros de EOX y actividades enzimáticas $\omega$ 6 y $\omega$ 5 desaturasas	52
4.3.1.1	Estatus REDOX intracelular	52
4.3.1.1.1	Relación GSH/GSSH	52
4.3.1.1.2	Niveles tisulares de GSSG	53
4.3.1.2	Lipoperoxidacion	54
4.3.1.3	Evaluación de las defensas antioxidantes enzimáticas celulares	55
4.3.1.3.1	Actividad SOD	55
4.3.1.3.2	Actividad CAT	56
4.3.1.4	Parámetros asociados a EOX que no correlacionaron con las actividades $\omega$ 6 y $\omega$ 5 desaturasas	57
4.3.2	Correlación entre resistencia a la insulina y actividades enzimáticas $\omega$ 6 y $\omega$ 5 desaturasas	58
4.3.3	Expresión génica de la enzima $\omega$ 6 desaturasa	59
	DISCUSIÓN	60
5.1	Hallazgos	60
5.2	Discusión de la evidencia y asociación causal	60
5.2.1	AGPCL y EHGNA	60
5.2.2	Actividades $\omega$ 6 y $\omega$ 5 desaturasas y EOX	62
5.2.3	Actividades $\omega$ 6 y $\omega$ 5 desaturasas y RI	66
5.3	Aportes y limitaciones del estudio	66
	CONCLUSIONES	68
	PROYECCIONES Y DESAFÍOS	69
	BIBLIOGRAFÍA	71
	ANEXOS	80
9.1	Presentaciones a Congresos	80
9.1.1	Estrés oxidativo y alteración de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en enfermedad por hígado graso no alcohólica	80
9.2	Artículos publicados	81

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>N°</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Características de la población estudiada	49
2	Diferencias de medianas en actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas para casos y controles	51
3	Parámetros REDOX que no correlacionaron con las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>N°</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Estructura bidimensional de los tres AGPCL de mayor importancia biológica	1
2	Anormalidades del metabolismo que estimulan la lipogénesis hepática orientada a reserva energética, en individuos con resistencia a la insulina	5
3	Asociación entre obesidad, RI y EHGNA y su relación con la inflamación a través de TNF-	7
4	Efectos de la interacción directa e indirecta de los ácidos grasos n-3 con factores transcripciones	10
5	Biosíntesis de los AGPCL de las familias n-3 y n-6 a partir de sus precursores esenciales	12
6	Visión esquemática del sistema enzimático $\Delta^6$ desaturasa	13
7	Mecanismo de reacción propuesto para la desaturación hepática, ejemplificado para actividad $\Delta^5$	15
8	Cuadro resumen del rol de los AGPCL-n-3 en los factores que desencadenan esteatosis y su progresión a esteatohepatitis	19
9	Diseño de estudio utilizado, a partir Proyecto INNOVA CORFO número 07CT9Z-04, considerando los grupos de intervención anteriores al desarrollo de la tesis y el momento de inicio de esta tesis	22
10	Cromatograma del perfil de ácidos grasos de la preparación microsomal a tiempo 0 analizado por GLC	39

11	Cromatograma del perfil de ácidos grasos de la preparación microsomal una vez finalizada la reacción, analizado por GLC	39
12	Histología control 40x	50
13	Histología caso 40x	50
14	Correlación entre la relación GSH/GSSG y la actividad enzimática desaturasa 6	52
15	Correlación entre la relación GSH/GSSG y la actividad enzimática desaturasa 5	52
16	Correlación entre los niveles tisulares de GSSG y la actividad enzimática desaturasa 6	53
17	Correlación entre los niveles tisulares de GSSG y la actividad enzimática desaturasa 5	53
18	Correlación entre los niveles tisulares de MDA y la actividad enzimática desaturasa 6	54
19	Correlación entre los niveles tisulares de MDA y la actividad enzimática desaturasa 5	54
20	Correlación entre la actividad SOD y la actividad enzimática desaturasa 6	55
21	Correlación entre la actividad SOD y la actividad enzimática desaturasa 5	55
22	Correlación entre la actividad CAT y la actividad enzimática desaturasa 6	56
23	Correlación entre la actividad CAT y la actividad enzimática desaturasa 5	56
24	Correlación entre resistencia a la insulina y la actividad enzimática desaturasa 6	58
25	Correlación entre resistencia a la insulina y la actividad enzimática desaturasa 5	58
26	Comparación entre los niveles de expresión génica de la enzima desaturasa 6 entre casos y controles	59
27	Análisis densitométrico de la comparación entre los niveles de expresión génica de la enzima desaturasa 6	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
AGPCL	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
AP-1	Proteína activante-1
Apo B100	Apolipoproteína B100
ARA	Ácido araquidónico
ATP	Adenosín trifosfato
BF <sub>3</sub>	Trifluoruro de boro en metanol al 12,5% p/p
BHT	Butilhidroxitolueno
CAC	Capacidad antioxidante celular
CAT	Catalasa
CE	Células endoteliales
CIDGRA	Centro de investigación y desarrollo en grasas y aceites
CIT	Citrato
CK	Células de Kupffer
CoA	Acetil coenzima A
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sulfato cuproso pentahidratado
DC	Dieta de cafetería
DDT	Ditiotreitol
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHGNA	Enfermedad por hígado graso no alcohólica
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EOx	Estrés oxidativo
<i>Fads 2</i>	Gen de desaturasa de ácidos grasos tipo 2 (actividad 6)
<i>Fads 3</i>	Gen de desaturasa de ácidos grasos tipo 3
FRAP	Capacidad del plasma para reducir el hierro
FT	Factor transcripcional
GLC	Cromatografía gas-liquido de alta resolución
GLUC	Glucosa
GLUT 4	Transportador de glucosa de tipo 4
GOT	Glutamato-oxalacetato transaminasa
GSH	Glutación reducido
GSH-Px	Glutación peroxidasa
GSSG	Glutación oxidado
GPT	Glutamato-piruvato transaminasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico

HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HPO <sub>3</sub>	Ácido metafosforoso
IMC	Índice de masa corporal
IRS-1	Receptor de sustrato de insulina tipo 1
IRS-2	Receptor de sustrato de insulina tipo 2
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monofosfato ácido de potasio
LFABP	Proteína hepática transportadora de ácidos grasos
LRH	Lipasa regulada hormonalmente
MDA	Malondialdehído
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MV	Esteatosis microvesicular
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato monoácido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaF	Fluoruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-kB	Factor de transcripción Kappa B
PIR	Piruvato
PPAR-	Receptor activado por proliferadores peroxisomales tipo
REDOX	Óxido-reducción
RI	Resistencia a la insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
R-TNF -	Receptor de TNF-
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP-1c	Proteína de unión a elemento regulador de esteroides tipo 1c
TAG	Triacilglicerol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNF-	Factor de necrosis tumoral tipo
UCPs	Proteínas desacoplantes de transporte de electrones mitocondrial
VC	Vena central

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA) se caracteriza por una acumulación anormal de grasa y posterior estrés oxidativo (EOx) en tejido hepático, que suele estar asociada a obesidad y resistencia a la insulina (RI). En EHGNA, la biodisponibilidad hepática de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga se ve disminuida por alteraciones en su biosíntesis, para la cual se considera a la desaturación como paso limitante, requiriéndose de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Las desaturasas son enzimas integrales de membranas biológicas, dependientes de hierro y que necesitan NADPH para funcionar. El EOx induce lipoperoxidación de membranas biológicas y a la vez altera el potencial de óxido-reducción (REDOX) intracelular, por lo que podría ser uno de los factores que inhibe las actividades de las desaturasas en EHGNA.

**HIPÓTESIS:** La presencia de EOx en tejido hepático con EHGNA, se correlaciona negativamente con la actividad de la  $\Delta 6$  o de la  $\Delta 5$  desaturasa en hígado de ratas obesas insulino resistentes, generadas mediante intervención nutricional a través de dieta de cafetería alta en grasas saturadas.

**OBJETIVO GENERAL:** Determinar el efecto del EOx sobre las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas en tejido hepático afectado con EHGNA.

**TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO:** Estudio CASO-CONTROL en ratas macho adultas de 5 meses de vida. CASOS; presencia de EHGNA de origen nutricional asociada a obesidad y RI (n=8). CONTROLES; ausencia de patologías (n=8).

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se determinaron las actividades hepáticas  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, y su correlación con EOx tisular mediante: estatus REDOX (relación glutatión reducido/glutatión oxidado, GSH/GSSG), lipoperoxidación (niveles de malondialdehído, MDA) y defensas antioxidantes enzimáticas celulares determinadas por las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

**RESULTADOS:** Existe correlación negativa entre los niveles de MDA, la concentración de GSSG y la resistencia a la insulina en ayunas con las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Existe correlación positiva entre la relación GSH/GSSG y la actividad SOD con las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas.

**CONCLUSIÓN:** La presencia de EOx es uno de los mecanismos patológicos principales mediante los cuales se alteran las actividades de la  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas en presencia de EHGNA asociada a obesidad y resistencia a la insulina.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Non-alcohol fatty liver disease (NAFLD), is characterized by the hepatic abnormal fat accumulation and later oxidative stress (OxS) that is related to obesity and insulin resistance (IR). In NAFLD, long-chain poly-unsaturated fatty acids bioavailability is diminished by alterations in their biosynthesis, being desaturation the limiting step, requiring 6- and 5-desaturase activities. Desaturases are iron-dependent biological membrane-bound enzymes and need NADPH to function. OxS induces biological membrane lipid-peroxidation and, at the same time, alters intracellular oxidation-reduction (REDOX) potential, being one of the factors that possibly inhibit desaturases activity at NAFLD.

**HYPOTHESIS:** The oxidative stress present in NAFLD-liver tissue is negatively correlated with both 5- and 6-desaturase activities, in the liver of obese, insulin resistant rats, a model generated through a cafeteria diet nutritional intervention, based on consumption of highly saturated fatty acids.

**AIMS:** To determine the effect of OxS on the 6- and 5-desaturase activities of liver in the presence of NAFLD.

**TYPE AND STUDY DESIGN:** CASE-CONTROL designed in 5 months-adult male rats. CASES were those with nutritional-origin NAFLD associated to obesity and insulin resistance (n=8); CONTROL were those without any pathology (n=8).

**METHODS:** 6- and 5-desaturase activities and their correlation with tissue OxS were determined using REDOX status (reduced glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG ratio), lipid-peroxidation (malondialdehyde, MDA levels) and enzymatic antioxidant cellular defenses, assessed by the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px).

**RESULTS:** Negative correlations between MDA levels with GSSG concentration, IR and 6- and 5-desaturase activities were observed. In addition, a positive correlation between GSH/GSSG ratio, SOD activity and 6- and 5-desaturase activities were found.

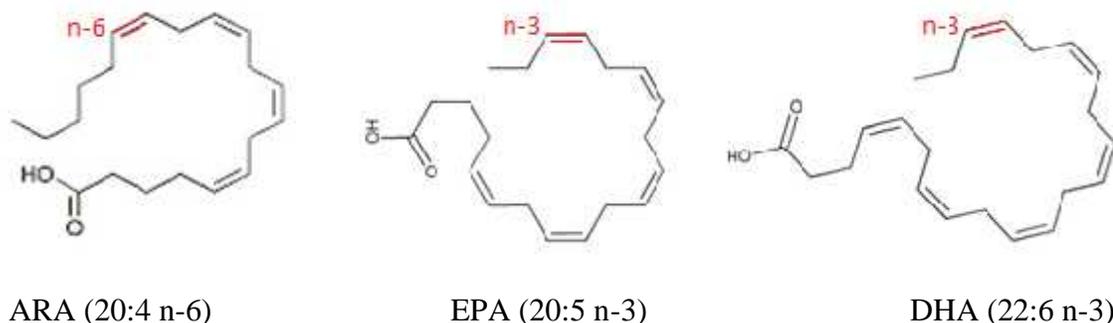
**CONCLUSION:** OxS is one of the main pathological mechanisms involved in the alterations of 6- and 5-desaturase activities occurring in obesity and insulin resistance-related NAFLD.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.- ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPCL) corresponden principalmente a tres compuestos de alto interés biológico: ácido araquidónico (ARA), miembro principal de la familia n-6 y los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), pertenecientes a la familia n-3.

Todos los AGPCL se caracterizan por presentar un sistema de a lo menos 4 dobles enlaces no conjugados en configuración *cis* (Figura 1), separados por un grupo metilénico, en su cadena hidrocarbonada. La denominación n- se relaciona con la ubicación del primer doble enlace contando a partir del grupo metilo terminal. La familia n-6 tiene su primer doble enlace ubicado a 6 carbonos del extremo metilo terminal y la n-3 lo posee al tercer carbono. Bajo condiciones fisiológicas los AGPCL son biosintetizados mayoritariamente por el hígado a partir de los ácidos linoleico (18:2 n-6) y  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3), precursores esenciales no sintetizados por el organismo humano.



**Figura 1. Estructura bidimensional de los tres AGPCL de mayor importancia biológica**

Actualmente, existe creciente evidencia de la importancia de los AGPCL en la integridad funcional del sistema nervioso y diversos procesos fisiológicos, como la inmunidad y la respuesta inflamatoria (Dreesen *et al*, 2006). Durante los últimos 10 años estos compuestos han adquirido importancia en la modulación del metabolismo energético. De esta manera, alteraciones en su biosíntesis se han asociado a patologías como la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (Delarue *et al*, 2004) y EHGNA (Araya *et al*, 2004). Paralelamente, también ha surgido evidencia de una importante interrelación entre el componente inflamatorio de dichas patologías y la biodisponibilidad de los AGPCL (Delerive *et al*, 2001), donde además de la concentración neta de estos ácidos grasos, influiría la razón entre ellos. Recientemente, se ha mencionado que la relación óptima n-6/n-3 que debería poseer una dieta balanceada bordearía el 1:1, información

basada en estudios de la ingesta grasa de poblaciones humanas ancestrales (Molendi-Coste *et al*, 2011). Dicha relación, que sería óptima desde la perspectiva de la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, se alcanzaba mediante un elevado consumo de alimentos marinos y tejido nervioso, que en la actualidad están lejos de la dieta occidental promedio (Campillo, 2004).

## **1.2.- ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICA**

La condición de EHGNA se refiere a un síndrome patológico relacionado con un conjunto de anormalidades. Comienza desde un depósito hepático anormalmente alto de lípidos de reserva energética (triacilglicérols), condición conocida como esteatosis, pasando por un proceso inflamatorio con daño del hepatocito, fenómeno denominado esteatohepatitis, hasta llegar a procesos graves de fibrosis y cirrosis (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003).

La esteatosis hepática posee diversos orígenes dentro de los cuales se tienen anormalidades del metabolismo lipídico (Brunt, 2004), consumo crónico de algunos fármacos, factores genéticos y resistencia a la insulina (RI), condición clave en el desarrollo de EHGNA, que ha fomentado la inclusión de esta enfermedad dentro del Síndrome Metabólico (Marchesini *et al*, 2001). Por lo tanto, la EHGNA puede considerarse la consecuencia hepática de un desequilibrio metabólico del organismo, siendo de hecho una de las manifestaciones más claras de obesidad visceral en el ser humano, ya que su prevalencia estimada en la población adulta occidental post transición epidemiológica, se situaría aproximadamente en un 30% (Browning *et al*, 2004). Además, suele estar fuertemente asociada a RI, dislipidemias y estrés oxidativo (EOx), sin relacionarse con una ingesta excesiva de alcohol.

La obesidad suele ser una causa común de EHGNA, existiendo una prevalencia de entre el 74% al 90% entre la población humana con un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (Angulo, 2002; Abrams *et al*, 2004). Paralelamente, los pacientes obesos que se someten a cirugía bariátrica con diagnóstico de esteatosis, presentan una alta prevalencia de inflamación (45%) y fibrosis (47%) a nivel hepático (Videla *et al*, 2006 b).

### **1.2.1.- Anormalidades Metabólicas Asociadas a EHGNA**

El aumento de la lipogénesis hepática, en conjunto con una menor capacidad para oxidar y exportar lípidos en este mismo órgano, determina el desarrollo de esteatosis (Reddy, 2001; Haque & Sanyal, 2002). Estos procesos pueden tener distintos orígenes dentro de los que destacan un desbalance energético positivo con subsiguiente obesidad, fallas en la homeostasis sistémica de glucosa, (Reddy, 2001; Haque & Sanyal, 2002), y disminuida biodisponibilidad de AGPCL (Araya, *et al*, 2004).

#### 1.2.1.1.- Balance energético positivo y obesidad

La obesidad, relacionada con un desbalance energético positivo, fomenta EHGNA por distintos mecanismos. De manera directa, un aporte dietético permanente de lípidos en cantidades superiores a los requerimientos energéticos favorece su almacenamiento, tanto en el tejido adiposo como en el visceral, incluyendo el hígado (Angulo, 2007). Simultáneamente la ingesta sostenida de carbohidratos precursores de glucosa, en cantidades superiores a los requerimientos nutricionales, estimula la lipogénesis de manera directa, al aportar el sustrato para este proceso, e indirecta, al mantener elevados los niveles de insulina circulantes (Brener *et al*, 2003).

Por otra parte, hoy se sabe que la obesidad en todas sus formas posee un importante componente inflamatorio (asociado a la secreción adiposa de citoquinas) capaz de fomentar EHGNA, tanto por efecto directo sobre el hígado, como por la habilidad de estos mediadores para estimular la resistencia periférica a la insulina (Houstis *et al*, 2006).

#### 1.2.1.2.- Resistencia a la insulina

Una de las funciones más importantes del hígado es la mantención de la homeostasis normal de la glucosa plasmática, que debe manejarse al margen de los procesos cíclicos de ingesta de alimentos, mecanismo fundamental para un adecuado metabolismo energético (Ganong, 2000).

En los períodos inter-ingesta y ayuno, el hígado se constituye en un exportador neto de glucosa (condición de suministro energético), ocupando sus reservas de glucógeno y realizando gluconeogénesis a partir de diversas moléculas. Como la gluconeogénesis es termodinámicamente desfavorable, requiere de un aporte de energía permanente, el cual suele provenir de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Este proceso ocurre a expensas de la reserva hepática de triacilgliceroles, que también cubre las necesidades energéticas de mantención del hígado durante los períodos de ayuno (Musso *et al*, 2009).

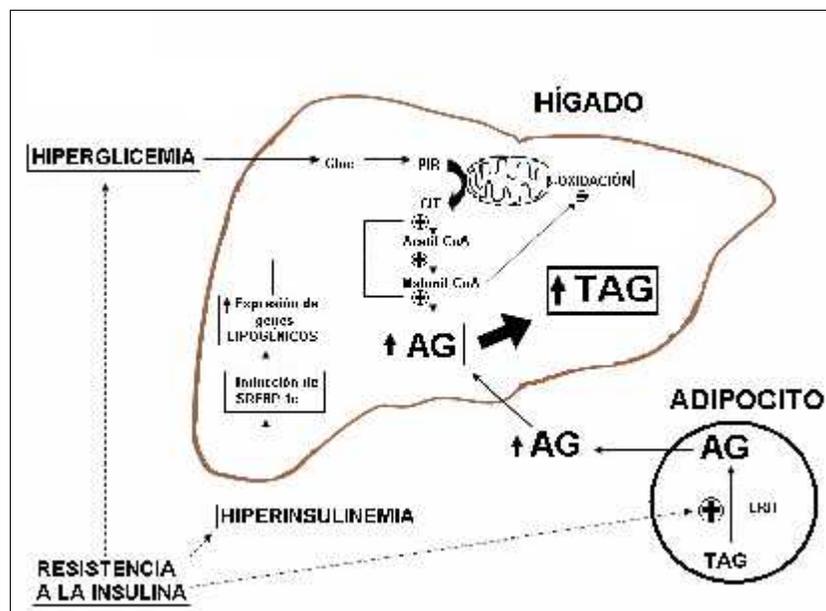
Bajo condiciones postprandiales, el hígado invierte su metabolismo, dejando de producir glucosa y transformándose en un consumidor de este nutriente, el que se utiliza para cubrir su mantención energética, pero también para regenerar el glucógeno y los ácidos grasos consumidos en el período inter-ingesta anterior. Esta inversión tiene por objeto preparar al hepatocito para un nuevo ciclo de ayuno. La insulina es un gatillante esencial de esta inversión, estimulando los distintos mecanismos consumidores de glucosa (respuesta postprandial), entre ellos la síntesis de lípidos para reserva energética (Delarue *et al*, 2004; Haque & Sanyal, 2002; Marchesini *et al*, 2001). Una RI dificulta la utilización periférica de glucosa, elevando los niveles plasmáticos de este azúcar. Dicho incremento tiende a aumentar los niveles sanguíneos de insulina por retroalimentación  $\beta$ -pancreática (Le Marchand-Brustel *et al*, 2003).

La RI afecta al hígado de manera distinta al resto de los tejidos, dado que en este órgano los efectos de dicha hormona no intervienen en el transporte de la glucosa. Por lo tanto, el cuadro se manifiesta como una inadecuada respuesta metabólica a la insulina, inhibiéndose algunos de los mecanismos asociados a la inversión del metabolismo energético y sobre expresándose otros. Esta dualidad queda de manifiesto en el hecho de que el hígado con RI no es capaz de reprimir adecuadamente la gluconeogénesis en respuesta a la insulina, pero sí de iniciar la lipogénesis previa exposición a dicha hormona.

La aparente dualidad en los efectos de la resistencia a la insulina a nivel hepático, deriva de una bifurcación en la vía molecular de transducción de la señal de respuesta a esta hormona en el hígado, generando dos rutas independientes (Le Marchand-Brustel *et al*, 2003). La vía que reprime la gluconeogénesis está mediada por el segundo mensajero intracelular insulín receptor substrate 2 (IRS-2) que se ve fuertemente inhibida producto de la RI. Por el contrario, la vía asociada a la respuesta lipogénica, mediada por IRS-1, no se ve afectada por RI (Musso *et al*, 2009), fomentándose en el hígado una condición lipogénica permanente que favorece el desarrollo de esteatosis (Araya *et al*, 2004) (Figura 2).

#### 1.2.1.2.1 Mecanismo lipogénico de la insulina en el hepatocito

La respuesta hepática a IRS-1 estimula la activación del factor transcripcional (FT) SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c), el cual induce la transcripción de prácticamente todos los genes relacionados con la síntesis de lípidos (Musso *et al*, 2009). Este mecanismo también reduce de manera indirecta la  $\beta$ -oxidación, al favorecer la generación de grandes cantidades del intermediario malonil-CoA, que inhibe el ingreso de ácidos grasos a la mitocondria (Haque & Sanyal, 2002; Videla *et al*, 2004 a). Por otra parte la RI también afecta indirectamente al hígado, dado que una insuficiente respuesta del tejido adiposo a dicha hormona induce la secreción adiposa de ácidos grasos libres (AGL) al plasma, de los cuales una proporción importante es captada y almacenada por el hígado (Saito *et al*, 2007) (Figura 2).



**Figura 2. Anormalidades del metabolismo que estimulan la lipogénesis hepática orientada a reserva energética, en individuos con resistencia a la insulina.** Abreviaciones: Gluc, glucosa; PIR, Piruvato; CIT, citrato; TAG, triacilglicerol; AG, ácidos grasos; SREBP-1c, *Sterol Regulatory Element Binding Protein*; LRH, lipasa regulada hormonalmente.

### 1.2.2.- Inflamación y EOX asociados a EHGNA

En individuos genéticamente susceptibles a daño lipogénico, denominados “malos almacenadores de grasa”, la incapacidad hepática para compensar un estado anabólico permanente, derivada tanto de obesidad como de RI, tiende a generar en el hepatocito lipotoxicidad (Arrese, 2009; Trauner *et al*, 2010). Estas condiciones fomentan, por distintos mecanismos, una producción excesiva de agentes oxidantes conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS), (Videla *et al*, 2006 a; Gormaz & Rodrigo, 2009). Estos agentes son capaces de oxidar de manera importante biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA (Seki *et al*, 2002), daño que actualmente se considera uno de los más importantes marcadores de esteatohepatitis (Videla *et al*, 2004 a; Leclercq, 2004).

Por otra parte, los individuos genéticamente poco susceptibles a daño metabólico denominados “buenos almacenadores de grasa”, resisten la esteatosis, requiriendo de una injuria externa (como por ejemplo un tratamiento farmacológico) para fomentar una sobreproducción de ROS (Arrese, 2009; Trauner *et al*, 2010).

La producción excesiva y sostenida de ROS en el hígado, cualquiera sea su origen, suele ir disminuyendo la capacidad del hepatocito para remover dichas especies, potencialidad conocida como capacidad antioxidante celular (CAC). Eventualmente, puede llegarse a un estado en que la acumulación de especies oxidantes le impide al

hepatocito mantener su potencial de óxido reducción (REDOX) intracelular a niveles fisiológicos, condición conocida como EOX. Existe evidencia de debilitamiento significativo de la CAC en EHGNA, (Videla *et al*, 2004 b), tanto a nivel de mecanismos enzimáticos como no-enzimáticos. A nivel enzimático se ha visto una disminución en las actividades de enzimas antioxidantes celulares como superóxido dismutasa (SOD) y a nivel no enzimático se ha encontrado alteración en la relación Glutación reducido (GSH) / Glutación oxidado (GSSG).

El EOX, además del daño molecular directo, es capaz de estimular la inflamación, dado que una baja en el potencial REDOX intracelular activa factores transcripcionales pro-inflamatorios, fomentando la producción de mediadores inmunológicos como el Tumor Necrosis Factor- (TNF- ), una de las citoquinas inflamatorias más importantes (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). La producción de este mediador fomenta la generación de nuevos ROS, retroalimentando positivamente el estímulo oxidativo original (Babor, 2004), además de favorecer directamente la muerte celular induciendo apoptosis y necrosis por distintos mecanismos.

En la esteatohepatitis, el TNF- y su receptor de trans-membrana, presentan una elevada transcripción a nivel hepático, lo que coincide con los altos niveles séricos de esta citoquina observados en pacientes con la patología. Ambos marcadores serían el reflejo de un aumento de células del sistema inmune, tanto en cantidad (grado de infiltración) como a nivel de activación, revelando un estado inflamatorio sistémico que probablemente va a estar afectando a otros tejidos o órganos, (Gormaz & Rodrigo 2009). Cabe señalar que el TNF- es capaz de alterar la respiración celular del hepatocito, lo que genera un aumento de ROS y daño mitocondrial, fenómenos característicos de la esteatohepatitis (Anderson & Borlak, 2008) que estarían fomentando una muerte celular programada (Videla *et al*, 2004 a).

Paralelamente, el TNF- podría ser una de las moléculas clave en la relación bidireccional entre inflamación y alteraciones metabólicas, dado que actualmente se le señala como uno de los mediadores más importantes en la inducción de RI derivada de la obesidad (Houstis *et al*, 2006). Actualmente está demostrada la capacidad del tejido adiposo hipertrofiado y del hígado inflamado para secretar TNF- al plasma y la capacidad de esta citoquina para inhibir la captación muscular de glucosa (Figura 3).

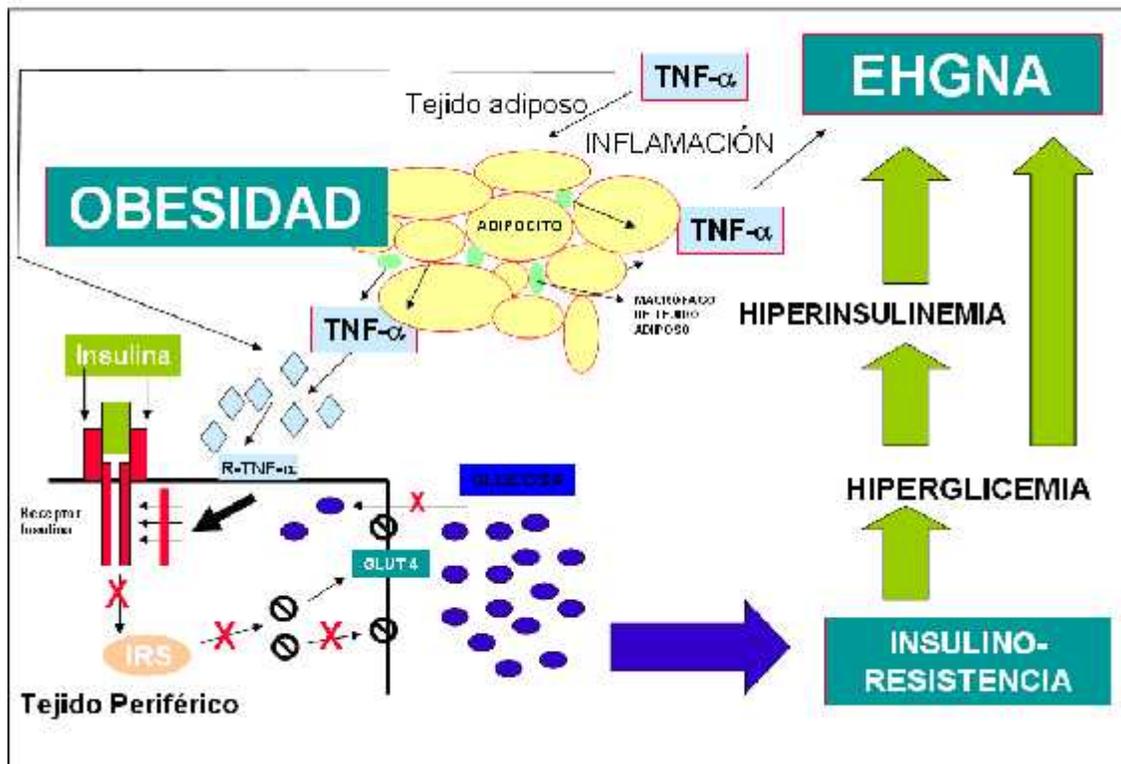


Figura 3. Asociación entre Obesidad, RI y EHGNA y su relación con la inflamación a través de TNF- $\alpha$ . Abreviaciones: Glut 4, transportador de glucosa 4; IRS, sustrato de receptor de insulina; R-TNF- $\alpha$ , receptor de TNF- $\alpha$ .

### 1.3.- INDUCCIÓN DE EHGNA EN ROEDORES

En la actualidad existen numerosos modelos metabólicos en roedores, desarrollados para estudiar patologías relacionadas con nutrición, como por ejemplo obesidad (subcutánea y visceral) y resistencia a la insulina. Sin embargo, estos modelos, a pesar de su sólida estandarización y amplia utilización, pueden no representar en forma fidedigna el desarrollo de la enfermedad humana (Koteish & Diehl, 2001). Aquello porque en general presentan un origen monogénico, que se contrapone con la etiología mayoritariamente poligénica que presenta el cuadro en nuestra especie, donde la alimentación juega un rol preponderante. Por lo tanto, se han desarrollado modelos nutricionales de obesidad en roedores no manipulados genéticamente, que si bien son de más difícil estandarización y utilización, representan mejor la etiología de la enfermedad en humanos.

### **1.3.1.- Modelos monogénicos de obesidad en roedores**

Los modelos monogénicos de obesidad en roedores se basan principalmente en alteraciones hormonales del control de la ingesta alimentaria, relacionadas con la adipoquina leptina, un fuerte inhibidor del apetito. Dentro de estos tenemos a los ratones *ob/ob*, inhabilitados para producir dicha hormona o las ratas *db/db* incapaces de detectar la leptina por una mutación en el receptor de esta hormona. Eliminar la actividad metabólica de la leptina no sólo implica fomentar la obesidad por una inhibición de la saciación, sino que también conlleva a una serie de modulaciones secundarias sobre la fisiología. Dentro de las modificaciones más importantes están alteraciones en la actividad -pancreática, alteraciones del sistema inmune y la producción de corticoides (Koteish & Diehl, 2001; Lindström, 2007), factores que se sabe intervienen en el desarrollo de la obesidad, agregando variables que producen confusión en la aplicación de estos modelos.

### **1.3.2.- Modelos nutricionales de obesidad en roedores**

#### 1.3.2.1.- Dieta de cafetería alta en grasas saturadas

El modelo murino de obesidad que más se asemeja a la etiología de la enfermedad en humanos, es aquel inducido por consumo ad-libitum de una dieta de elevada densidad energética (la que puede provenir de grasas o carbohidratos) y a la vez escasa en fibra, aceites marinos y antioxidantes, conocida como dieta de cafetería (DC). La DC es similar a la alimentación que fomenta la obesidad en la especie humana, no solo en su composición proximal, sino también en el origen de sus materias primas, pues está elaborada con productos de consumo humano, asegurando una óptima similitud del modelo (García-Díaz *et al*, 2007). Este modelo comenzó a desarrollarse a mediados de la década de 1970 (Sclafani & Springer, 1976), referenciándose por primera vez en una publicación científica el año 1979 (Rothwell & Stock, 1979).

#### 1.3.2.2.- Etiología de La EHGNA en roedores alimentados con dieta de cafetería

Desde el punto de vista etiológico, la evolución de obesidad en roedores alimentados con DC ha mostrado un evidente paralelismo con el desarrollo y progresión de la enfermedad humana, desarrollando los roedores intervenidos, dislipidemias, RI y EHGNA conforme va evolucionando la enfermedad (Li *et al*, 2008, Amin *et al*, 2009). La aparición de dichos cuadros está fuertemente asociada a la presencia de alteraciones moleculares, tanto a nivel metabólico como inflamatorio, que mimetizan el patrón molecular observado en pacientes obesos, validando también por esta vía el modelo murino de obesidad inducido por sobrealimentación (Sastre *et al*, 1989; Koteish & Diehl, 2001; Amin *et al*, 2009; Aragno *et al*, 2009). Finalmente, evidencia reciente ha demostrado que la robustez de la dieta de cafetería de elevado contenido graso como modelo de enfermedad en humanos, va más allá del ámbito de patologías como obesidad

y EHGNA, constituyéndose en un excelente modelo para el estudio de síndrome metabólico en general, superando a los clásicos modelos de dietas altas en grasas (Sampey *et al*, 2011).

#### **1.4.- DISMINUCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE AGPCL EN EHGNA**

En la actualidad, existe evidencia clínica que ha demostrado una disminución en la biodisponibilidad de AGPCL en pacientes con EHGNA, tanto para la familia de los n-3, como para los n-6 (Araya *et al*, 2004; Zivkovic *et al*, 2007).

##### **1.4.1.- Antagonismo de los AGPCL con la EHGNA**

Los AGPCL desincentivan el desarrollo y progresión de EHGNA al antagonizar con algunos de los efectos de la obesidad, EOx y RI, tanto a nivel hepático como extrahepático, mediante mecanismos genómicos y no genómicos. Dentro de los mecanismos no genómicos, el más trascendente es la capacidad de estos AGPCL para aumentar la fluidez de las membranas biológicas de todas las células del organismo (Lund *et al*, 1999, Uauy *et al*, 2000). Una adecuada fluidez de membranas biológicas no sólo favorece el transporte de sustancias a través de ellas, sino que también mejora la actividad de receptores de superficie celular, tanto en su capacidad para unir ligandos, como en la eficiencia de la transducción de señales. Existe evidencia de la sensibilidad del receptor de la insulina a la fluidez de las membranas celulares en tejidos periféricos (Ficková *et al*, 1994).

Los mecanismos genómicos están relacionados con la capacidad de los AGPCL para modular en el hígado, tanto el metabolismo energético como la inflamación, mediante la activación y represión de factores transcripcionales específicos.

##### **1.4.2.- Modulación genómica del metabolismo lipídico**

A nivel metabólico, diversos estudios han demostrado que los AGPCL presentarían la capacidad de antagonizar los efectos de la insulina sobre el metabolismo hepático de lípidos. Este antagonismo ocurriría mediante estimulación de la lipólisis (Deckelbaum *et al*, 2006) e inhibición de la lipogénesis. Por ejemplo, Delarue y colaboradores (1996) demostraron que la ingesta de aceites refinados, ricos en AGPCL de la familia n-3 (1,1 gramos de EPA + 0,7 gramos de DHA diarios), durante tres semanas en personas jóvenes y sanas, es capaz de estimular un aumento de hasta un 35% en la oxidación de ácidos grasos y de un 100% en el depósito de glucógeno. Por otra parte Singer y Richter-Heinrich (1991) demostraron que la acumulación de triacilglicerolés a nivel hepático, derivada de esteatosis, se correlaciona con una disminución en las reservas hepáticas de EPA.

El mecanismo de acción molecular mediante el cual los AGPCL desfavorecen el desarrollo de la EHGNA, estaría mediado por la inhibición de la expresión y el procesamiento FT lipogénico SREBP-1c y la activación por unión directa del FT lipolítico PPAR- (Peroxisome Proliferator Activated Receptor ). Este último FT estimula la  $\beta$ -oxidación y transcripción de genes relacionados con el transporte de lípidos y también de proteínas desacoplantes de la cadena transportadora de electrones o UCPs (Figura 4); (Videla *et al*, 2004 a; Delarue *et al*, 2004).

### 1.4.3.- Modulación genómica de la inflamación y EOX

Los AGPCL, principalmente aquellos de la familia n-3, antagonizan indirectamente con el EOX mediante su capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria a través de modulación de la expresión génica. Esta inhibición ocurre de manera indirecta mediante la capacidad de PPAR- activado por AGPCL para evitar la activación de factores transcripcionales pro-inflamatorios, que entre otros procesos, estimulan la producción de TNF- (Delerive *et al*, 2001), mecanismo íntimamente relacionado con la progresión de esteatosis a esteatohepatitis (Figura 4).

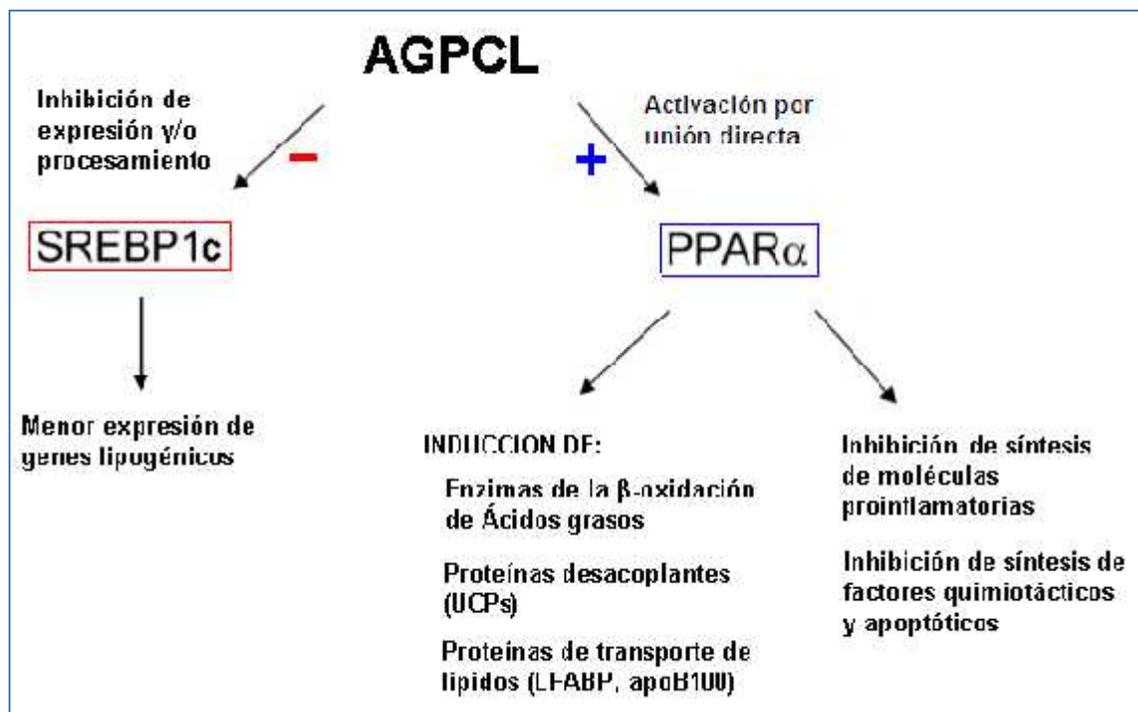


Figura 4. Efectos de la interacción directa e indirecta de los ácidos grasos n-3 con factores transcripcionales.

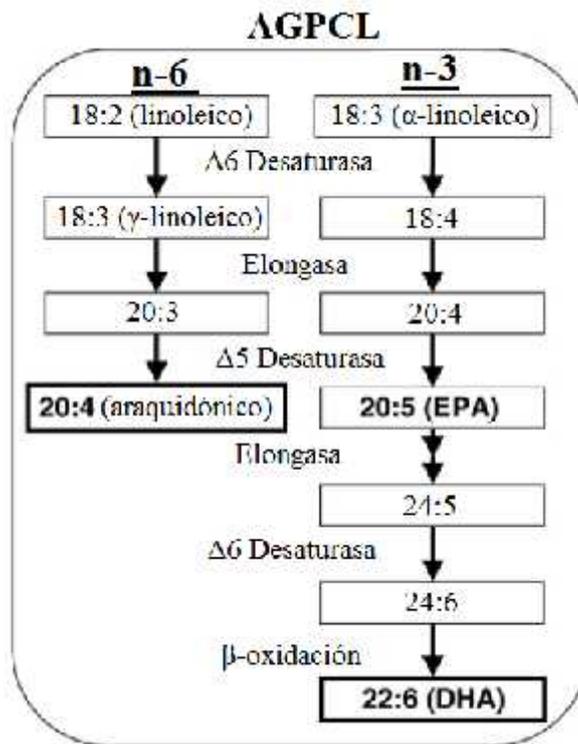
#### 1.4.4.- Factores que modifican la biodisponibilidad de AGPCL

Para antagonizar de manera eficiente con la EHGNA, el hígado necesita de un aporte permanente de AGPCL. En EHGNA, la biodisponibilidad de AGPCL puede verse afectada por distintos mecanismos: 1) una baja ingesta de ellos o sus precursores, 2) degradación aumentada, producto de EOx y 3) Alteraciones de su biosíntesis.

La baja ingesta de AGPCL preformados o de sus precursores esenciales, limitará los efectos de estos lípidos al generar deficiencias (Araya *et al*, 2004). Por otra parte, también se ha postulado que un consumo excesivo de ácidos grasos de la familia n-6, en desmedro de los de la familia n-3, podría interferir con la capacidad de los AGPCL para antagonizar con la EHGNA. Aquello, porque a pesar de que el ácido araquidónico también induce la oxidación de los ácidos grasos a nivel hepático, su efecto es menor al de los AGPCL de la familia n-3 (Araya *et al*, 2004). Además, la estrecha relación de los n-6 con mediadores inflamatorios, (que se ve exaltada al ser ingeridos en grandes cantidades), podría vincularlos con procesos de inflamación crónica y EOx (Araya *et al*, 2004; Calder, 2006), relacionados tanto con EHGNA, como con RI.

Independientemente de la vía por la cual lleguen al hígado los AGPCL, sus capacidades para ejercer efectos fisiológicos en el hepatocito dependerán del estado REDOX de esta célula (Videla *et al*, 2004 a). Por lo tanto, condiciones de EOx, estimularán la lipoperoxidación de AGPCL, con la subsiguiente pérdida de su actividad biológica (Sevanian & Hochstein, 1985).

La biosíntesis de AGPCL requiere tanto de la presencia de precursores esenciales, como de la integridad de la maquinaria enzimática capaz de transformar dichos nutrientes en sus metabolitos activos; ARA, EPA y DHA. Esta maquinaria, se compone del sistema de elongación III y las  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas (Clarke, 2001), todos presentes en el hígado (Figura 5). Actualmente, se ha postulado que alteraciones en esta vía metabólica constituirían un gatillante fundamental en la iniciación de la RI y paralelamente agravarían más el cuadro (Das, 2005). Sin embargo, es poco lo que se sabe respecto de la actividad enzimática de los sistemas de desaturación y elongación hepática en presencia de EHGNA y menos aún, lo que se conoce sobre los patrones de expresión génica de estos sistemas y sus posibles reguladores durante el desarrollo de la patología.



**Figura 5. Biosíntesis de los AGPCL de las familias n-3 y n-6 a partir de sus precursores esenciales** (Fuente: Nakamura y Nara, 2004).

### 1.5.- ACTIVIDADES $\Delta 6$ Y $\Delta 5$ DESATURASAS

La formación de los AGPCL fisiológicamente activos requiere que en los precursores de la vía ocurran secuencialmente procesos de; elongación, desaturación y en el caso del DHA,  $\beta$ -oxidación (Wang *et al*, 2006). Para la síntesis de AGPCL se considera a la desaturación como paso limitante, requiriéndose al menos de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Ambas desaturasas han sido secuencialmente clonadas en humanos, ratones y ratas por diversos investigadores, determinándose un alto grado de conservación inter-especies (Guillou *et al*, 2010).

En humanos, los genes de ambas desaturasas se encuentran contiguos en un cluster ubicado en el cromosoma 11, en conjunto el gen de una tercera desaturasa (*Fads 3*) con homología  $\Delta 6$  desaturasa. Investigaciones recientes han demostrado una importante proporción de regulación en común para estas tres enzimas, atribuible a que el cluster procedería de una duplicación del gen ancestral de la  $\Delta 6$  desaturasa (Dreesen *et al*, 2006). La capacidad de desaturación suele variar bastante de una especie a otra, siendo por lo general, baja o nula en carnívoros estrictos, y más elevada en omnívoros y vegetarianos (Brown, 2005). Paralelamente, diversos estudios han demostrado enormes diferencias entre los mamíferos, donde el ser humano está en una posición intermedia entre malos desaturadores, (felinos y cánido) y buenos desaturadores (roedores), que

suelen duplicar e incluso triplicar en actividad  $\Delta^6$  desaturasa a la especie humana (Biagi *et al*, 1990; Brown, 2005).

### 1.5.1.- Mecanismo de desaturación

La desaturación es un proceso dependiente de oxígeno, desarrollado en la membrana del retículo endoplasmático, que requiere de una cadena de transporte de electrones para funcionar (Brenner, 2003). Por esta razón, el sistema posee tanto componentes integrales de la membrana, como intermediarios solubles. La condición de óxido-reductasas de la  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas hace necesario el requerimiento de co-factores enzimáticos para su acción, como Magnesio, Zinc y vitamina B6. La cadena transportadora de electrones posee como intermediarios citocromo  $b_5$  y citocromo  $b_5$  reductasa, entre otros (Enoch *et al*, 1976), teniendo como dadores electrónicos tanto al NADPH, como al par de carbonos a desaturar. Comoceptor final de electrones, actuaría el oxígeno molecular (Figura 6).

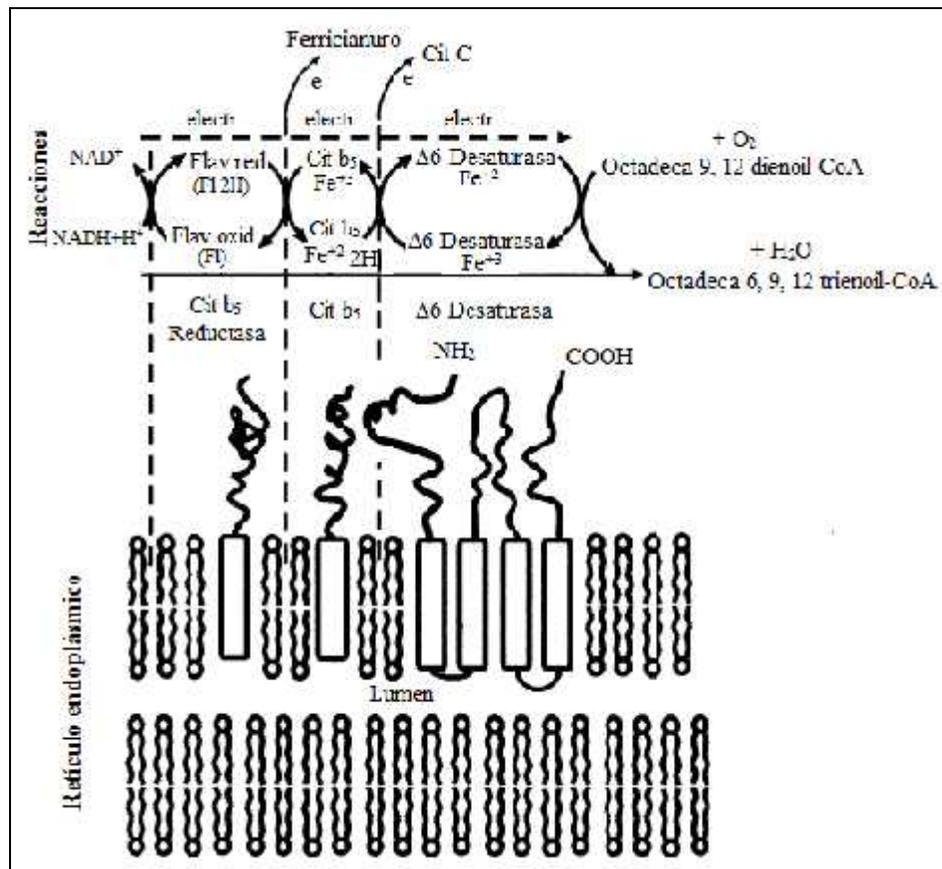


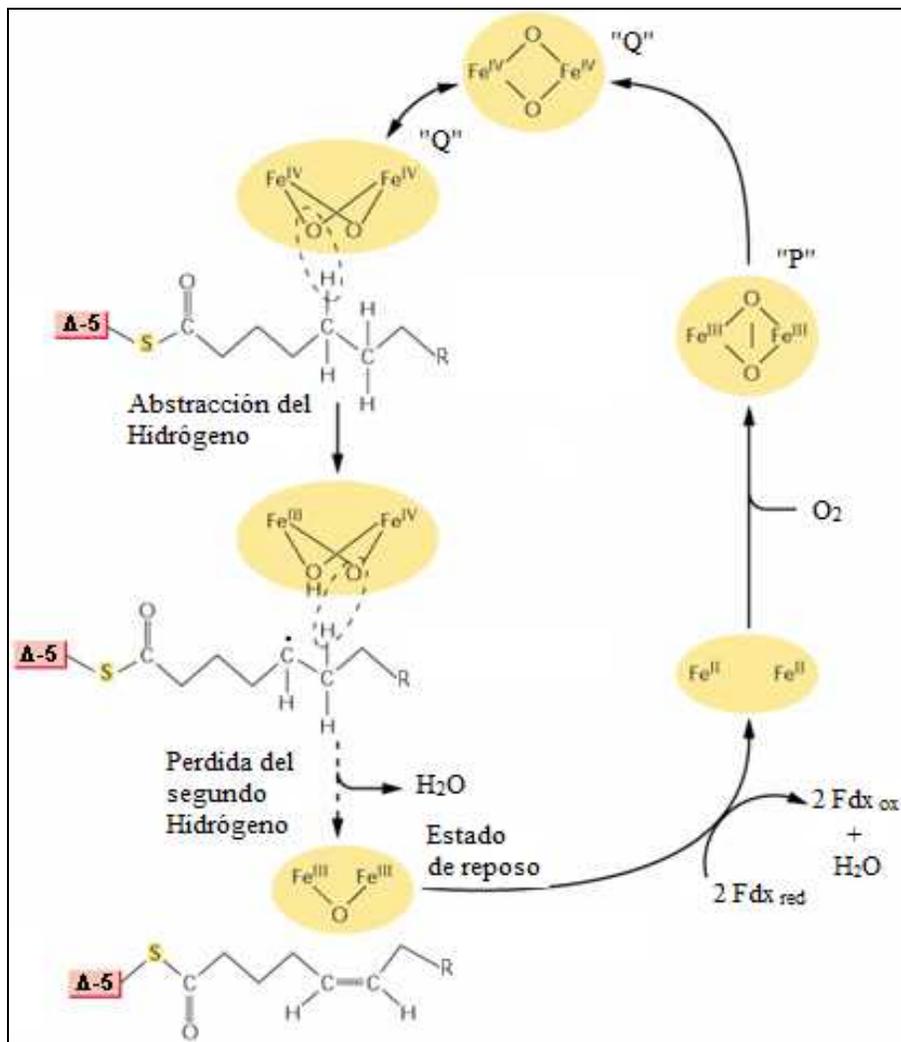
Figura 6. Visión esquemática del sistema enzimático  $\Delta^6$  desaturasa (Fuente: Brenner, 2003).

El mecanismo de reacción de estas enzimas (Figura 7) está todavía en estudio y lo que se conoce se ha dilucidado a partir de desaturasas solubles, sólo presentes en organelos vegetales, (Nakamura & Nara, 2004) más fáciles de aislar e intervenir que sus pares de trans-membrana. Sin embargo, a pesar de las diferencias, ambos tipos de desaturasas poseen homología estructural (sitio activo) que revelaría un mecanismo de acción conservado, dependiente de hierro no hemínico (Fox *et al*, 2004). Ambas enzimas actúan de manera independiente sobre sustratos distintos. La reacción, ya sea para la  $\Delta^5$  o para  $\Delta^6$  desaturasas, comienza con la captación de una molécula de oxígeno molecular por el sitio activo de la enzima, que posee dos átomos de hierro ferroso en configuración no hemínica. Esta reacción forma un estado de transición tetra-atómico, que es la que extrae un átomo de hidrógeno a cada carbono del par contiguo a desaturar (Fox *et al*, 2004).

El sitio activo de la  $\Delta^5$  desaturasa se encuentra entre los carbonos 5 y 6 de acuerdo a la nomenclatura IUPAC (que considera como carbono 1 al carbono del extremo carboxilo terminal) y el sitio activo de la  $\Delta^6$  desaturasa se encuentra entre los carbonos 6 y 7 según la misma nomenclatura.

Para ambas enzimas, la extracción de los átomos de hidrógeno a remover de la cadena alifática del ácido graso ocurre de manera secuencial, primero el más cercano al extremo carboxilo terminal (carbono 5 para la  $\Delta^5$  desaturasa y carbono 6 para la  $\Delta^6$  desaturasa) y luego el carbono adyacente (carbono 6 para la  $\Delta^5$  desaturasa y carbono 7 para la  $\Delta^6$  desaturasa). Esta remoción de dos átomos de hidrógeno de la cadena hidrocarbonada deja dos átomos de carbono adyacentes deshidrogenados con un electrón desapareado, estimulando la formación de un par electrónico entre ellos. Este par electrónico se une, dando origen al nuevo doble enlace (entre los carbonos 5 y 6 para  $\Delta^5$  desaturasa y entre los carbonos 6 y 7 para la  $\Delta^6$  desaturasa).

Una vez formado el doble enlace respectivo, el producto desaturado se libera del sitio activo y al mismo tiempo los dos ferro-hidróxidos intermediarios (generados como producto de la captación de los dos hidrógenos) reaccionan entre sí para liberar una molécula de agua. Esto deja al sitio activo como un complejo triatómico, con un átomo de oxígeno central unido a los dos hierros en configuración férrica (Fox *et al*, 2004). Por último, se requiere devolver la enzima a su configuración nativa, para que pueda comenzar un nuevo ciclo de reacción. Es en este paso donde se requiere la cadena transportadora de electrones externa para liberar el oxígeno acoplado, a fin de reducir ambos átomos de hierro a su configuración ferrosa original y recuperar la actividad de la enzima para comenzar un nuevo ciclo de reacción.



**Figura 7.** Mecanismo de reacción propuesto para la desaturación hepática, ejemplificado para la actividad  $\Delta-5$  desaturasa.

### 1.5.2.- Regulación de las actividades $\Delta-6$ y $\Delta-5$ desaturasas

La actividad de las desaturasas está regulada por componentes dietéticos, hormonales y genéticos, así como por competencia entre los diferentes precursores esenciales. (Montanaro *et al*, 2007). Por ejemplo, el consumo de AGPCL preformados ( $n-3$  y  $n-6$ ), la hiperglicemia, hipoinsulinemia, y un exceso de colesterol y derivados a nivel hepático deprimen las actividades  $\Delta-6$  y  $\Delta-5$  desaturasas. Al mismo tiempo, el envejecimiento va disminuyendo la actividad de estas enzimas (Das, 2005). Por el contrario, la restricción calórica y el consumo de fármacos para el control de la hipercolesterolemia (estatinas y fibratos) han demostrado ser capaces de activar ambas desaturasas en modelo murino (Risé *et al*, 2007).

#### 1.5.2.1.- Regulación nutricional de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas

La regulación nutricional de las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas está modulada mayoritariamente por la ingesta de AGPCL preformados n-3 y n-6, capaces de inhibir la actividad de ambas enzimas (Nakamura & Nara, 2004; Jacobi *et al*, 2011). Al comparar ratas alimentadas con una dieta balanceada cuya única fuente de materia grasa era un 10% en peso de trioleína, versus animales alimentados con una dieta similar en la cual se reemplazó la trioleína por aceite marino (35% EPA + DHA) se apreció una inhibición de la transcripción de aproximadamente un 80% para la  $\Delta^6$  desaturasa y de un 60% para la  $\Delta^5$  desaturasa (Cho *et al*, 1999 a; Cho *et al*, 1999 b). Por otro lado, recientemente se reportó que aumentos graduales de ARA en la formulación de lactancia de cerdos lechones, (0, 0.5, 2.5, y 5% en peso del total de los ácidos grasos de la fórmula) generaba a nivel hepático un incremento lineal de su precursor; 20:3 n-6 (no era capaz de desaturarse a ARA), demostrando que el ácido araquidónico también es capaz de inhibir la desaturación (Jacobi *et al*, 2011).

La ingesta de precursores esenciales también puede regular la actividad de la desaturación mediante competencia entre los precursores de las familias n-3 y n-6 por la misma vía metabólica (Brenner, 2003; Nakamura & Nara, 2004). Sin embargo, existe una mayor afinidad de la vía enzimática por los precursores n-3, la que estaría demostrada en modelo humano, tanto a nivel clínico como celular (Harnack *et al*, 2009). En estos modelos se ha visto que a concentraciones similares de precursores, la concentración de EPA biosintetizado tiende a superar significativamente a la de ARA.

Este mecanismo suele asociarse a la necesidad de mantener una adecuada relación (EPA + DHA)/ARA, producto de que, exceptuando las fuentes marinas y tejido nervioso, la mayoría de los alimentos suelen presentar mayores niveles de n-6 (Cunnane, 2003). La necesidad de mantener esta relación tendría relevancia clínica, pues en la actualidad existe variada evidencia que señalaría que un desbalance a favor de los n-6, tendría injerencia en el desarrollo y progresión de patologías metabólico-inflamatorias (Nakamura & Nara, 2004; Calder, 2006; Molendi-Coste *et al*, 2011), como la EHGA (Araya *et al*, 2004).

#### 1.5.2.2.- Regulación hormonal de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas

En relación al control hormonal de las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas, la insulina juega un rol clave en la biosíntesis de AGPCL (Rimoldi *et al*, 2001 Brenner, 2003; Das, 2005). Su ausencia en distintos modelos animales ha derivado en una disminución severa de los niveles sistémicos de AGPCL, pudiendo apreciarse manifestaciones clínicas como el atrofiamiento testicular (Brenner, 2003). Esta deficiencia ha sido atribuida a una inhibición de la biosíntesis, dado que el aumento de ácido linoleico a nivel dietario no ha logrado revertir los síntomas, mientras que la ingesta de ARA preformado si, atenuando las manifestaciones clínicas (Brenner, 2003).

La baja actividad desaturasa producto de hiposulinemia, tiende a correlacionar casi perfectamente con la disminución en la transcripción hepática de ambas enzimas (de hasta 7 veces para la  $\Delta^6$  desaturasa) en ausencia de dicha hormona. Al restituir la insulina a niveles fisiológicos, tanto la actividad como transcripción de la  $\Delta^6$  desaturasa se recuperan en un 100% (Rimoldi *et al*, 2001). Estos antecedentes llevarían a pensar que la regulación fisiológica de estas enzimas ocurre a nivel transcripcional y no mediante modulación de la actividad enzimática.

Una regulación transcripcional de las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas sugeriría que la reducida biodisponibilidad de AGPCL presente en EHGNA podría derivar de una resistencia hepática a la insulina. Sin embargo, la presencia de lipogénesis hepática en pacientes con la enfermedad (Araya *et al*, 2004), y la elevada actividad de marcadores de respuesta a insulina, como SREBP-1c (Wang *et al*, 2006) descartarían una inducción hepática deficiente de esta hormona. Otros moduladores endocrinos, como el glucagón y la epinefrina también se han mostrado capaces de modular la biosíntesis AGPCL, inhibiendo in-vivo las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas (Brenner, 2003).

#### 1.5.2.3.- Control bioquímico y metabólico de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas

A nivel bioquímico, la  $\Delta^6$  desaturasa corresponde al paso limitante de la síntesis de AGPCL y su actividad suele ser sensible a anormalidades metabólicas como RI (Das, 2005). Por el contrario, en determinaciones *in vivo*, la  $\Delta^5$  desaturasa se ha mostrado menos sensible a cuadros patológicos de origen metabólico. Sin embargo, en experimentos realizados *in vitro*, esta última enzima ha presentado distintos niveles de inhibición en líneas celulares (derivadas de diferentes tejidos), en respuesta a tratamientos con corticoides, oxisteroles y humo de cigarro (Risé *et al*, 2007).

Durante los últimos años, la investigación en las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas se ha concentrado en el control de su expresión génica (Guillou *et al*, 2010), pero el resultado de aquellos estudios, realizados mayoritariamente en modelo murino, sólo ha podido dilucidar claramente el control metabólico bajo condiciones fisiológicas. En dichos modelos se ha demostrado que la insulina, IRS-1 y SREBP-1c resultan fundamentales para la inducción molecular de las desaturasas hepáticas (Brenner *et al*, 2003; Montanaro *et al*, 2005) y que esta inducción correlaciona perfectamente con la actividad de dichas enzimas y la biosíntesis de AGPCL.

Bajo alteraciones metabólicas como EHGNA, el modelo molecular anteriormente descrito no logra satisfacer las observaciones, dado que las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas pierden correlación con la inducción génica de estas enzimas a nivel transcripcional. En estos modelos elevados niveles de insulina y de su principal segundo mensajero a nivel hepático, SREBP-1c, efectivamente generan una importante inducción transcripcional de las  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas, pero no logran aumentar la actividad de estas enzimas, la que muy por el contrario, se ha descrito que tiende a disminuir (Brenner *et al*, 2003; Montanaro *et al*, 2003; Wang *et al*, 2006; Araya *et al*, 2010). Estos

hallazgos abren la posibilidad de la existencia de algún factor interferente, no relacionado con la inducción molecular de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturadas, que estuviese afectando la actividad enzimática, como por ejemplo EOX.

## **1.6.- ACTIVIDAD DESATURADA, EOX Y EHGNA**

A diferencia de otros ácidos grasos, los AGPCL tisulares, independiente de su familia, no suelen formar parte de la reserva energética de triacilglicérols. Poseen más bien una función estructural, ubicándose en la posición dos de los fosfolípidos de membranas biológicas (Uauy *et al*, 2000).

El EOX suele ser especialmente dañino para las membranas biológicas, dada la susceptibilidad de sus lípidos constituyentes a ROS. Estos agentes son potentes inductores de la lipoperoxidación, reacción autocatalítica (Etlik & Tomur, 2006) que al descontrolarse hace necesario aumentar sustancialmente la tasa de recambio de los AGPCL, para mantener concentraciones fisiológicas de estos lípidos. Un aumento de esta tasa de recambio requerirá de un mayor consumo de estos nutrientes preformados, o bien de sus precursores, para mantener la composición de las membranas celulares. Sin embargo, la biosíntesis de AGPCL a partir de sus precursores depende de una actividad óptima del sistema de desaturadas, que incluso podría requerir de un incremento de su actividad basal.

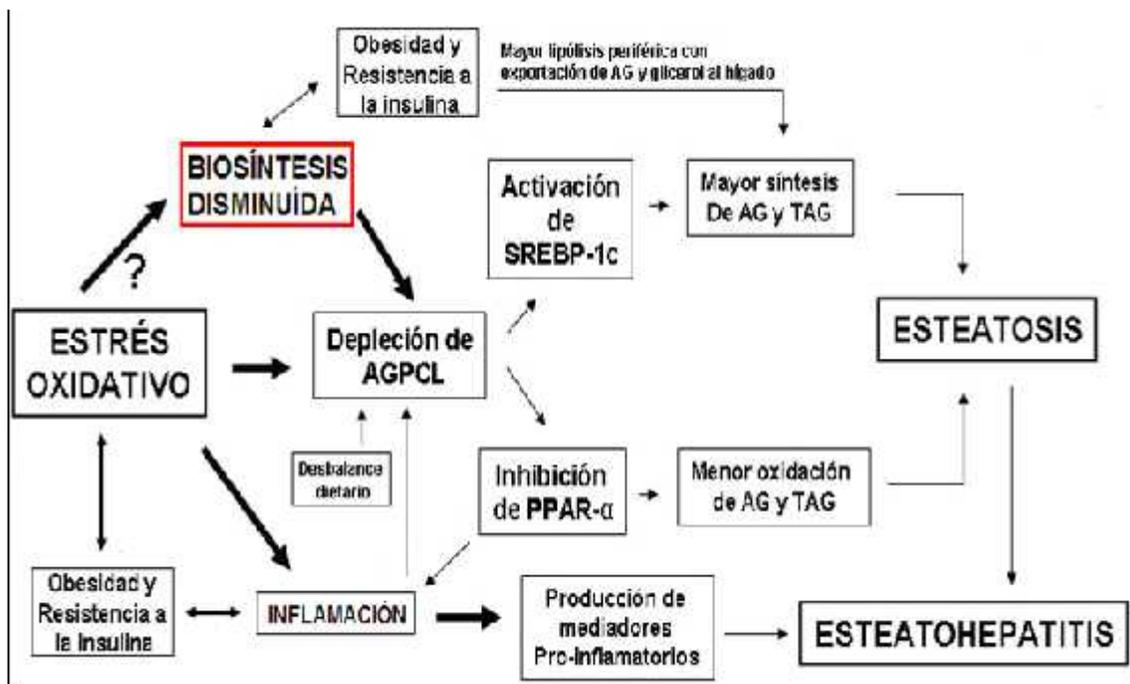
La actividad de los sistemas enzimáticos unidos a membranas biológicas suele ser muy dependiente de la integridad de estas estructuras (Whiting *et al*, 2000), teniendo la lipoperoxidación un impacto notable sobre la funcionalidad de estas enzimas, lo que genera mayoritariamente una disminución de su actividad. Por tanto, la pérdida de actividad desaturada en pacientes con EHGNA publicada por Araya y colaboradores (2010), podría estar asociada a un excesiva lipoperoxidación hepática. Esta asociación no sólo se basaría en la reconocida asociación causal entre la lipoperoxidación y estadios malignos de EHGNA (Jaeschke, 2000), también se fundamentaría en evidencia más actual proveniente del estudio Araya y colaboradores (2010). En aquella investigación se encontró asociación entre una disminución de la actividad  $\Delta 6$  desaturada y una reducción de la capacidad del plasma para reducir el hierro (FRAP), marcador sistémico de EOX que suele estar alterado en pacientes con EHGNA (Videla *et al*, 2004 a). Paralelamente, dicho estudio también encontró asociación inversa entre las actividades de ambas desaturadas y la presencia de RI.

En la actualidad se sabe que el EOX suele ser especialmente dañino para sistemas enzimáticos que forman parte de alguna cadena transportadora de electrones (Genova *et al*, 2005). Esta sensibilidad se debe principalmente a dos factores; primero, ocurre que la homeostasis, tanto de dadores como de aceptores de electrones, suele alterarse sustancialmente por cambios en el potencial REDOX intracelular. En segundo lugar, los sitios activos de las enzimas REDOX suelen tener unidos metales de transición, cuya

funcionalidad también puede verse afectada por variaciones del potencial REDOX intracelular y la presencia de especies oxidantes.

En síntesis, la EHGNA en sus distintos estadios, podría ser causa y a la vez consecuencia de una disminución de AGPCL a nivel hepático, debido tanto a una oxidación directa de estos lípidos, como a la inhibición de su biosíntesis. Este proceso puede verse agravado por un bajo aporte dietario, tanto de los productos preformados como de sus precursores, generándose un círculo vicioso que finalmente podría derivar en una cirrosis hepática (Figura 8).

Dado que tanto la obesidad como la RI son enfermedades que presentan una importante componente inflamatorio-oxidativo a nivel sistémico, se podría estar frente a un mecanismo patológico que relaciona a estas dos patologías con EHGNA, más allá de las anomalías metabólicas anteriormente mencionadas.



**Figura 8.** Cuadro resumen del rol de los AGPCL-n-3 en los factores que desencadenan esteatosis y su progresión a esteatohepatitis.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1.- HIPÓTESIS**

La ocurrencia de EOX en tejido hepático con EHGNA, se correlaciona negativamente con la actividad de la  $\delta$  o de la  $\epsilon$  desaturasas en el hígado de ratas obesas insulino resistentes, generadas mediante intervención nutricional a través de dieta de cafetería alta en grasas saturadas.

### **2.2.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del EOX sobre las actividades  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas en tejido hepático afectado con EHGNA de origen nutricional en ratas Wistar.

### **2.3.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar los niveles de las actividades  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas hepáticas presentes en ratas Wistar. obesas con EHGNA y animales controles eutróficos.
2. Evaluar la existencia de correlación entre la disminución del estatus REDOX hepático asociado a EHGNA y las actividades hepáticas  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas en ratas Wistar.
3. Evaluar la existencia de correlación entre lipoperoxidación hepática asociada a EHGNA y las actividades hepáticas  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas en rata Wistar.
4. Evaluar la existencia de correlación entre la disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas sobre las actividades hepáticas  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas en rata Wistar.
5. Evaluar la existencia de correlación entre la resistencia a la insulina asociada a EHGNA y las actividades hepáticas  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas en rata Wistar.

## MATERIALES Y METODOS

### **3.1.- DEFINICIÓN DEL MODELO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DEL EO<sub>x</sub> ASOCIADO A EHGNA SOBRE LAS ACTIVIDADES 6 Y 5 DESATURASAS, EN RATAS OBESAS INSULINO RESISTENTES.**

#### **3.1.1.- Tipo y diseño del estudio**

Originalmente esta tesis formaba parte del proyecto FONDECYT regular número 1060105, titulado: “Bases moleculares del hígado graso no-alcohólico asociado a obesidad: papel de mediadores transcripcionales metabólicos (PPAR- y SREBP-1c) y pro-inflamatorios (NF- B y AP-1)”, enmarcada en un estudio clínico de diseño caso-control con pacientes humanos.

La pérdida de biopsias humanas por razones ajenas al proyecto, que no pudieron ser recuperadas por falta de presupuesto, obligó a redireccionar la tesis hacia un modelo animal que permitiese probar la hipótesis planteada originalmente. El requisito *sine qua non* solicitado por la comisión del Doctorado asignada a esta tesis para aceptar este redireccionamiento, fue que debía mantenerse el diseño de estudio aprobado inicialmente en el examen de calificación, esto es diseño caso-control.

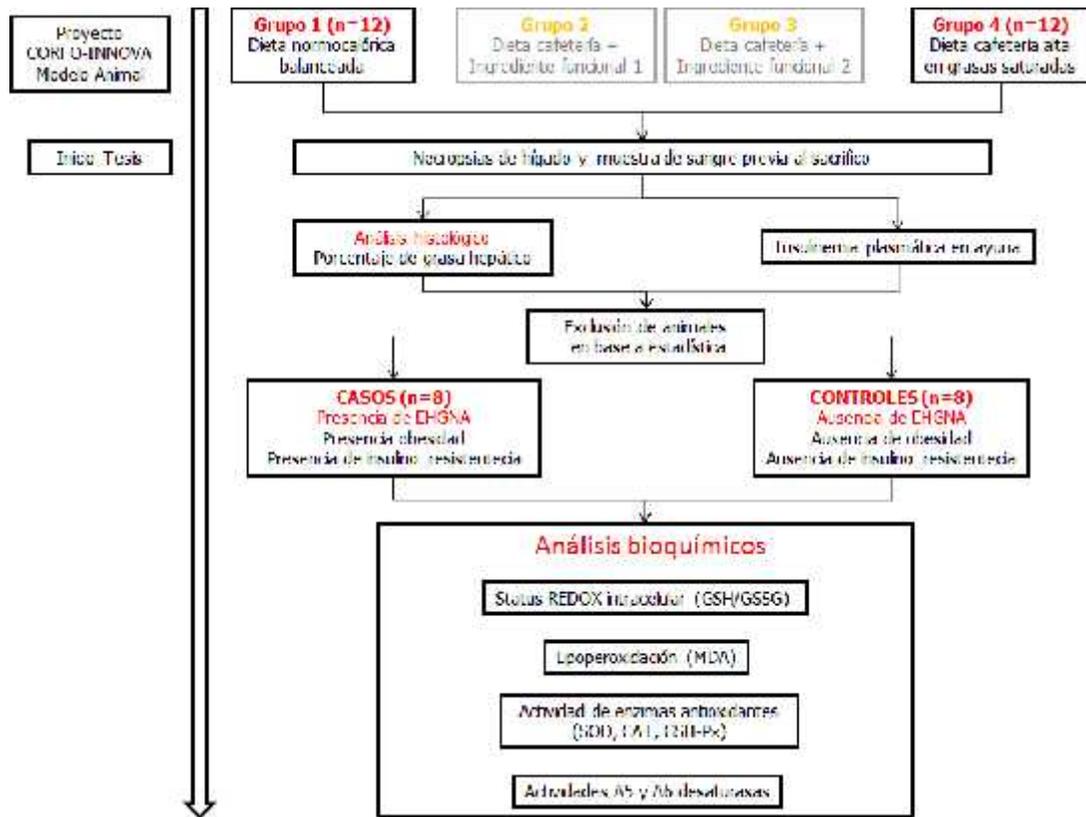
Para poder dar cumplimiento a esta solicitud se identificó el Proyecto INNOVA CORFO número 07CT9Z-04 titulado: “Ingredientes patentables para la industria alimentaria con potencial funcional en la prevención y control de la obesidad y diabetes”, que ya había iniciado su protocolo de investigación en un modelo animal que permitía comprobar la hipótesis de esta tesis. Dicho protocolo consistía en un diseño de estudio prospectivo en el que se hacía seguimiento a 4 grupos de ratas, sometidas a diversas intervenciones nutricionales de experimentación, que concluía en la fase de sacrificio de los animales. A partir de esta última fase se inicia la presente tesis, ya que dos de los cuatro grupos podían ser adaptados íntegramente al diseño de estudio original en humanos. Estos grupos fueron el grupo 1 (alimentado con dieta balanceada normocalórica) y el grupo 4, alimentado con dieta de cafetería alta en grasas saturadas.

Este contexto replicaba al modelo anterior sobre la base que la tesis en humanos comenzaba con recolección de las biopsias fuera del pabellón de cirugía, sin considerar ningún tipo de intervención previa. En ambos casos, el punto de inicio estaba dado por la obtención de las biopsias, las que inmediatamente eran alicuotadas y congeladas en nitrógeno líquido para ser almacenadas en crio-tubos a -80 °C, considerando que ya se había extraído la fracción para el análisis histológico.

Para el estudio en humanos, los únicos antecedentes independientes a la recolección de la muestra que se consideraban eran el consentimiento informado y los criterios de inclusión y exclusión del estudio, estos últimos con objeto de asegurar la robustez de la investigación. Para el estudio en ratas, aquello resultaba equivalente a

considerar que el modelo por el cual se había generado la EHGNA asociada a obesidad en los animales fuese representativo de la etiología de la enfermedad en humanos. Por lo tanto, todos aquellos antecedentes anteriores a la toma de muestra, relacionados con la intervención, incluyendo composición de las dietas, control y seguimiento de las ratas durante la intervención y la evaluación del estatus metabólico-nutricional, que formaron parte del Proyecto INNOVA CORFO no forman parte de esta tesis. La excepción es el peso inicial al momento del estudio, que resulta equivalente al peso al nacer de los pacientes humanos, dato que si tenía el estudio original, utilizado principalmente para descartar prematuros.

De las necropsias obtenidas de los dos grupos seleccionados del proyecto INNOVA CORFO número 07CT9Z-04, se procedió a realizar el análisis diagnóstico de EHGNA, obesidad y resistencia a la insulina, criterio utilizado para definir los grupos del presente estudio, en función de la presencia o ausencia de las enfermedades. La confirmación diagnóstica de que este modelo animal servía para comprobar la hipótesis de esta tesis, permitió adaptar completamente los dos grupos animales al diseño de estudio planteado originalmente para pacientes humanos. Por tanto, se decidió continuar con el protocolo de investigación de la manera que había sido expresado originalmente, procediendo a realizar la fase de análisis bioquímico de esta tesis (Figura 9):



**Figura 9.** Diseño de estudio utilizado, a partir Proyecto INNOVA CORFO número 07CT9Z-04, considerando los grupos de intervención anteriores al desarrollo de la tesis y el momento de inicio de esta tesis.

El aporte de esta tesis dentro del proyecto INNOVA CORFO fue indagar los mecanismos mediante los cuales la obesidad y RI inducidas por una dieta alta en grasas saturadas era capaz afectar el metabolismo hepático de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, para lo cual se utilizó el diseño caso-control.

### **3.1.2.- Grupos Experimentales**

El grupo caso se definió como ratas Wistar macho obesas insulino resistentes que al momento del sacrificio presentaran diagnóstico de esteatosis hepática, confirmado de manera bioquímica mediante análisis del contenido total de grasa en el tejido hepático y de manera clínica mediante evaluación histológica de las necropsias.

El grupo control se definió como ratas Wistar macho eutróficas sin insulino-resistencia que al momento del sacrificio no presentaran diagnóstico de esteatosis hepática, confirmado de manera bioquímica mediante análisis del contenido total de grasa en el tejido hepático y de manera clínica, mediante evaluación histológica de las necropsias.

### **3.1.3.- Confirmación Diagnóstica**

#### **3.1.3.1.- Obesidad**

La confirmación del diagnóstico de obesidad se realizó mediante análisis de los pesos finales y la ganancia de peso en los animales.

#### **3.1.3.2.- EHGNA**

La confirmación del diagnóstico de EHGNA se realizó mediante análisis del porcentaje de grasa total en el hígado y por histología del mismo órgano.

#### **3.1.3.3.- Resistencia a la Insulina**

La confirmación del diagnóstico de resistencia a la insulina se realizó mediante análisis de la concentración de insulina plasmática en ayunas.

## **3.2.- DEFINICIÓN Y EVALUACIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO**

### **3.2.1.- Variables Independientes**

#### 3.2.1.1.- Estatus REDOX intracelular

El estatus REDOX intracelular se determinó evaluando la relación hepática GSH/GSSG en base a la determinación de los niveles tisulares de GSH y GSSG.

#### 3.2.1.2.- Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se evaluó mediante determinación de los niveles tisulares de malondialdehído (MDA), subproducto específico de la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados.

#### 3.2.1.3.- Defensas antioxidantes enzimáticas celulares

Los niveles de defensas antioxidantes enzimáticas celulares se determinaron directamente mediante análisis de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

#### 3.2.1.4.- Expresión génica de la enzima $\omega$ 6 desaturasa

La expresión del gen de la enzima  $\omega$  6 desaturasa (*Fads 2*) se determinó mediante la evaluación del nivel de transcripción de la enzima.

### **3.2.2.- Variables Dependientes**

#### 3.2.2.1.- Actividades $\omega$ 6 y $\omega$ 5 desaturasas

La determinación de las actividades  $\omega$  6 y  $\omega$  5 desaturasas se realizó de manera conjunta, a través de evaluación indirecta de los cambios entre productos y precursores de la enzima, mediante cromatografía gas-líquido (GLC) (Mandon *et al*, 1987). Se determinó la desaturación del ácido  $\omega$ -linolénico 18:3 n-3 para la  $\omega$  6 desaturasa y del ácido homogamalinolénico 20:3n-6 para la  $\omega$  5 desaturasa en fracción microsomal de tejido hepático de ratas con EHGNA y ratas controles.

### **3.2.3.- Variables potenciales de interacción o confundentes**

#### 3.2.3.1.- Presencia de Obesidad

La presencia de obesidad se determinó mediante la evaluación de los pesos finales de las ratas al momento del sacrificio, considerando los parámetros definidos como normales para la especie seleccionada en función de su estado de desarrollo. Para los 165 días que se mantuvieron con vida los animales del presente estudio, el peso esperado bajo condiciones fisiológicas es de 391 +/- 48,21 gramos, de acuerdo a la curva de crecimiento realizada por Smith y Bing (1928) para la rata Wistar albina.

#### 3.2.3.2.- Presencia de EHGNA

La presencia de EHGNA se realizó mediante análisis bioquímico determinando el contenido de grasa total del tejido hepático y se corroboró mediante análisis histopatológico de una fracción representativa de las muestra.

La evaluación histológica del tejido hepático se realizó mediante tinción con hematoxilina eosina y el diagnóstico histológico de imagen se realizó mediante microscopio óptico con un nivel de ampliación de 40X, por un investigador de la unidad de Morfología del ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La presencia de esteatosis hepática se estratificó además como grado 3 en base al porcentaje de hepatocitos que contienen micro/macrovesículas de grasa (grado 0: menos del 5%; grado 1: entre 5-33%; grado 2: entre 33-66%; grado 3: mayor al 66%), de acuerdo a la clasificación sugerida por Kleiner y colaboradores (2005), determinada a partir del análisis histológico de muestras de hígado tratadas con tinción de hematoxilina eosina.

#### 3.2.3.3.- Presencia de resistencia a la insulina

La presencia de resistencia a la insulina se determinó comparando la concentración de la hormona en ayunas entre los animales del grupos caso y los del grupo control.

### **3.3.- METODOLOGÍAS BIOQUÍMICAS, HISTOQUÍMICAS Y MOLECULARES**

#### **3.3.1.- Toma de muestras**

El sacrificio de las ratas utilizadas para el presente estudio se realizó de acuerdo al protocolo aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina para investigaciones clínicas que precisen de modelos animales.

Antes de ser sacrificadas, las ratas se mantuvieron en ayunas por 8 horas y previo al sacrificio, se anestesiaron con Ketamina/Diazepam a una concentración de 125/2,5 mg kg por kilogramo de peso vivo. Para la determinación de los niveles de insulina plasmática en ayunas se le extrajo a cada animal un volumen de 6 mL de sangre mediante punción directa al corazón, de los cuales 3 mL fueron agregados a un tubo para separación de plasma de 4 mL con 7,2 mg de EDTA cada uno, dejándolos reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos separándose el plasma (fracción superior), de los elementos figurados de la sangre (fracción inferior). El plasma obtenido se almacenó en 4 alícuotas de 100  $\mu$ L en crio-tubos de polipropileno de 2 mL previamente rotulados como muestras y contra-muestras y fue congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de insulina.

La extracción de tejido para la determinación del resto de las metodologías se realizó a partir del hígado completo, el que se retiró del animal y se perfundió con buffer fosfato salino 1x (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.47 mM) utilizando un volumen de entre 5 a 10 mL, dependiendo del tamaño del órgano, perfundiendo hasta que ya no se observara la salida de sangre.

Posteriormente el hígado se fraccionó en alícuotas de aproximadamente 500 mg, las que congelaron de manera inmediata con nitrógeno líquido. Una vez congelada, cada alícuota se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  dentro de crio-tubos previamente rotulados para cada una de las metodologías, más las respectivas contra-muestras.

#### **3.3.2.- Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas para las metodologías que requerían corrección por este parámetro, que fueron las actividades enzimáticas y los niveles tisulares de MDA, se determinó en duplicado para cada muestra. El procedimiento consistió en la medición espectrofotométrica del cambio de coloración del reactivo de Folin-Ciocalteu, acoplado a la oxidación catalizada por cobre de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, de acuerdo a la metodología publicada por Lowry y colaboradores (1951).

El primer procedimiento para realizar esta determinación consistió en elaborar una solución estándar seroalbúmina de bovino desengrasada de 100 µg/mL, empleada para realizar una curva de calibración de 8 puntos cuyo rango varió desde los 10 hasta los 80 µg en un volumen final de 900 µL. A cada tubo se le agregaron 2 mL de solución de sulfato de cobre en medio alcalino (1.960 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0,1M; 20µL de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 1%; 20µL tartrato de sodio al 2%). La solución de estándar de proteína con solución de sulfato de cobre en medio alcalino se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, luego de los cuales se les agregaron 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu comercial Merck (Código 1090010500), para después incubar nuevamente por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se procedía a efectuar la lectura espectrofotométrica a 660 nm con cubetas de cuarzo de 3 mL en un espectrofotómetro HP 8452A con arreglo de diodo. Para las muestras se realizó el mismo procedimiento utilizado para cada punto de la curva, reemplazando la proteína estándar por un volumen de 50 µL del tejido procesado (para llegar a un volumen final de 900 µL). Si al momento de la determinación espectrofotométrica la muestra estaba demasiado concentrada, quedando fuera del límite superior de la curva estándar, se diluía cuantitativamente con agua destilada hasta dejarla dentro del rango dado por la curva de calibración.

### **3.3.3.- Determinación del contenido de grasa total del hígado**

El contenido total de grasa hepática, expresada como porcentaje del peso húmedo, se realizó en duplicado de acuerdo a una modificación de la metodología descrita por Folch y colaboradores (1957).

Para cada muestra se utilizaron 250 mg del tejido hepático exactamente, que se extrajeron por fraccionamiento en frío de la alícuota, previamente almacenada en a -80 °C en crio-tubos para la realización de la metodología. Los 250 mg de tejido hepático se trituraron con mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta formar una pasta homogénea, la que posteriormente se arrastró cuantitativamente con 5 mL de una mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v) con BHT (0,001%) a -20 °C, a un tubo de extracción Pyrex de 10 mL con tapa hermética, en base a la relación 20:1 de volumen de solución extractiva versus gramos de tejido, descrita por Folch y colaboradores (1957). La extracción se llevó a cabo agitando enérgicamente la mezcla durante 10 minutos en vortex de la siguiente forma; por cada minuto de agitación, la muestra se enfrió por 30 segundos en hielo, con objeto de impedir un aumento de la temperatura. El tiempo total de procedimiento fue de 15 minutos por muestra, considerando los 10 minutos de extracción efectiva más los 5 minutos derivados de la suma de los tiempos de enfriamiento.

Posteriormente, la muestra se centrifugó a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C, para ser después filtrada en papel libre de grasa sobre un segundo tubo con tapa, al que se le agregó 1 mL de solución acuosa de MgCl<sub>2</sub> al 0.5%, para luego cerrarlo herméticamente

y agitarlo enérgicamente durante un minuto. El sistema bifásico formado se centrifugó nuevamente a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C, se abrió y se retiró la fase orgánica inferior con una jeringa de vidrio, para traspasarla a un tercer tubo con tapa rosca, previamente tarado.

Con objeto de reducir la pérdida de materia grasa que quedaba en la alícuota final de fase orgánica al fondo del segundo tubo, imposible de ser extraída con la jeringa sin succionar fase acuosa, se agregó un mL adicional de cloroformo se cerró herméticamente, agitando nuevamente el tubo durante un minuto, el que se volvió a extraer con la jeringa para traspasarlo al tubo de gravimetría. Este último procedimiento se repitió dos veces para cada muestra. Finalmente, el cloroformo fue evaporado manualmente con nitrógeno, calentando el tubo en un baño termo-regulado a 60 °C, determinándose el contenido de materia grasa por gravimetría.

### **3.3.4.- Evaluación histopatológica del tejido hepático**

El análisis histopatológico de las muestras de hígado se realizó para tres animales por grupo mediante tinción de rutina para el diagnóstico de alteraciones hepáticas con los colorantes hematoxilina y eosina, de acuerdo a una modificación de la metodología descrita por Lillie (1965).

Para cada muestra se utilizaron 300 mg del tejido hepático que luego de la perfusión del órgano posterior al sacrificio fueron fijados en solución de formalina neutra al 10% por 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente el tejido se deshidrató mediante el traspaso sucesivo por soluciones alcohólicas en grados ascendentes (80°-96°-100°) por 35 minutos cada uno. El medio de corte utilizado fue parafina y la inclusión del tejido en este medio se realizó a 60 °C (temperatura de fusión de la parafina) por una hora. La solidificación del medio de corte en el molde se realizó a temperatura ambiente. El corte del molde se realizó en un micrótopo ajustado para obtener un espesor de 5 micrones y su montaje de la lámina se realizó sobre un portaobjetos de vidrio recubierto con albúmina de Mayer, Meridian (código 800700), al 10% en un baño de agua destilada a 37 °C. El retiro de la parafina de los cortes se realizó mediante tres baños sucesivos con xilol de 5 minutos cada uno y la eliminación del xilol se realizó mediante el lavado sucesivo con soluciones alcohólicas en grados descendentes (100°-96°-80°). La rehidratación de cada preparación se realizó mediante inmersión en agua destilada durante 3 minutos. La tinción nuclear se realizó con hematoxilina al 5% durante 5 minutos y el subsecuente viraje de dicho colorante se realizó mediante incubado con agua destilada hasta desprendimiento total del color. Posteriormente se lavó cada preparación con agua destilada y se tiñó el citoplasma con eosina al 0,5% durante 30 segundos, para finalmente lavar la muestra con agua destilada. La deshidratación de la muestra se realizó mediante tres baños sucesivos de etanol en grados ascendentes (70°-96°-100°) por 5 minutos cada uno. La aclaración de cada muestra se llevó a cabo con xilol durante 25 minutos. El montaje de la muestra se realizó

contra un portaobjeto superior utilizando bálsamo de Canadá (resina natural obtenida de abeto balsámico de Canadá) Merck (código 1016910100) como sellante.

### **3.3.5.- Determinación de la insulinemia plasmática**

La resistencia a la insulina se determinó evaluando la concentración de la hormona en ayunas utilizando un kit comercial de ELISA ultrasensible, específico para la determinación de insulina de ratas, (ALPCO, número de catálogo 80-INSRTU-EXO). El Kit ALPCO 80-INSRTU-EXO se basa en la tecnología de ELISA (ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas) de tipo sándwich (Finlay & Dillard, 2007).

El método consiste en la fijación del antígeno a determinar sobre la superficie del medio de reacción, lo que ocurre mediante unión a un anticuerpo primario anclado covalentemente a las paredes del tubo de ELISA. Posteriormente se realizó la detección en base a la adición de un anticuerpo secundario, específico para el mismo antígeno, que su vez está ligado a una enzima que cataliza una reacción que da origen a un producto cuya concentración es proporcional a la cantidad de antígeno ligado y es detectada mediante espectrofotometría.

Para cada muestra se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de plasma exactamente que, fueron agregados a un micro-pocillo de una placa de Elisa de 96 micro-pocillos. En otros micro-pocillos de la misma placa se realizó la curva de calibración agregándose 0,25  $\mu\text{L}$  de estándar de insulina a distintas concentraciones (0, 0.15, 0.4, 1, 3, 5.5 ng/mL) incluidas en el KIT. Luego se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de la solución de conjugación (incluida en Kit ALPCO 80-INSRTU-EXO sin informar composición) y se dejó incubar la placa por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital marca CFL modelo 3023 a 700 rpm con objeto de ligar la insulina al anticuerpo primario.

Posteriormente, se procedió a remover el plasma sobrante utilizando un limpiador de micro-placas con 350  $\mu\text{L}$  de solución de lavado, que incorporaba además el anticuerpo secundario (solución incluida en el Kit ALPCO 80-INSRTU-EXO sin informar composición, concentraciones y enzima ligada), procedimiento que se repitió 6 veces. A cada micro-pocillo de la placa lavada se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución con el sustrato de la enzima (solución incluida en el Kit ALPCO 80-INSRTU-EXO sin informar sustrato ni concentración) por 30 minutos a temperatura ambiente en el agitador orbital a 700 rpm, con objeto de llevar a cabo la reacción enzimática. Finalmente se detuvo la reacción agregando 100  $\mu\text{L}$  de solución de término (de composición y concentración no informadas en el Kit ALPCO 80-INSRTU-EXO) y se ingresó la micro-placa al detector espectrofotométrico para micro-placas marca Tecan modelo Sunrise, determinando la absorbancia a 450 nm. De los datos obtenidos de la curva de calibración, se graficó la absorbancia en función de la concentración de insulina, gráfico que posteriormente fue utilizado para determinar la concentración de cada una de las muestras.

### **3.3.6.- Determinación de las actividades $\Delta^6$ y $\Delta^5$ desaturasas hepáticas.**

La determinación de las actividades de la  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas se realizó en base a la metodología descrita por Mandon y colaboradores (1987), modificada expresamente para poder ser evaluada sin la utilización de trazadores radioactivos y para poder determinar las actividades de ambas enzimas en una misma reacción biológica. Se utilizó como medio de discriminación de las concentraciones de sustratos y productos cromatografía gas líquido de alta resolución (GLC) acoplada a detector de ionización de llama.

#### **3.3.6.1.- Ensayo Bioquímico**

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó en duplicado, mediante seguimiento indirecto por cromatografía gas líquido, evaluando simultáneamente la desaturación del ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) a ácido estearidónico (18:4 n-3) para la  $\Delta^6$  desaturasa y la desaturación del ácido homogamalinolénico (20:3 n-6) a ácido araquidónico (20:4 n-6) para la  $\Delta^5$  desaturasa, en fracción microsomal de tejido hepático de ratas con EHGNA y ratas controles.

Para cada muestra se utilizaron aproximadamente 500 mg del tejido hepático, que fueron extraídos de la alícuota previamente almacenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la realización de la metodología. El tejido fue descongelado y homogenizado en frío con 10 mL de un buffer que contenía sacarosa 0.25 M, EDTA 0,5 mM, y Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico (HEPES) 5 mM ajustado a pH 7 con NaOH 0,1 N, utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón durante 30 segundos, considerando una homogeneización cada 5 segundos. Posteriormente se procedió a realizar una centrifugación diferencial con objeto de aislar la fracción microsomal de la muestra, que corresponde al conjunto de todas las membranas biológicas del tejido. La primera centrifugación se realizó sobre el homogenizado primario a 2.500 g durante 2 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para remover núcleos celulares y células enteras, los que se descartaron en el precipitado. El sobrenadante de dicha centrifugación se volvió a centrifugar a 20.000 g durante 20 minutos con objeto de remover mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, que se descartaron en el precipitado. Finalmente, se realizó la última centrifugación, del sobrenadante de la centrifugación anterior, llevada a cabo en ultra-centrifuga a 105.000 g durante 60 minutos que separó la fracción microsomal (precipitado) del citosol (sobrenadante) que fue descartado. La fracción microsomal se re-suspendió en el buffer de homogeneización y fue mantenida a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras se le determinó la concentración de proteínas totales, dato necesario para preparar las alícuotas a utilizar en la reacción enzimática. Las alícuotas finales se prepararon para contener como mínimo 200  $\mu\text{L}$  de volumen a una concentración exacta

de 20 mg de proteína por mL, almacenándose a -80 °C hasta el momento de la determinación enzimática.

Los sustratos para la  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas se prepararon independientemente a través de la unión del AGL respectivo (18:3 n-3 para la  $\Delta^6$  desaturasa y 20:3 n-6 para la  $\Delta^5$  desaturasa) a seroalbúmina de bovino desengrasada Merck (Código 12660-100GM) de pureza superior al 96%, de acuerdo a una modificación de método publicado por Spector (1986). Para cada sustrato se preparó un complejo de ácidos grasos/albúmina en una relación molar de 3:1 con una concentración final de sustrato de 1 mM exactamente, el que previamente se tamponó con HEPES (25 mM) y se neutralizó (pH 7,0) con solución de hidróxido de sodio (0,1 N) utilizando pH-metro. Finalmente la solución se gaseó con nitrógeno, se incubó en un tubo cerrado herméticamente por 5 horas a 37 °C en baño termo-regulado con agitación marca Julabo modelo MP 19, obteniéndose un complejo neutro de sal de ácidos grasos/albúmina en la relación molar de 3:1 (Hamilton *et al*, 1991).

El medio de incubación de la muestra correspondió a una modificación del medio utilizado por Araya y colaboradores (2010), conteniendo en un volumen final de 1 mL, 2 mg de proteína microsómica de hígado (muestra), 100 nmoles de cada sustrato y las siguientes cantidades de reactivos y co-factores; 62,5  $\mu$ moles de NaF, para desactivar ATPasas, 0,1  $\mu$ moles CoA como transportador de ácidos grasos, 4  $\mu$ moles de ATP como activador de ácidos grasos, 2,42  $\mu$ moles N-acetilcisteína, 0,5  $\mu$ moles nicotinamida, 5  $\mu$ moles MgCl<sub>2</sub> y 62,5  $\mu$ moles de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como co-factores, 1,28  $\mu$ moles NADPH como equivalente reductor, condiciones de saturación enzimática que aseguraban una cinética lineal de tipo michaeliano para ambas desaturasas durante todo el transcurso de la reacción. Todos los componentes de la incubación se prepararon una sola vez, siendo almacenados por separado en alícuotas de 150  $\mu$ L a -80 °C las que se utilizaron a medida que se fueron requiriendo, para luego descartar la porción sobrante.

Las determinaciones se realizaron en tubos de ensayo Pyrex de 10 mL con tapa rosca hermética a los que se les agregaron los sustratos, reactivos y co-factores, para después sumergirlos en el baño termo-regulado a 37 °C con agitación marca Julabo modelo MP 19, donde se mantenían pre-incubándose por 15 segundos hasta el momento del inicio de la reacción, evento que ocurría al adicionar la muestra con los microsomas hepáticos. Las condiciones de reacción para todas las muestras fueron 60 minutos a pH 7,0 y 37 °C. La reacción se detenía mediante la adición de solución metanol/cloroformo (2:1 v/v) con BHT (0,001%) Sigma-Aldrich (Código B1378) a -20°C, correspondiente al reactivo de extracción de Bligh and Dyer (1959). Finalmente, antes de comenzar la extracción, a cada muestra se le agregaron 25  $\mu$ g de ácido heptadecanoico (17:0, 99% de pureza, Sigma) disueltos en 50  $\mu$ L de hexano de calidad HPLC como estándar interno y se termina cerrando el tubo herméticamente.

### 3.3.6.2.- Extracción lipídica y aislación de los ácidos grasos

La fracción grasa del sistema de incubación fue extraída de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Bligh and Dyer (1959), considerando los volúmenes iniciales de extracción originalmente sugeridos por dicha metodología, que son una mezcla cloroformo/metanol/fase acuosa (v/v/v 1:2:0,8). Los volúmenes de extracción para cada tubo fueron 1,25 mL de cloroformo, 2,5 mL de metanol (que se agregaron como 3,75 mL de mezcla con BHT al 0,001%) sobre 1 mL del medio de incubación con 2 mg de proteína microsómica, que para los efectos de la extracción correspondía a la fase acuosa.

La extracción se llevó a cabo agitando energicamente la mezcla durante 10 minutos en vortex de la siguiente forma; por cada minuto de agitación, la muestra se enfrió por 30 segundos en hielo, con objeto de impedir un aumento de la temperatura. El tiempo total de procedimiento fue de 15 minutos por muestra, considerando los 10 minutos de extracción efectiva más los 5 minutos derivados de la suma de los tiempos de enfriamiento. Luego de la extracción el tubo se abrió, se le agregó 1,25 mL de cloroformo, se cerró y se agitó energicamente por un minuto, con lo cual se formaba un sistema de 2 fases. A ese sistema se le adicionaron de la misma forma 1,25 mL de solución acuosa de  $MgCl_2$  al 0,5%, volviendo a agitar energicamente el tubo por 1 minuto. Este procedimiento separaba completamente la fracción apolar inferior, compuesta por la materia grasa disuelta en el cloroformo, de la fase polar superior.

Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C, para después extraerle la fase inferior orgánica con una jeringa de vidrio, la que se traspasó a un tubo Pyrex de 10 mL con tapa rosca de silicona, sobre el cual se realizó la derivatización. Sobre la fase polar remanente se realizó una segunda extracción, agregando 1,88 mL de cloroformo, agitando energicamente la nueva mezcla durante 5 minutos en vortex de la siguiente forma, por cada minuto de agitación, la muestra se enfrió por 30 segundos en hielo con objeto de impedir un aumento de la temperatura. El tiempo total de procedimiento fue de 7,5 minutos por muestra, considerando los 5 minutos de extracción efectiva más los 2,5 minutos derivados de la suma del proceso de enfriamiento.

El sistema se centrifugó nuevamente a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C, para retirar la fase inferior apolar con jeringa de vidrio traspasándola al tubo de derivatización que contenía la fase orgánica de la primera extracción. El cloroformo fue evaporado manualmente con nitrógeno, calentando el tubo en un baño termo-regulado, marca Julabo modelo MP 19, a 60 °C, para obtener la materia grasa extraída.

La derivatización a ésteres metílicos se realizó mediante una hidrólisis básica, seguida de una hidrólisis ácida utilizando  $BF_3$  como ácido de Lewis. La saponificación se realizó adicionando 0,5 mL de solución de NaOH 0,5 N en metanol al tubo, el que se gaseó con nitrógeno, se cerró herméticamente y se calentó a 100° C durante 10 minutos. Posteriormente cada tubo se enfrió bajo chorro de agua, se abrió y se le agregó 1 mL de

BF<sub>3</sub>, Merck (Código8016630500), al 12,5% en metanol, se gaseó con nitrógeno, se cerró herméticamente y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. La solución derivatizada se enfrió bajo chorro de agua, se abrió y se le agregaron 3 mL de solución acuosa de NaCl saturada y 1 mL de hexano de calidad HPLC, se agitó enérgicamente, se gaseó con nitrógeno y se dejó reposar cerrada durante una hora en refrigerador a 6 °C. Finalmente se extrajeron 800 µL de la fase orgánica superior, que se trasvasaron a viales ámbar de 5 mL, se gasearon con nitrógeno, se cerraron herméticamente almacenándose a -20 °C hasta el momento del análisis.

#### 3.3.6.3.- Análisis de la composición de ácidos grasos de la muestra

El análisis de la composición de ácidos grasos de la muestra se realizó utilizando un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, modelo HP 6890 empleando una columna capilar HP-88 (60 m 0,25-mm i.d., 0,2-mm film) e hidrógeno molecular ultra puro como fase móvil con un flujo constante de 2,1 mL /minuto. El programa cromatográfico comenzó con una temperatura inicial de 160 °C por 3 minutos seguidos de una sola rampla de 2 °C / minuto hasta 210 °C, temperatura que se mantuvo constante por 5 minutos. Para cada determinación se inyectaron manualmente 1 µL de muestra con una razón de Split de 5 a 1. Cada uno de los ácidos grasos estudiados se identificó por comparación de sus tiempos de retención en la muestra con el tiempo de retención de empleando estándares individuales para cada uno de los ácidos grasos; 18:3 n-3 Sigma-Aldrich código L2626-100MG, 18:4 n-3 Fluka código 56463-1mL, 20:3 n6 Sigma-Aldrich código E3511-100MG y 20:4 n6 Sigma-Aldrich código A9298-50MG, todos de pureza 99%.

#### 3.3.6.4.- Validación de la metodología para la determinación de las actividades 6 y 5 desaturadas.

Desde el comienzo de esta tesis la implementación de la determinación de las actividades 6 y 5 desaturadas se consolidó como el desafío más difícil, dada la gran cantidad de variables biológicas y metodológicas que podían interferir en la reacción, afectando la reproducibilidad y por lo tanto, la estandarización de la metodología. La implementación de esta técnica requirió como trabajo anexo, la realización de una validación metodológica de la determinación simultánea de las actividades 6 y 5 desaturadas. Para esta validación metodológica se utilizó un conjunto de ratas Sprague Dawley macho distintas e independientes de las ratas Wistar casos y controles empleadas para probar la hipótesis de esta tesis. El procedimiento de validación metodológica se realizó con anterioridad al desarrollo experimental de la tesis. La estandarización de la metodología hasta obtener una reproducibilidad acorde a las necesidades de un estudio clínico tardó aproximadamente 15 meses, sin considerar el tiempo que posteriormente se invirtió en obtener los resultados de desaturación de las ratas Wistar casos y controles utilizadas en la tesis.

#### 3.3.6.4.1.- Ensayo preliminar de la actividad $\delta$ desaturasa en biopsias humanas

El primer desafío técnico para la implementación de la metodología fue la escasa cantidad de muestra que se tenía a disposición cuando la tesis estuvo basada en un estudio con pacientes humanos. El bajo peso de las biopsias impidió la implementación de una centrifugación diferencial completa, tomándose la decisión de descartar la ultracentrifugación a 105.000 g, trabajando con el extracto que contenía membranas y citosol.

La determinación de la actividad  $\delta$  desaturasa con dicho extracto muchas veces resultó infructuosa, pero hubo pacientes en los cuales resultó posible de medir. Lamentablemente no se disponía de suficientes alícuotas de biopsia por paciente como para haber hecho pruebas de reproducibilidad, lo que creó la necesidad de ensayar la técnica accediendo a muestras sin limitación de cantidad, tomándose la decisión de evaluar la desaturación  $\delta$  en hígados de ratas de laboratorio.

#### 3.3.6.4.2.- Ensayo preliminar de la actividad $\delta$ desaturasa en necropsias de ratas

Del laboratorio de fisiopatología cardíaca de la Facultad de Medicina, actualmente a cargo de la doctora Gina Sánchez, se obtuvieron 7 hígados de ratas Sprague Dawley machos adultos jóvenes con un peso aproximado de 220 gramos, que no sufrieron de ningún tipo de intervención con anterioridad al sacrificio. El período de recolección de muestra fue de 2 meses, a una tasa de aproximadamente 1 rata por semana. Los hígados fueron extraídos durante una cirugía orientada a extraer el corazón, siendo perfundidos, alícuotados y almacenados en nitrógeno líquido bajo el mismo procedimiento señalado anteriormente para la toma de muestra. La determinación de la actividad  $\delta$  desaturasa en estos animales empezó a repetir el patrón observado para las biopsias humanas, a pesar de que para estas muestras, a diferencia de las biopsias humanas, se trabajó con microsomas aislados por ultracentrifugación. Sin embargo, cuando solo se había ensayado la reacción en 5 hígados, los primeros de acuerdo al orden de recolección, el cromatógrafo de gases utilizado para realizar las determinaciones falló, estando no operativo por aproximadamente 10 meses. Dicho imprevisto generó la necesidad de acceder a otro equipo, el que fue facilitado gentilmente y de manera gratuita por la Doctora Lilia Masson, académico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, instrumento sin el cual hubiese sido imposible la realización de esta tesis.

La utilización de este nuevo equipo presentó un desafío adicional; estaba calibrado manualmente para el análisis de alimentos, lo que consideraba concentraciones de materia grasa 2 órdenes de magnitud mayores que las utilizadas para el análisis de desaturasas (100 mg versus entre 0,5 a 1 mg). Aquello implicó que bajo el procedimiento metodológico utilizado hasta ese momento, la señal entregada por el equipo era muy pequeña, haciendo necesaria la adición una nueva etapa al proceso. La nueva etapa consistió en una concentración de hasta 50 veces de la muestra final de

ésteres metílicos disueltos en hexano que se inyectaba al equipo, lo que permitió obtener una respuesta razonable.

Los resultados obtenidos bajo estas nuevas condiciones también repitieron el patrón original observado para las biopsias humanas, pero agregando un factor de incertidumbre adicional, se perdió la reproducibilidad entre actividades  $\beta$  desaturasa provenientes de un mismo hígado. Aquello planteó un escenario que hizo dudar hasta de la integridad de los co-factores previamente alicuotados y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que fueron descartados y preparados nuevamente a partir de reactivos nuevos. Sin embargo, la reformulación de los reactivos no modificó la tendencia de resultados anteriormente mencionada.

Finalmente se concluyó que una combinación entre la inexactitud generada por la dificultad de concentrar cuantitativamente pequeños volúmenes de muestra ( $500\text{ }\mu\text{L}$  a  $10\text{ }\mu\text{L}$ ), sumado a un problema propio de las necropsias de hígado (se postuló que algunas ratas tenían la desaturación  $\beta$  inhibida por razones desconocidas), estarían dando cuenta de la falta de reproducibilidad de los resultados obtenidos.

De la información recopilada para la realización de la tesis, en conjunto con nuevos antecedentes obtenidos de una revisión bibliográfica posterior, se hipotetizó que probablemente fueron cambios en la dieta de las ratas utilizadas el factor que podría haber inhibido la desaturación  $\beta$ . Esta hipótesis resultó consistente con ensayos piloto realizados en duplicado a dos lotes distintos del mismo alimento de las ratas del laboratorio de fisiología cardiaca (Pellet comercial) que mostraron marcadas diferencias, tanto en la composición proximal como en el perfil de ácidos grasos, siendo esta última variable el parámetro con mayores variaciones.

3.3.6.4.3.- Desarrollo de un modelo biológico para la estandarización de la metodología para la determinación simultánea de las actividades  $\beta$  y  $\alpha$  desaturasas.

La muy probable influencia de la dieta sobre alteración de la actividad  $\beta$  desaturasa, llevó a concluir que era necesario desarrollar un modelo biológico de estandarización de la metodología, que tuviera como base un control nutricional. Todo el procedimiento de estandarización en base este nuevo modelo se realizó con el equipo original de la Facultad de Medicina, ya reparado.

El modelo biológico desarrollado para la validación definitiva de la metodología para evaluación simultánea de las actividades  $\beta$  y  $\alpha$  desaturasas se basó en un sólo grupo de ratas, distintas e independientes a las del estudio clínico utilizadas para esta tesis, siendo de una especie diferente (Sprague Dawley versus las Wistar de la tesis), con una intervención nutricional formulada expresamente para exaltar la desaturación hepática. El modelo de estudio consistió en 9 ratas macho Sprague Dawley con un peso inicial de  $89,5 \pm 6,05\text{ g}$  criadas en el Bioterio Central del ICBM de Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que fueron alimentadas con una dieta balanceada normo

calórica y baja en grasa con una distribución de macronutrientes de 20% de proteínas, 10% de lípidos y un 70% hidratos de carbono, suplementada con micronutrientes de acuerdo a los requerimientos nutricionales de la especie, durante 21 días (Valenzuela *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista de la composición lipídica, para exaltar las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas, la dieta prescindió de los productos finales de la vía; ARA, EPA y DHA y se enriqueció en los precursores vegetales n-6, ácido linoleico y n-3, ácido linolénico, en una relación de 3 es a 2, expresamente elaborada para el modelo. Estas condiciones se obtuvieron utilizando como única fuente de lípidos aceite de rosa mosqueta (Valenzuela *et al.*, 2012).

Previo al sacrificio, se realizó la evaluación bioquímica de transaminasas (GOT y GPT). Posterior a éste, se realizó evaluación histológica de las necropsias hepáticas, como marcadores de integridad tisular, resultando ambos parámetros normales. De estas ratas se extrajeron muestras de hígado las que finalmente se utilizaron para estandarizar la metodología, desde la preparación microsomal, hasta la evaluación de la relación producto precursor.

En una primera instancia, sólo se evaluó la actividad  $\Delta^6$  desaturasa. Para este procedimiento se requiere como mínimo de dos determinaciones cromatográficas por muestra una al inicio de la reacción (tiempo 0) y la otra al término de la reacción (60 minutos después del tiempo 0). La determinación a tiempo 0 se realizó sobre un tubo Pyrex de 10 ml que incluía todo el medio de incubación anteriormente mencionado más la muestra respectiva, pero que no se incubó durante 60 minutos a 37 °C, pasando directamente a la extracción de lípidos y adición de 25 µg de estándar interno 17:0.

La determinación a término de la reacción se realizó sobre un tubo Pyrex de 10 ml que incluía todo el medio de incubación anteriormente mencionado más la muestra respectiva, que se incubó durante 60 minutos a 37 °C, antes de la realización de la extracción de lípidos y adición de 25 µg de estándar interno 17:0. Para todas las muestras ambas determinaciones fueron realizadas en duplicado, por lo que para cada muestra a la que se le determinó actividad  $\Delta^6$  desaturasa se realizaron como mínimo 4 cromatografías.

La actividad se determinó por comparación de las concentraciones del producto y precursor a tiempo 0 y a término de la reacción. La concentración de precursor y producto para la  $\Delta^6$  desaturasa (18:3 n-3 y 18:4 n-3 respectivamente) se calculó a partir de los cromatogramas obtenidos por cromatografía de gases, mediante la comparación de sus áreas con el área del estándar interno ácido heptadecanoico (17:0), cuya concentración se conocía, puesto que a cada tubo de reacción (tiempo 0 y tiempo 60) se agregaban 25 µg de este patrón interno previo a la extracción.

La primera etapa del cálculo de la concentración de los productos y precursores a partir de las áreas del cromatograma fue la determinación de la relación entre el área del estándar interno y el área total de la cromatografía, correspondiente a la sumatoria de las

áreas individuales todos los picos integrados. Dicha relación debe conservarse en los tubos con los medios de incubación correspondientes a tiempo 0 y tiempo 60 minutos de una misma muestra, para validar que no hubo errores metodológicos a lo largo del procedimiento. Se parte de la base que la cantidad total de ácidos grasos no debe variar en el transcurso de una reacción que ocurre en un ambiente reductor, independiente de que unos se transformen en otros.

Dado que se agregaron 25 µg de estándar interno 17:0 a cada uno de los 4 tubos usados por muestra, se procedió a considerar que en el cromatograma procedente del análisis de cada uno de los tubos, el área del pico correspondiente al ácido heptadecanoico representaba entonces 25 µg de ácido graso. La comparación de esta área con las áreas observadas de cada uno de los restantes ácidos grasos del cromatograma permitió estimar la cantidad de producto y precursor en cada uno de los tubos (ya fuera el de tiempo 0 o el de término de la reacción). Bajo este procedimiento se determinó, en cada grupo de estudio, la concentración en µg del precursor 18:3 n-3 y del producto 18:4 n-3 a tiempo 0 y 60 minutos. Esta estimación no obstante presentó errores que al final del análisis no influyeron sobre la diferencia de actividad enzimática observada. Uno de estos errores era la presencia natural en bajas cantidades de ácido heptadecanoico, usado como estándar interno, en las muestras, lo cual fue imposible de determinar por el equipo, dado que los lípidos de la fracción microsomal (que corresponden casi en su totalidad a fosfolípidos) son muy escasos en 17:0, lo que dejó a este compuesto bajo el límite de detección del equipo. El segundo error derivó de que la estimación de las concentraciones de productos y precursores que contenían 18 carbonos, se realizó utilizando un estándar de 17 carbonos, lo que implica un error mínimo en la estimación debido a que el detector de ionización por llama genera una respuesta que es función del largo de cadena del ácido graso. Sin embargo, como para este caso la diferencia en el número de átomos de carbono entre productos y precursores con el estándar es de sólo 1, entonces se asume que el error de determinación es mínimo.

La determinación tuvo una secuencia temporal, en tiempo 0 y 60 minutos, y fue realizada siguiendo el mismo protocolo descrito en el párrafo anterior, esto significa que ambos errores de determinación causados por el uso del estándar 17:0, es el mismo en ambos periodos de tiempo. Como existe igualdad de error mediado por el estándar utilizado en ambas mediciones, la diferencia observada ( $t_{60}-t_0$ ), necesaria para determinar la cinética enzimática, corresponde a la diferencia real.

Estos errores descritos en los párrafos precedentes, se presentaron tanto en los grupos caso como control de este estudio (Ratas Wistar de la tesis), no afectando la determinación de la diferencia en la actividad enzimática.

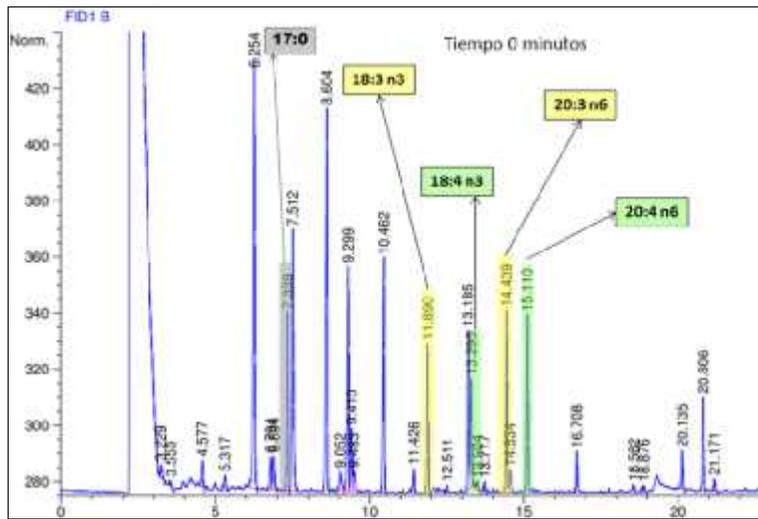
Con los datos de concentración se procedió a efectuar la diferencia entre la concentración de precursores a tiempo 0 y transcurridos 60 minutos de la reacción, lo que entregó la cantidad de precursor que se transformó a producto. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los productos, efectuando la diferencia entre la concentración a tiempo 60 minutos de la reacción y la concentración a tiempo 0, lo que

entregó la cantidad de producto formado. Si ambos datos no resultaban sustancialmente distintos, podía concluirse que de la ruta biosíntesis de AGPCL, sólo la desaturación se estaba llevando a cabo a una velocidad medible. Si la aparición de producto era menor a la desaparición de sustrato, podía concluirse que había una continuidad de la vía, elongándose parte del producto formado, al ser este último compuesto sustrato de las elongasas de la ruta. Tanto para las ratas del modelo de estandarización (Sprague Dawley) como para las de la tesis (Wistar), los datos de desaparición de sustrato y de aparición de producto resultaron consistentes.

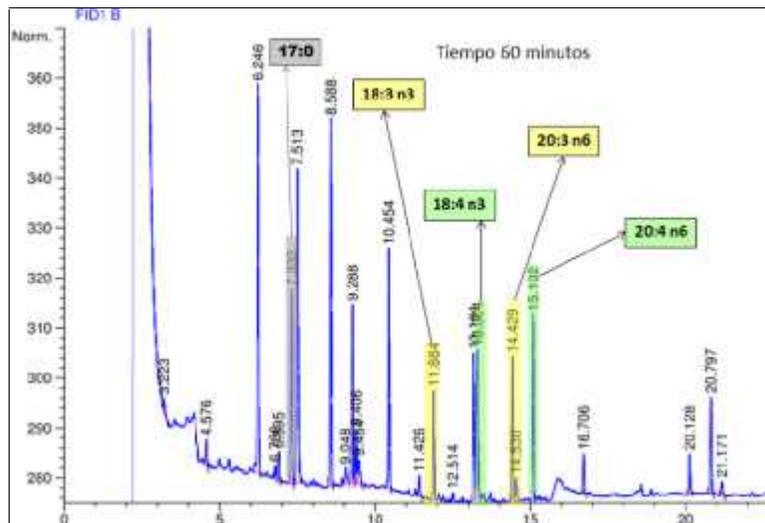
Una vez estandarizada la metodología para la actividad  $\Delta^6$  desaturasa, se procedió a repetir la misma secuencia de procedimiento para la  $\Delta^5$  desaturasa, por lo que ambos métodos fueron primero estandarizados de manera independiente. Posteriormente se procedió a estandarizar la evaluación de las dos actividades enzimáticas de manera simultánea (en un mismo tubo de ensayo), corroborando que ambos procedimientos no se interfirieran entre sí durante el transcurso de la reacción.

La intención de implementar esta determinación simultánea, desarrollada específicamente para esta tesis, fue la razón para la utilización de precursores de distintas familias para cada enzima (precursor n-3 para la  $\Delta^6$  desaturasa y precursor n-6 para la  $\Delta^5$  desaturasa). (Aquello) Este procedimiento tuvo como objetivo prevenir la incertidumbre que se hubiese producido de usar para las dos enzimas, ácidos grasos de la misma familia en una reacción simultánea. Se partía de la base que bajo las condiciones de incubación utilizadas, toda la ruta estaría activada y eventualmente algo de producto de la  $\Delta^6$  desaturasa (18:4 n-3 por ejemplo) podría haberse elongado hasta transformarse en producto de la  $\Delta^5$  desaturasa de la misma vía (20:4 n-3). A pesar de que esta incertidumbre era pequeña dado que la mayoría del malonil-CoA, sustrato necesario para la elongación, se descartaba en la fracción citosólica, el remanente microsomal eventualmente pudiese haber afectado. En cualquier caso, el problema se prevenía utilizando un sustrato para la  $\Delta^5$  desaturasa de la otra familia dado que, por ejemplo para el caso de esta tesis, la cantidad de intermediario 20:4 n-3 formado por eventual continuación de la ruta de los n-3 hubiesen sido órdenes de magnitud menor que los elevados niveles de 20:3 n-6 agregados como sustrato, haciendo irrelevante la competencia.

En la comparación de las figuras 10 y 11, correspondiente a los cromatogramas de perfil de ácidos grasos de una misma preparación microsomal, a tiempo 0 y 60 minutos transcurridas las reacciones enzimáticas, puede apreciarse como, para la  $\Delta^6$  y la  $\Delta^5$  desaturasas, los precursores disminuyen y los productos aumentan una vez finalizada la reacción. En ambas figuras se puede observar también el pico correspondiente al estándar interno agregado.



**Figura 10. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de la preparación microsomal a tiempo 0 analizado por GLC.** En amarillo se destacan los precursores (18:3 n3 y 20:3 n6), en verde los productos (18:4 n3 y 20:4 n6) y en gris el estándar interno (17:0).



**Figura 11. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de la preparación microsomal una vez finalizada la reacción, analizado por GLC.** En amarillo se destacan los precursores (18:3 n3 y 20:3 n6), en verde los productos (18:4 n3 y 20:4 n6) y en gris el estándar interno (17:0).

Finalmente se logró establecer que el tejido hepático de dichos animales estaba efectuando desaturación, dentro de los rangos descritos en la literatura para la especie (Brown, 2005). Se determinaron valores de velocidad bajo condiciones de saturación de sustrato para la 6 desaturasa de 0,146 +/- 0,012 nmol/min/(mg de proteína microsómica) y de 0,162 +/- 0,020 nmol/min/(mg de proteína microsómica) para la 5 desaturasa.

### 3.3.7.- Determinación de la expresión génica de la enzima $\Delta^6$ desaturasa

La determinación de los niveles de expresión del gen de la  $\Delta^6$  desaturasa (*Fads 2*) se realizó mediante RT-PCR convencional, evaluando cualitativamente los niveles de RNA mensajero (RNAm) de la enzima en casos y controles en relación a los niveles de RNAm de proteína microsomal 18S, un gen de expresión constitutiva cuya inducción es independiente del estado fisiológico.

Para cada muestra se utilizaron aproximadamente 100 mg del tejido hepático, que se extrajeron por fraccionamiento en frío de la alícuota de la alícuota previamente almacenada en crio-tubos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la realización de la metodología. Cada muestra se disgregó en un mortero incorporando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Del tejido disgregado se pesaron 50 mg exactamente para las muestras control y 60 mg exactamente para las muestras caso, que fueron homogenizados en frío suavemente con 1 mL de TRIzol® utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de vidrio esmerilado, hasta apreciar homogeneidad. El tejido homogenizado se centrifugó a  $10.000\text{ g}$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,5 mL donde se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó enérgicamente por 15 segundos y se incubó en hielo por 3 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a  $10.000\text{ g}$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La fase superior que contenía el RNA, se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se dejó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó  $10.000\text{ g}$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para finalmente descartar el sobrenadante. El RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a  $5.000\text{ g}$  por 5 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , procedimiento que se repitió 2 veces. Finalmente la solución de etanol se descartó y el tubo se (dejó) secó con vacío a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para resuspender el RNA en 25  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. La integridad del RNA extraído se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y su concentración se determinó por análisis espectrofotométrico de la densidad óptica a 260 nm y la relación de las densidades ópticas a 260 nm y 280 nm.

El DNA complementario se sintetizó a partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNA, utilizando 0,5  $\mu\text{L}$  de hexámeros (100 mM) como primers, 1,0  $\mu\text{L}$  de mezcla de dinucleótidos trifosfato (10 mM de adenina trifosfato, 10 mM de guanina trifosfato, 10 mM de citosina trifosfato y 10 mM de timina trifosfato), marca Promega, 1,0  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptasa reversa AMV marca Promega y 2,0  $\mu\text{L}$  del detergente ditiotreitól (DDT) 0,1 M como inhibidor de RNAsas, en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

Todos los análisis de expresión de RNAm se realizaron por PCR convencional utilizando DNA polimerasa Paq5000 (Stratagene), 2 $\mu\text{L}$  de DNA complementario, 2 $\mu\text{L}$  de desoxinucleótidos y los partidores específicos para el RNAm de *Fads 2* (fwd: 5'-TGCCACAAGTTTGTCATTGG- 3'; rev: 5'-ACACGTGCAGGCTCTTTATG -3') y rRNA18S (fwd: 5'-GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3'; rev: 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3') a una concentración final de 250 nM en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

Todas las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en el equipo Swift Maxi Esco. Cada reacción de PCR consistió en 35 ciclos, compuestos de 45 segundos a 94 °C; 45 segundos a 54 °C o 57 °C, dependiendo el set de partidores, y 60 segundos a 72 °C, más un ciclo de 10 min a 72 °C de extensión final. Como control de interno de la amplificación, el transcrito estudiado se comparó con la amplificación del fragmento de RNA de 18S. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio y su densidad óptica se analizó mediante análisis de la fotografía digital a través del software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD)

### **3.3.8.- Determinación de parámetros asociados a EOX**

#### 3.3.8.1.- Estatus REDOX intracelular

El estatus REDOX intracelular se determinó mediante la medición de la relación GSH/ GSSG en tejido hepático, de acuerdo a la metodología estandarizada por Hissin y Hilf (1976).

Para cada muestra se utilizaron 100 mg del tejido hepático exactamente, que se extrajeron por fraccionamiento en frío de la alícuota previamente almacenada a -80 °C en crio-tubos para la realización de la metodología. Los 100 mg de tejido hepático se descongelaron y se homogenizaron en frío con una mezcla compuesta por una combinación de 9 mL de buffer fosfato a pH 8 con EDTA 5mM y 2,4 mL de solución de HPO<sub>3</sub> al 25% utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón durante 30 segundos, considerando, una homogeneización cada 5 segundos. El homogeneizado se ultracentrifugó a 100.000 g durante 30 minutos a 4 °C con objeto de obtener el sobrenadante a utilizar para la metodología.

La determinación de GSH se realizó en duplicado para cada muestra, utilizando 50 µL del sobrenadante, al que se le agregaron 2.850 µL de buffer fosfato a pH 8 con EDTA y 100 µL de solución de O-ftalaldehído en metanol (1 mg/mL), y luego se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la fluorescencia con un fluorímetro marca BioRad modelo Versa-Fluor, a 420 nm en cubetas de cuarzo de 3,5 mL, utilizando un haz de excitación a 350 nm. Los valores de fluorescencia se llevaron a concentración mediante comparación con los datos provenientes de una curva de calibración estándar de 10 puntos, realizada de manera previa al procesamiento de las muestras. Para la curva de calibración se utilizó un estándar comercial de GSH Sigma-Aldrich (código G4251), basándose en una curva de calibración de 9 puntos (6,6, 13,2, 19,8, 26,4, 33, 39,6, 46,2, 52,8 y 66 ng/mL).

La determinación de GSSG se realizó en duplicado para cada muestra, utilizando 250 µg de sobrenadante, el que se mezcló con 100 µL de N-etilmaleimida (5 mg/mL), luego se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente a que posteriormente se le agregaron 500 µL de NaOH 0.1N a la mezcla. De esta nueva dilución se extrajeron 50

$\mu\text{L}$ , a los que se les agregaron 2.850  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato a pH 8,0 con EDTA y 100  $\mu\text{L}$  de solución de O-ftalaldehído en metanol (1mg/mL), la que luego se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la fluorescencia con un fluorímetro marca BioRad modelo Versa-Fluor, a 420 nm en cubetas de cuarzo de 3,5 mL, utilizando un haz de excitación a 350 nm. Los valores de fluorescencia se llevaron a concentración mediante comparación con los datos provenientes de una curva de calibración estándar de 10 puntos, realizada de manera previa al procesamiento de las muestras. Para la curva de calibración se utilizó un estándar comercial de GSSG Sigma-Aldrich (código G4501), basándose en una curva de calibración de 9 puntos de (3,3, 6,6, 9,9, 13,2, 16,5, 19,8, 23,1, 26,4, 29,7, 33 ng/mL).

### 3.3.8.2.- Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se midió a través de la determinación en duplicado de malondialdehído (MDA) por la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección fluorométrica, la que presenta un límite de detección de 0,48  $\mu\text{mol/L}$ , en base a una modificación de la técnica de Buege y Aust (1978), realizada por Young y Trimble (1991).

Para cada muestra se utilizaron 25 mg del tejido hepático exactamente, que se extrajeron por fraccionamiento en frío de la alícuota de la alícuota previamente almacenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en crio-tubos a para la realización de la metodología. Los 25 mg de tejido hepático fueron descongelados y homogenizados en frío con 225  $\mu\text{L}$  de KCl 1.15%, utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón durante 30 segundos, considerando una homogeneización cada 5 segundos. Posteriormente se centrifugó el homogenizado durante 8 minutos a 2.000 g, donde se obtuvo el sobrenadante al que se le determinó la concentración de proteínas de acuerdo al método de Lowry (1951) explicado anteriormente. Para la derivatización del MDA se utilizaron tubos herméticos de 3 mL a los que se les agregó 250  $\mu\text{L}$  ácido metafosfórico 1,22 M, 475  $\mu\text{L}$  de agua HPLC, 250  $\mu\text{L}$  de TBA 0,44 M (todos los reactivos se disolvieron y se aforaron con agua calidad HPLC) y finalmente 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante (muestra). Los tubos herméticos se calentaron a baño maría en hirviendo durante una hora y posteriormente se enfriaron durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra enfriada fue mezclada con 360  $\mu\text{L}$  de metanol y 40  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M, las que posteriormente se inyectaron mediante jeringas plásticas desechables con filtros, para evitar el ingreso de impurezas sólidas al equipo.

La concentración se determinó mediante la comparación de cada muestra con una curva de calibración de 6 puntos, con concentraciones que van de 0  $\mu\text{M}$  hasta 4.8  $\mu\text{M}$  utilizando MDA Sigma-Aldrich (código T550-0) disuelto en agua de HPLC. Las determinaciones se realizaron en un equipo marca Waters modelo 600 con un detector de fluorescencia marca Waters modelo 474. Las condiciones cromatográficas consistieron en una columna Waters modelo WAT025832, con una fase móvil isocrática, compuesta por una mezcla de tampón fosfato 25 mM pH 6,5 en metanol

(50/50, v/v). El flujo de la inyección fue de 0,8 mL /min y los rangos de detección de excitación y emisión fueron 532 nm y 553 nm, respectivamente.

### **3.3.9.- Evaluación de las defensas antioxidantes enzimáticas celulares**

#### **3.3.9.1.- Actividad SOD**

La actividad superóxido dismutasa se determinó en duplicado sobre la fracción citosólica (sobrenadante de 105.000 g) por un método espectrofotométrico basado en la auto-oxidación de la adrenalina a adenocromo. La actividad SOD se definió en función de la capacidad de esta enzima para inhibir la auto-oxidación espontánea de la adrenalina a pH 10.2 (Misra & Fridovich, 1972).

Para cada muestra se utilizaron 100 mg del tejido hepático exactamente, que se extrajeron por fraccionamiento en frío de la alícuota previamente almacenada a -80 °C en crio-tubos para la realización de la metodología. Los 100 mg de tejido hepático se descongelaron y fueron homogenizados en frío con buffer fosfato salino 1x (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM) ajustado pH 7,0 con HCl 0,1N, utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón durante 30 segundos, considerando una homogeneización cada 5 segundos. El homogenizado se ultracentrifugó a 105.000 g durante 60 minutos a 4 °C con objeto de obtener el sobrenadante correspondiente a la fracción citosólica del tejido, a la que se le determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry (1951) descrito anteriormente. Posteriormente 50 µL del sobrenadante se diluyeron en 950 µL de buffer KCl-Tris (KCl al 1,15%, Tris [tris (hidroximetil) aminometano] 0,12%) a pH 7.40 ajustado con HCl 0,1 N lo que correspondió a la muestra.

Para esta metodología es necesario realizar 4 procedimientos por muestra. El primer procedimiento correspondió a la determinación del blanco, que comenzó con la incubación de 2.95 mL de mL buffer glicina 50mM pH 10.2 durante 3 minutos a 37 °C. Posteriormente, se le agregaron 50 µL adrenalina 60 mM a pH 2.0, se agitó en vortex e inmediatamente se transfirió a una cubeta de cuarzo de 3,5 mL donde se realizó un barrido espectrofotométrico de 3 minutos, con mediciones a intervalos de 15 segundos, a una longitud de onda de 480 nm en un espectrofotómetro HP 8452A con arreglo de diodo. El segundo procedimiento correspondió a la determinación de la cinética de descomposición a la concentración más baja de muestra (m1), que comenzó con la incubación de 2.9 mL de buffer glicina 50mM pH 10.2, durante 3 minutos, a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 50 µL de muestra y se agregaron 50 µL adrenalina 60 mM pH 2.0, se agitó en vortex e inmediatamente se transfirió a una cubeta de cuarzo donde se realizó un barrido espectrofotométrico de 3 minutos, con mediciones a intervalos de 15 segundos, a una longitud de onda de 480 nm. El tercer procedimiento correspondió a la determinación de la cinética de descomposición a la concentración intermedia de muestra (m2), que comenzó con la incubación de 2.87 mL de buffer glicina 50mM pH 10.2, durante 3 minutos, a 37

°C. Posteriormente se agregaron 75 µL de muestra y 50 µL adrenalina 60 mM pH 2.0, se agitó en vortex e inmediatamente se transfirió a una cubeta de cuarzo para realizar un barrido espectrofotométrico de 3 minutos, con mediciones a intervalos de 15 segundos, a una longitud de onda de 480 nm. El cuarto procedimiento correspondió a la determinación de la cinética de descomposición a la concentración más elevada de muestra (m3), que comenzó con la incubación de 2.85 mL de buffer glicina 50mM pH 10.2, durante 3 minutos, a 37 °C. Posteriormente se agregaron 100 µL de muestra y 50 µL adrenalina 60 mM pH 2.0, se agitó en vortex e inmediatamente se transfirió a una cubeta de cuarzo para realizar un barrido espectrofotométrico de 3 minutos, con mediciones a intervalos de 15 segundos, a una longitud de onda de 480 nm.

El cálculo de la actividad enzimática comenzó con la determinación de la concentración para cada punto a partir de la densidad óptica, utilizando un coeficiente de extinción molar de  $4.020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Prosiguió con linealización de cada una de las 4 curvas calculando logaritmo natural para cada punto. Posteriormente se determinó la pendiente de cada una de las 4 rectas derivadas de la aplicación de logaritmo natural y a cada una de las pendientes de la muestra (m1, m2, m3) se le restó la pendiente del control, obteniéndose el logaritmo de la razón de inhibición para cada muestra. Con estos datos se construyó la recta del logaritmo de la razón de inhibición en función de la concentración de muestra agregada, necesaria para calcular la actividad SOD.

### 3.3.9.2.- Actividad CAT

La actividad catalasa se determinó en duplicado de acuerdo al modelo descrito por Aebi (1984), basada en la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm, y expresada en base a la constante de primer orden (k)/mg de proteína.

Para cada muestra se utilizaron 100 mg del tejido hepático exactamente, que se extrajo de la alícuota previamente almacenada a -80 °C para la realización de la metodología. Los 100 mg de tejido hepático se descongelaron y homogenizaron en frío con 400 µL buffer fosfato 50 mM a pH 7,0 ajustado con HCl 0,1 N, utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón durante 30 segundos, considerando una homogeneización cada 5 segundos. El homogeneizado se centrifugó durante 6 minutos a 1.000 g de donde se obtuvo el sobrenadante, al que se le determinó concentración de proteínas. Posteriormente se extrajeron 270 µL del homogenizado y se le agregaron 30 µL Triton 100 (Octoxinol-9; t-octilfenoxipolietoxietanol) en etanol al 10%, dejando reposar la solución durante 30 minutos en hielo. De esta última solución se tomaron 250 µL y se diluyeron en 10 mL de buffer fosfato 50 mM a pH 7,0, quedando una dilución de 1:40, correspondiente a la muestra.

Para la determinación enzimática el primer procedimiento correspondió a la medición de la tasa de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia de tejido (reacción no enzimática). Se llevó a cabo realizando un barrido espectrofotométrico a una mezcla de

2ml de buffer fosfato 50 mM pH 7,0 con 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM en cubeta de cuarzo de 3,5 mL durante un minuto a intervalos de 5 segundos, a una longitud de onda de 240 nm en un espectrofotómetro HP 8452A con arreglo de diodo. Posteriormente se determinó el blanco de la muestra, realizando un barrido idéntico al anterior, pero con una mezcla compuesta de 2 mL de la muestra diluida 1:40 preparada anteriormente y 1 mL buffer fosfato 50 mM pH 7,0. Finalmente se llevó a cabo la determinación enzimática, bajo las mismas condiciones de barrido realizadas anteriormente, pero esta vez mezclando 2ml de la muestra 1:40 y 1ml de peróxido de hidrogeno 30 mM. Todas las mediciones se realizaron en cubetas de cuarzo y antes de ser llevadas al espectrofotómetro se agitaron enérgicamente para realizar una mezcla homogénea.

El cálculo de la actividad enzimática comenzó con la determinación de la concentración para cada punto a partir de la densidad óptica, utilizando un coeficiente de extinción molar de 43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. A cada valor de concentración en función del tiempo del ensayo enzimático se le restó la lectura del ensayo no enzimático respectivo, obteniéndose las concentraciones corregidas, correspondientes a los valores del ensayo enzimático verdadero. El paso siguiente fue la linealización de los valores, mediante el cálculo de logaritmo natural para cada uno de ellos. Posteriormente, al logaritmo de concentración a tiempo 0 se le restó el logaritmo de concentración a cada uno de los intervalos de tiempo medidos, obteniéndose el logaritmo de la razón entre cada tiempo y la concentración inicial. Finalmente cada uno de estos valores se graficó en función del tiempo respectivo obteniéndose la constante cinética de primer orden utilizada para calcular la actividad CAT.

### 3.3.9.3.- Actividad GSH-Px

La actividad glutatión peroxidasa se determinó en duplicado sobre la fracción citosólica (sobrenadante de 105.000 g) por un método espectrofotométrico basado en la reducción de GSSG acoplada a la oxidación de NADPH por la enzima Glutatión reductasa. Una unidad de GSH-Px se definió como la actividad que oxida 1 μmol de NADPH por minuto (Flohé & Günzler, 1984).

Para cada muestra se utilizaron 100 mg del tejido hepático exactamente, que se extrajeron por fraccionamiento en frío de la alícuota previamente almacenada a -80 °C en crio-tubos para la realización de la metodología. Los 100 mg de tejido hepático fueron descongelados y homogenizados en frío con buffer fosfato 0,05 M salino (KCl 140 mM) a pH 7,4 ajustado con HCl 0,1 N, utilizando un homogeneizador manual de tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón durante 30 segundos, considerando una homogeneización cada 5 segundos. El homogenizado fue ultracentrifugado a 105.000 g durante 60 minutos a 4 °C con objeto de obtener el sobrenadante correspondiente a la fracción citosólica del tejido, medio al que se le determinó la concentración de proteínas. Posteriormente, 125 μL del sobrenadante se diluyeron en 9.875 μL de buffer fosfato 0,1 M a pH 7,0 con EDTA 1mM.

Para esta metodología es necesario realizar 4 procedimientos por muestra. El primer procedimiento correspondió a la determinación del blanco de la reacción no enzimática, mezcla que carecía de muestra (sobrenadante diluido) y carecía de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), conteniendo 600  $\mu\text{L}$  buffer fosfato pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  de solución de Glutación Reductasa, 100  $\mu\text{L}$  solución de azida sódica y 100  $\mu\text{L}$  solución de glutatión 10 mM. Dicha mezcla se incubó durante 10 minutos a 37 °C, para posteriormente agregarle 100  $\mu\text{L}$  NADPH 1,5 mM precalentado a 37°C, inmediatamente antes de realizar un barrido espectrofotométrico de 5 minutos a intervalos de 15 segundos en una cubeta de cuarzo de 1 mL, a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro HP 8452A con arreglo de diodo. El segundo procedimiento correspondió al ensayo no enzimático, donde se incubó una mezcla compuesta por 500  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  de solución de Glutación reductasa, 100  $\mu\text{L}$  de solución de azida sódica, 100  $\mu\text{L}$  de solución de glutatión 10 mM, también se incubó durante 10 minutos a 37 °C , para posteriormente agregarle 100  $\mu\text{L}$  NADPH 1,5 mM precalentado a 37 °C y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,5 mM, inmediatamente antes de realizar un barrido de 5 minutos a intervalos de 15 segundos, a una longitud de onda de 340 nm. Obtenidos estos datos, se procedió a realizar la determinación del ensayo enzimático, los cuales fueron réplicas de las mediciones anteriores, pero en este caso, para la mezcla del blanco enzimático se reemplazaron los 600  $\mu\text{L}$  de buffer por 500  $\mu\text{L}$  de buffer más 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante diluido (muestra), en relación al blanco no enzimático. Para el ensayo enzimático, se reemplazaron los 500  $\mu\text{L}$  de buffer utilizados en el ensayo no enzimático, por 400  $\mu\text{L}$  de buffer más 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante diluido (muestra). Todas las mezclas se agitaron enérgicamente antes de realizar las mediciones y todas las lecturas se realizaron en cubetas de cuarzo.

El seguimiento de las reacciones se realizó mediante el monitoreo espectrofotométrico de la descomposición del NADPH consumido durante la reacción, el que absorbe a 340 nm con un coeficiente de extinción molar de  $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , partiendo de la base que por cada mol de NADPH consumido se oxidan dos moles de GSH. El resultado final se obtuvo en base al cálculo de la reacción enzimática verdadera, determinada restandole a la descomposición enzimática aparente de NADPH (ensayo enzimático – blanco enzimático) la descomposición no enzimática (ensayo no enzimático – blanco no enzimático).

### **3.4.- PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

#### **3.4.1.- Cálculo del tamaño muestral:**

El tamaño de muestra fue calculado para cada metodología, tomando en cuenta las diferencias de medias entre casos y controles de investigaciones que utilizaron modelo de obesidad por dieta de cafetería alta en grasas saturadas o similar, en base a la prueba t de Student (Student, 1908).

Para las actividades desaturadas, no se encontraron datos que comparan la actividad desaturada en ratas con EHGNA versus ratas control, por lo tanto, se utilizaron los datos obtenidos por Biagi y colaboradores (1990), quien comparó la actividad  $\delta$  desaturada de personas sanas con pacientes con diferentes tipos de injuria hepática. Para la expresión génica de la  $\delta$  desaturada se utilizaron datos de Montanaro y colaboradores (2003). Para la lipoperoxidación se utilizaron los datos obtenidos por García-Díaz y colaboradores (2007). Para los niveles de GSH se utilizaron los datos obtenidos por Sastre y colaboradores (1989). Para la actividad CAT se utilizaron los datos obtenidos por Amin y colaboradores (2009). Para la actividad SOD se utilizaron los datos obtenidos por Zou y colaboradores (2006). Para la actividad GSH-Px se utilizaron los datos obtenidos por Zhou y colaboradores (2008). Para la determinación del tamaño muestral, se seleccionó la metodología que teóricamente requiriera de un mayor número de ratas para obtener significancia estadística, en este caso, la actividad GSH-Px.

Se determinó un n de 16 con un IC 95% y p80 utilizando el programa Win episcopes versión 2.0 (Blas *et al*, 1998)

- 8 casos
- 8 controles

### **3.4.2.-Procesamiento de datos**

El procesamiento de la información se realizó a través de máscaras creadas en el programa EPI Data versión 2.1 (Lauritsen *et al*, 2001), efectuándose doble digitación a fin de evitar errores en el ingreso de datos.

### **3.4.3.- Estrategia de análisis**

#### **3.4.3.1.- Análisis exploratorio de los datos y exclusión de animales en base estadística**

Primero se realizó un análisis exploratorio de los datos obtenidos para la conformación de los grupos (porcentaje de grasa hepática, ganancia de peso, insulinemia plasmática en ayuno). Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para identificar la distribución de estas variables, considerando que un valor de  $p > 0,15$  correspondía a distribución normal (Shapiro & Wilk 1965). Ninguna de las variables consideradas distribuyó normalmente, resultado esperable producto del bajo n empleado en este estudio, procediéndose a la utilización de estadística no paramétrica. Posteriormente se procedió a la construcción de gráficos de caja para analizar la distribución de los valores, considerando como criterio de valor atípico todo aquel que estuviera bajo el percentil 3 y sobre el percentil 97. Una vez verificados que los valores estaban dentro de los rangos esperados se estimó la mediana y el rango inter-cuartílico. Con estos datos se excluyeron a los animales que más se alejaban de sus respectivos grupos, ajustando el n al valor obtenido del cálculo del tamaño muestral, correspondiente a 8 ratas por grupo. Para

verificar si existía diferencias en las medianas entre los dos grupos de estudio se aplicó el test U-Mann-Whitney y se consideró significativo un valor de p menor de 0,05 (Mann & Whitney, 1947).

Al final del estudio, se realizó el mismo procedimiento de análisis exploratorio para casos y controles, para cada una de las variables que tenían relación con EOx y actividades de 6 y 5 desaturasas.

#### 3.4.3.2.- Estimación de correlaciones

Una vez estimados los valores centrales y la dispersión se procedió a estimar las correlaciones entre los parámetros de EOx, capacidad antioxidante y actividad enzimática 6 y 5 desaturasas. Para ello, y tomando en cuenta que las variables eran continuas, se utilizó correlación de Spearman, considerando como significativo un valor de p menor de 0,05 (Spearman, 1904). En aquellas correlaciones que dieron asociación significativa (positiva o negativa), se procedió a graficar para precisar de mejor manera la distribución de valores entre las dos variables.

## RESULTADOS

### 4.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES Y DE INTERACCIÓN O CONFUSIÓN

#### 4.1.1.- Variables Continuas

Ambos grupos de ratas presentaron pesos iniciales sin diferencias significativas. La mediana de ganancia de peso fue mayor en alrededor de 130 gramos para las ratas caso que las controles ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1). Al analizar las variables nutricionales, se observa que tanto la insulina plasmática como la grasa total del hígado son alrededor de cinco veces mayores en los casos cuando se comparan con sus controles ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1). En relación a la diferencias de medianas de los indicadores REDOX entre casos y controles, sólo se encontraron variaciones con la actividad de GSH/GSSG, GSSG, MDA y SOD ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 1. Características de la población estudiada (n=16).** \* Test U- Mann-Whitney. N.S. = no significativo

<i>Característica</i>	<i>Casos (n=8)</i>	<i>Controles (n=8)</i>	<i>Valor de p*</i>
<b><i>Crecimiento</i></b>			
Peso inicial (g)	204,8 (198,2 – 212,8)	200,4 (194,9 – 210,7)	N.S.
Peso final (g)	<b>548,5</b> <b>(539,5 – 614,3)</b>	<b>409,6</b> <b>(396,5 – 419,1)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
Ganancia de peso (g)	<b>343,8</b> <b>(325,1 – 420,4)</b>	<b>213</b> <b>(187,6 – 220,3)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<b><i>Nutricionales</i></b>			
Insulina plasmática en ayuno (ng/mL)	<b>2,6</b> <b>(2,1 – 2,8)</b>	<b>0,5</b> <b>(0,3 – 0,9)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
Grasa total del hígado (% del peso húmedo)	<b>9,7</b> <b>(7,6 – 10,9)</b>	<b>2,2</b> <b>(1,8 – 2,9)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<b><i>Estrés oxidativo</i></b>			
GSH/GSSG	<b>8,2</b> <b>(6,9 – 8,8)</b>	<b>18,8</b> <b>(15,2 – 21,4)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
GSSG (µmol/g tejido)	<b>0,2</b> <b>(0,2 – 0,5)</b>	<b>0,1</b> <b>(0,1 – 0,2)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
GSH (µmol/g tejido)	2,1 (1,9 – 3,4)	2,4 (2,2 – 2,8)	N.S.
MDA (nmol/mg de prot)	<b>1,4</b> <b>(1,3 – 1,6)</b>	<b>1,2</b> <b>(1,1 – 1,3)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
SOD (U/mg de prot)	<b>69,1</b> <b>(57,3 – 81,5)</b>	<b>100,3</b> <b>(75,5 – 113,1)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
CAT (U/mg de prot)	976,6 (739,7 – 1154,5)	1347,8 (1058,6 – 1450,3)	N.S.
GSH-Px (U/mg de prot)	0,2 (0,1 – 0,2)	0,1 (0,1 – 0,2)	N.S.

#### 4.1.2.- Comparación histopatológica de los grupos de estudio

Como método clínico de confirmación diagnóstica se compararon 3 imágenes obtenidas del tejido hepático del grupo control con 3 imágenes del grupo caso.

En la imagen de tejido proveniente del grupo control se pueden apreciar cordones de hepatocitos que confluyen a la vena central (VC). Los hepatocitos, con citoplasma normal y núcleo central con cromatina normal, se observan limitando con capilares sinusoidales (S), en donde se pueden observar algunas de las células endoteliales (CE) que los constituyen y los macrófagos o células de Kupffer (CK) (Figura 12).

En la imagen de tejido proveniente del grupo caso pueden apreciarse cordones de hepatocitos que confluyen a la vena central (VC). La mayoría de los hepatocitos se observan de forma irregular, con membrana plasmática engrosada y con esteatosis microvesicular (MV) (células espumosas) que probablemente con el tiempo desencadenará una esteatosis macrovesicular por fusión de estas microvesículas lipídicas. El nivel de esteatosis hepática calificaría en un grado 3 (Kleiner *et al*, 2005), siendo posible observar algunos hepatocitos con núcleos más periféricos que centrales (N). Cabe destacar que el lumen de los capilares sinusoidales se observa disminuido, lo que probablemente altera al espacio de Disse y dificulta el intercambio metabólico del órgano (Figura 13).

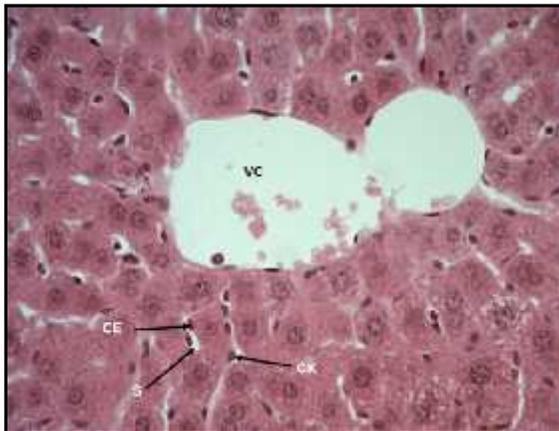


Figura 12. Histología control 40x



Figura 13. Histología caso 40x

#### 4.2.- EFECTO DE LA PATOLOGÍA EHGNA SOBRE LAS VARIABLES DEPENDIENTES

Se observa que tanto para la actividad 6 desaturasa como para la actividad 5 desaturasa, existe incidencia de la EHGNA, siendo la actividad de ambas enzimas menor en grupo caso ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2. Diferencias de medianas en actividades 6 y 5 desaturasas para casos y controles (n=16).** \* Test U- Mann-Whitney

<i>Característica</i>	<i>Casos (n=8)</i>	<i>Controles (n=8)</i>	<i>Valor de p*</i>
<i>Actividad desaturasa</i>			
6 (nmol/min/mg de prot.)	<b>0,09</b> <b>(0,06 – 0,11)</b>	<b>0,14</b> <b>(0,13 – 0,14)</b>	<b>&lt; 0,05</b>
5 (nmol/min/mg de prot.)	<b>0,11</b> <b>(0,10 – 0,11)</b>	<b>0,14</b> <b>(0,13 – 0,16)</b>	<b>&lt; 0,05</b>

### 4.3.- ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VARIABLES

#### 4.3.1.- Correlaciones entre parámetros de EOX y actividades enzimáticas 6 y 5 desaturasas.

##### 4.3.1.1.- Estatus REDOX intracelular

##### 4.3.1.1.1.- Relación GSH/GSSG

La relación GSH/GSSG es la variable que mejor correlacionó con las actividades de ambas desaturasas ( $p < 0,05$ ), mostrando un Rho de Spearman de 0,81 para la 6 desaturasa y de 0,94 para la 5 desaturasa, (figuras 14 y 15).

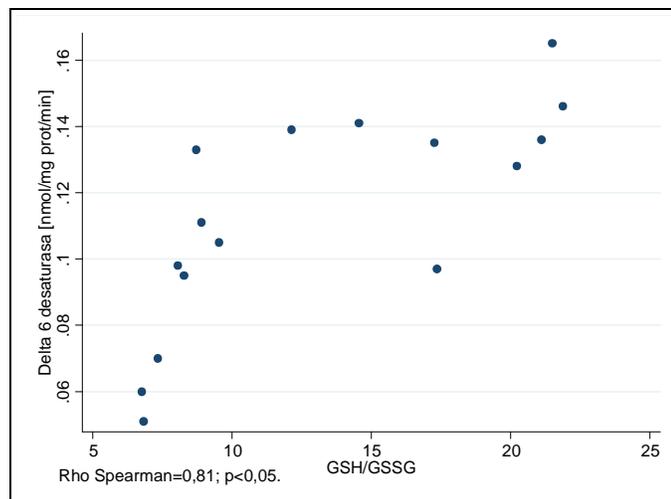


Figura 14. Correlación entre la relación GSH/GSSG y la actividad enzimática 6 desaturasa (n=16).

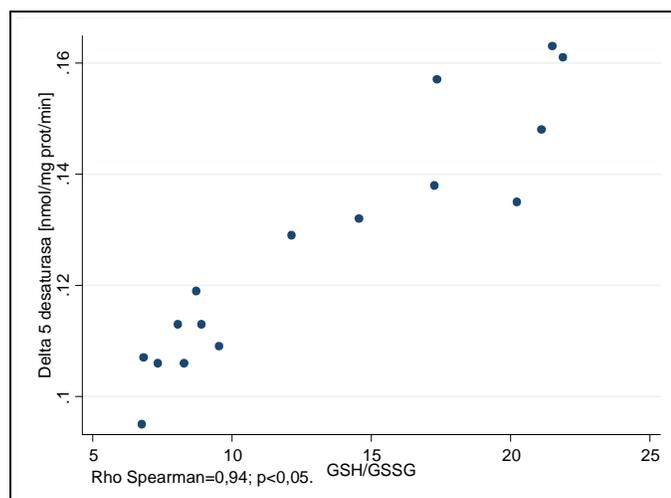
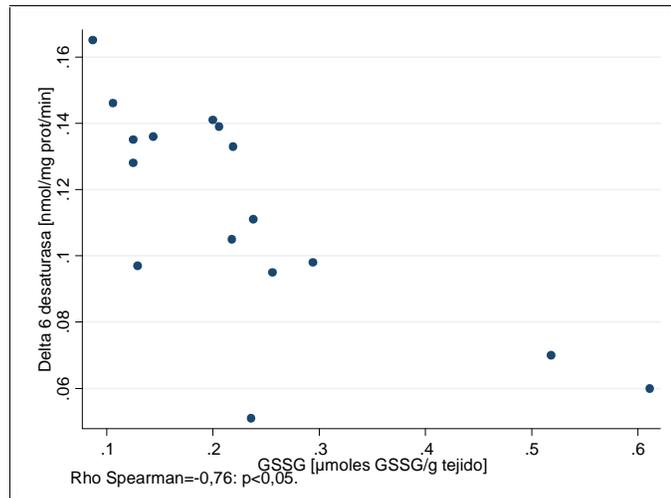


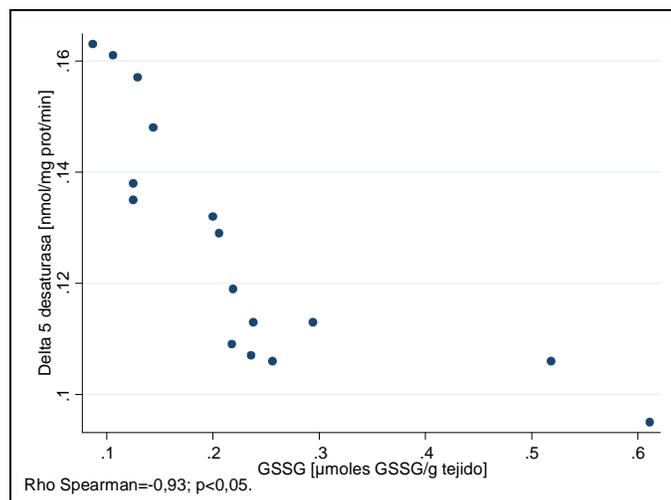
Figura 15. Correlación entre la relación GSH/GSSG y la actividad enzimática 5 desaturasa (n=16).

#### 4.3.1.1.2.- Niveles tisulares de GSSG

Los niveles tisulares de GSSG correlacionaron negativamente ( $p < 0,05$ ) con ambas enzimas, con un Rho de Spearman de  $-0,76$  para la  $\delta 6$  desaturasa y de  $-0,93$  para la  $\delta 5$  desaturasa (Figuras 16 y 17).



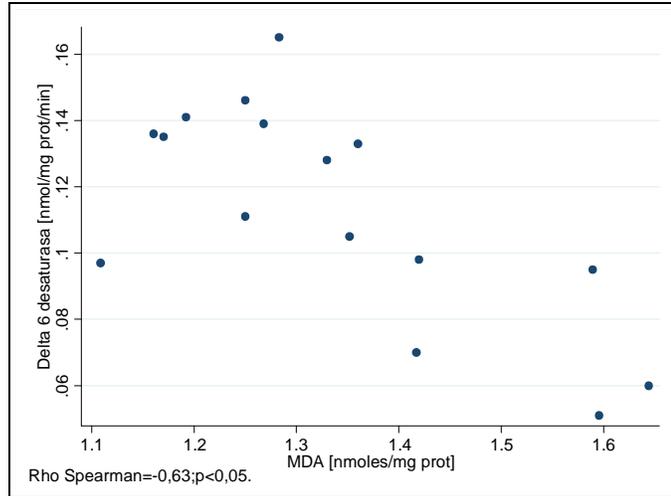
**Figura 16. Correlación entre los niveles tisulares de GSSG y la actividad enzimática  $\delta 6$  desaturasa (n=16).**



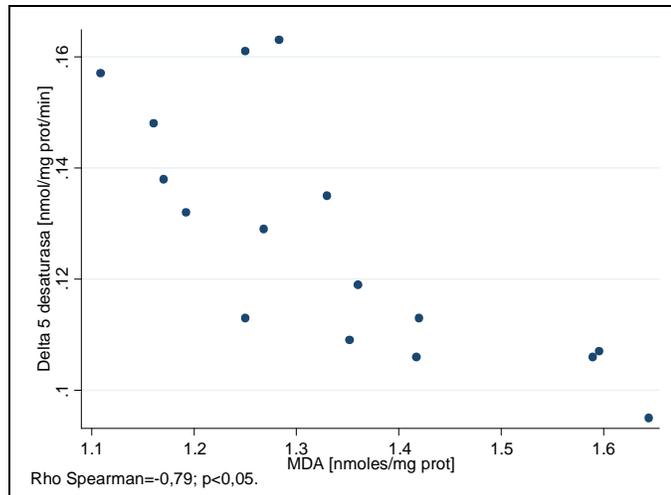
**Figura 17. Correlación entre los niveles tisulares de GSSG y la actividad enzimática  $\delta 5$  desaturasa (n=16).**

#### 4.3.1.2.- Lipoperoxidación

Los niveles tisulares de MDA correlacionaron negativamente ( $p < 0,05$ ) con ambas enzimas, con un Rho de Spearman de  $-0,63$  para la  $\Delta 6$  desaturasa y de  $-0,79$  para la  $\Delta 5$  desaturasa (Figuras 18 y 19).



**Figura 18.** Correlación entre los niveles tisulares de MDA y la actividad enzimática  $\Delta 6$  desaturasa (n=16).



**Figura 19.** Correlación entre los niveles tisulares de MDA y la actividad enzimática  $\Delta 5$  desaturasa (n=16).

### 4.3.1.3.- Evaluación de las defensas antioxidantes enzimáticas celulares

#### 4.3.1.3.1.- Actividad SOD

La actividad SOD correlacionó ( $p < 0,05$ ) con ambas enzimas, con Rho de Spearman de 0,63 para la  $\delta 6$  desaturasa y de 0,81 para la  $\delta 5$  desaturasa (figuras 20 y 21).

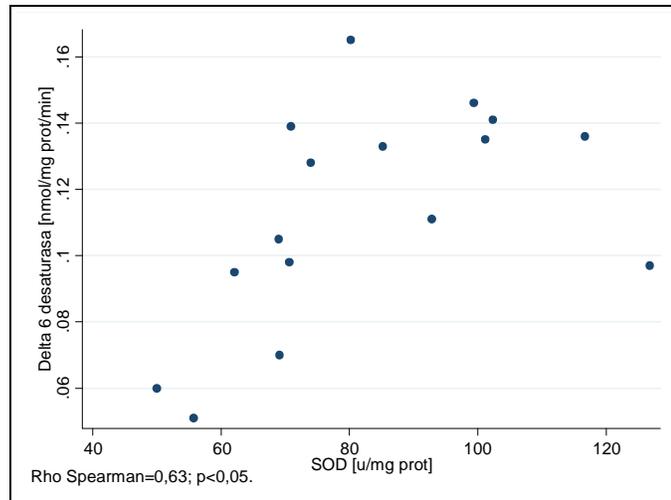


Figura 20. Correlación entre la actividad SOD y la actividad enzimática  $\delta 6$  desaturasa (n=16).

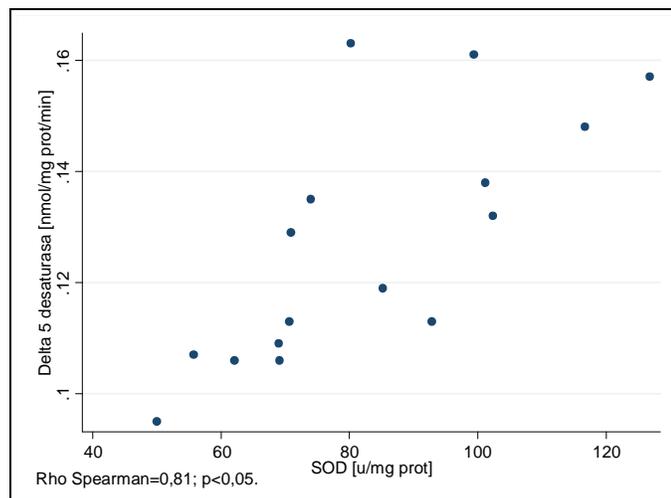


Figura 21. Correlación entre la actividad SOD y la actividad enzimática  $\delta 5$  desaturasa (n=16).

#### 4.3.1.3.2.- Actividad CAT

La actividad CAT, solo presentó correlación con la actividad 6 desaturasa ( $p < 0,05$ ), con un Rho de Spearman de 0,54 que estuvo muy cerca de no haber alcanzado la significancia estadística (figuras 22 y 23).

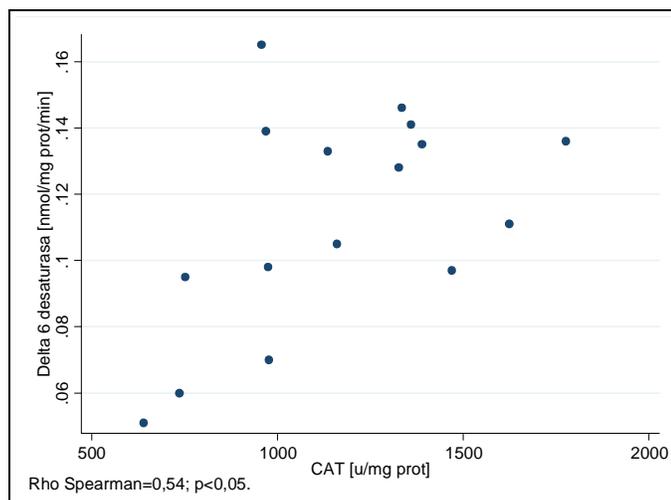


Figura 22. Correlación entre la actividad CAT y la actividad enzimática 6 desaturasa.

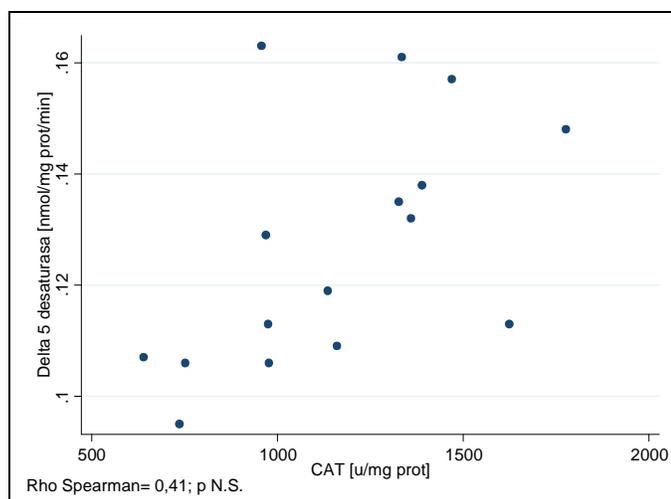


Figura 23. Correlación entre la actividad CAT y la actividad enzimática 5 desaturasa.

4.3.1.4.- Parámetros asociados a EOX que no correlacionaron con las actividades 6 y 5 desaturadas.

Los niveles tisulares de GSH y la actividad GSH-Px no correlacionaron con las actividades 6 y 5 desaturadas. (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros REDOX que no correlacionaron con las actividades 6 y 5 desaturadas (n=16). N.S. = no significativo

<i>Exposición a estrés oxidativo</i>	<b>6 desaturada</b> <i>Rho de Spearman</i> <i>Valor de p</i>	<b>5 desaturada</b> <i>Rho de Spearman</i> <i>Valor de p</i>
GSH	-0.0265 N.S.	-0.1002 N.S.
GSH-Px	-0.3147 N.S.	-0.1649 N.S.

#### 4.3.2.- Correlación entre Resistencia a la Insulina y actividades enzimáticas $\delta 6$ y $\delta 5$ desaturasas.

Los niveles de insulina plasmática en ayunas correlacionaron negativamente con las actividades enzimáticas  $\delta 6$  y  $\delta 5$  desaturasas ( $p < 0,05$ ) con un Rho de Spearman de  $-0,68$  para la  $\delta 6$  desaturasa y un Rho de Spearman de  $-0,85$  para la  $\delta 5$  desaturasa (Figuras 24 y 25).

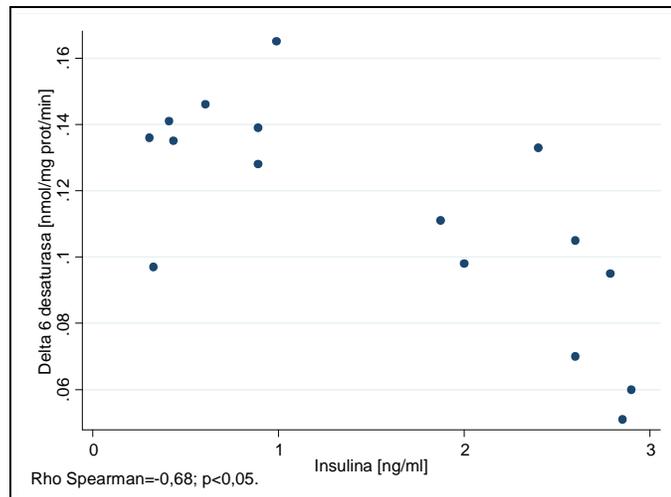


Figura 24. Correlación entre Resistencia a la insulina y la actividad enzimática  $\delta 6$  desaturasa (n=16).

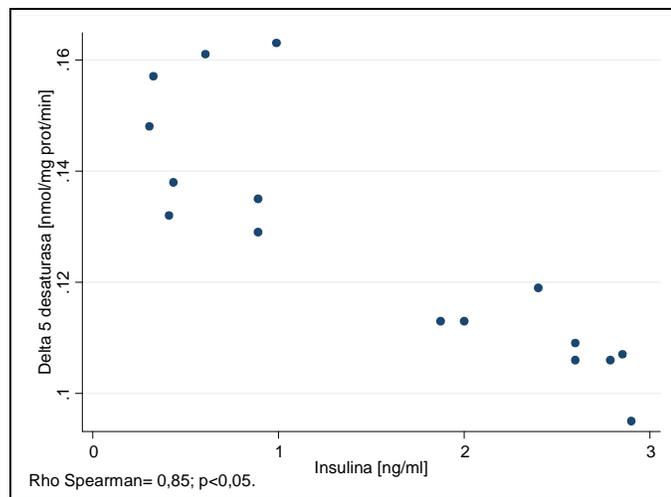


Figura 25. Correlación entre Resistencia a la insulina y la actividad enzimática  $\delta 5$  desaturasa (n=16).

### 4.3.3.- Expresión génica de la enzima $\Delta^6$ desaturasa.

Los niveles de expresión génica de la enzima  $\Delta^6$  desaturasa (*Fads 2*), determinados de manera cualitativa por PCR convencional, pueden apreciarse claramente mayores en los casos que en los controles, al ser comparados con los niveles del RNAm de la proteína ribosomal S18, de expresión constitutiva, utilizada como gen normalizador (Figura 26). La comparación de las densidades ópticas del gel revela que la expresión de la enzima  $\Delta^6$  desaturasa está aproximadamente 2,5 veces aumentada en el grupo caso (Figura 27).

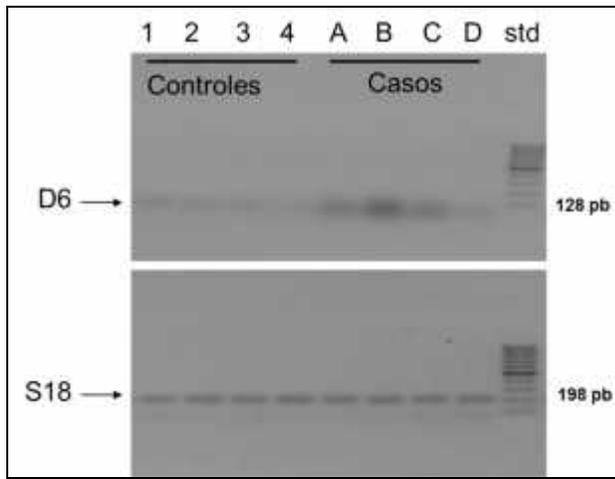


Figura 26. Comparación entre los niveles de expresión génica de la enzima  $\Delta^6$  desaturasa (transcrito primario de *Fads 2*) entre casos y controles (n=8; 4 casos y 4 controles).

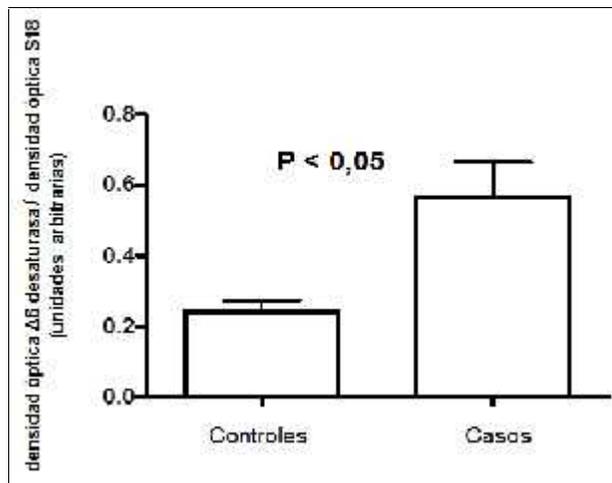


Figura 27. Análisis densitométrico de la comparación entre los niveles de expresión génica de la enzima desaturasa  $\Delta^6$  (n=8; 4 casos y 4 controles). \*Prueba t de Student.

## DISCUSIÓN

### 5.1.- HALLAZGOS

El resultado más importante de esta tesis fue la demostración de que las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas hepáticas son afectadas por EOX en presencia de EHGNA asociada a obesidad y resistencia a la insulina.

Paralelamente, se logró profundizar la información existente sobre los mecanismos patológicos capaces de modular la biosíntesis AGPCL en la EHGNA, otorgando una respuesta a las interrogantes dejadas por los modelos moleculares basados en la regulación transcripcional de las enzimas  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Dichos modelos no podían explicar una pérdida en las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, cuando la síntesis de ambas enzimas estaba aumentada, porque no consideraron la existencia variables que afectaran la funcionalidad de estos catalizadores, en este caso el EOX, más allá de la regulación de su expresión génica.

### 5.2.- DISCUSIÓN DE LA EVIDENCIA Y ASOCIACIÓN CAUSAL

#### 5.2.1.- AGPCL y EHGNA

En mamíferos omnívoros, como los seres humanos, sometidos a una dieta escasa en AGPCL preformados, una óptima biosíntesis de estos compuestos a partir de sus precursores esenciales resulta absolutamente necesaria para cubrir los requerimientos mínimos de AGPCL. Aquello porque al empezar a adaptarse los prehomínidos a la ingestión de nutrientes de origen animal (mayoritariamente tejido nervioso y especies marinas ricas en AGPCL n-3), habría comenzado a disminuir evolutivamente la eficiencia de biosíntesis de estos lípidos (Campillo, 2004).

La dieta occidental promedio, al ser en su mayoría un ejemplo de alimentación con bajos niveles de AGPCL, especialmente los n-3, obliga a una ruta biosintética ineficiente a funcionar a máxima capacidad para mantener los requerimientos mínimos. Por tanto, cualquier condición que inhiba esta vía metabólica puede derivar en deficiencias subclínicas de AGPCL, principalmente EPA y DHA (Cunnane, 2003; Gormaz *et al* 2010; Molendi-Coste *et al*, 2011)

Desde hace varios años que existe evidencia de que la EHGNA genera una reducción en la biodisponibilidad de AGPCL de las familias n-3 y n-6 en pacientes humanos, demostrándose que dicha disminución no se debía a deficiencias de precursores esenciales (Araya *et al*, 2004). Estos resultados concordaban con evidencia proveniente de investigaciones realizadas en otras patologías, donde se había reportado que la presencia de dichos cuadros también estaba asociada a una disminución en los niveles de AGPCL (Glen *et al* 1987). Dado que la presencia de EOX es un marcador

común de la mayoría de las patologías hepáticas, se postuló que una degradación aumentada podía estar dando cuenta de la pérdida de biodisponibilidad de AGPCL. Sin embargo, a diferencia de otras alteraciones hepáticas, la EHGNA tiene como marcador principal un incremento patológico de la biosíntesis de ácidos grasos, que proviene de una inducción anormal de toda la maquinaria metabólica vinculada a la lipogénesis, incluidas las rutas de los AGPCL n-3 y n-6 (Musso *et al*, 2009, Gormaz *et al*, 2010). Por lo tanto, se generaba la interrogante, de porque en la EHGNA una inducción exacerbada de la lipogénesis provocaba un aumento del nivel de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, pero no de AGPCL.

La incapacidad de lipogénesis hepática inducida por obesidad y RI para mantener la biodisponibilidad de AGPCL fue analizada en numerosas investigaciones (Montanaro *et al*, 2005; Dreesen *et al* 2006; Wang *et al* 2006; Montanaro *et al*, 2007). Se buscó encontrar un mecanismo que explicara donde se alteraba la regulación fisiológica de la biosíntesis de AGPCL, que se sabía ocurría a nivel de expresión génica de la enzima marcadas de la vía, la  $\Delta^6$  desaturasa (Rimoldi *et al*, 2001). Aquellas investigaciones confirmaron desde el punto de vista molecular las observaciones clínicas, demostrando una fuerte inducción de la vía de biosíntesis de AGPCL, que perdía correlación con la actividad de  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas.

En la actualidad, existe evidencia de que en la EHGNA hay inhibición de la actividad de las enzimas  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas, en pacientes humanos (Araya *et al*, 2010), aun cuando su inducción génica está aumentada (Pettinelli *et al*, 2009). También hay evidencia de que la EHGNA, aún en su fase de esteatosis, puede estar asociada a cuadros de EOX (Videla *et al* 2004 a; Videla *et al* 2004 b). Paralelamente, se ha demostrado que la disminución de la actividad  $\Delta^6$  desaturasa en la EHGNA se correlaciona con una pérdida de la capacidad antioxidante del plasma (Araya *et al*, 2010). Estos resultados dejaban a una inhibición de la actividad catalítica o bien a una regulación post-transcripcional de las enzimas  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas, como responsables mayoritarios de la pérdida de correlación entre los niveles de expresión génica de ambas enzimas y su actividad enzimática.

En relación a una regulación post-transcripcional de las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas, hasta el momento, solo se ha planteado un mecanismo de este tipo para la  $\Delta^5$  desaturasa, basado en RNAm antisentido (Dreesen *et al*, 2006). Esta regulación estaría involucrada en la retro-inhibición que los AGPCL preformados ejercen sobre la  $\Delta^5$  desaturasa, sin manifestar efectos concluyentes frente a otros estímulos, como por ejemplo, la respuesta post-prandial (Dreesen *et al*, 2006). Dado que la EHGNA se caracteriza por una muy marcada disminución de AGPCL preformados a nivel hepático, este tipo de regulación puede ser descartada en la pérdida de la actividad de la  $\Delta^5$  desaturasa asociada a la enfermedad. La aparente inexistencia de este tipo de mecanismo para la  $\Delta^6$  desaturasa y su inoperancia para la  $\Delta^5$  desaturasa bajo condiciones distintas a la retro-inhibición por AGPCL, permite descartar, en base a la evidencia actual, la participación mRNA antisentido sobre la regulación de ambas enzimas en EHGNA. Por lo tanto, los resultados de esta tesis confirman evidencia publicada con anterioridad, que

sugería que la inhibición de la actividad catalítica de la enzima es la principal causa de alteración de la funcionalidad de las desaturasas en la EHGNA. Sin embargo, dado que ni en este trabajo, ni en otras investigaciones, se ha evaluado expresión proteica de las desaturasas más allá de su transcripción, no puede descartarse por completo que otro mecanismo, a nivel post-transcripcional, también esté interfiriendo.

Las menores actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas que presentaron las ratas Wistar control del presente estudio, en relación a las ratas Sprague Dawley utilizadas para estandarizar la metodología de desaturación, puede ser explicada en función de la dieta.

Para las ratas Wistar normopeso del grupo control, se privilegió una alimentación que emulara la dieta presente en la población humana. Contrariamente, para los animales Sprague Dawley de estandarización de la metodología de desaturación, se utilizó un régimen de alimentación que no consideró ningún criterio epidemiológico. Solo se basó en parámetros descritos en la literatura como inductores de actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas (Gormaz *et al*, 2010). La principal diferencia a nivel de composición de macronutrientes entre ambas dietas fue a nivel de la relación entre precursores esenciales de las familias n-3 y n-6. Para la dieta de las ratas Wistar del grupo control la relación n-6/n-3 fue de alrededor de 20 a 1 mientras que para la dieta de las ratas Sprague Dawley de estandarización de actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, fue de 3 a 2. Esta diferencia, podría explicar la menor actividad  $\Delta 6$  desaturasa para las ratas control, dado que el precursor n-6 ácido linoleico, muy elevado en los microsomas de dichos roedores, podía estar compitiendo por la enzima con el sustrato n-3, ácido  $\omega$ -linolénico, aportado para la reacción de desaturación  $\Delta 6$ .

Otra explicación que podría justificar las diferencias en las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas entre ambos modelos, es la variabilidad existente entre distintas especies de ratas. Sin embargo, para el presente estudio, aquello no sería la variable de mayor incidencia dado que de acuerdo a la literatura, al menos para la actividad  $\Delta 6$  desaturasa, la especie Wistar tendría una mayor actividad enzimática que la especie Sprague Dawley (Brown, 2005), comportamiento opuesto a lo apreciado en esta tesis.

### **5.2.2.- Actividades $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas y EOX**

De acuerdo a evidencia recientemente publicada, donde se demostró correlación positiva entre la actividad  $\Delta 6$  desaturasa y la capacidad antioxidante del plasma en pacientes con EHGNA (Araya *et al*, 2010), resultaba muy probable que fuese algún fenómeno relacionado con EOX el que estuviese afectando las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas a nivel hepático. Esta propuesta, también se apoyó en el hecho de que tanto el EOX como la pérdida de biodisponibilidad de los AGPCL corresponden a fenómenos tempranos de la enfermedad, apreciables en pacientes con esteatosis simple, antes del desarrollo de esteatohepatitis (Videla *et al*, 2004 a).

Los elevados niveles de correlación entre parámetros asociados al status REDOX intracelular y la actividad de ambas desaturasas corroboran la hipótesis, al demostrar que un aumento en la oxidación subcelular se correlaciona negativamente con las actividades 6 y 5 desaturasas. Aquella observación concuerda con datos de otro estudio, que al evaluar la actividad 6 desaturasa en pacientes con distintos tipos de cirrosis, encontró que en todas las variantes de dicha enfermedad había una importante inhibición de esta enzima (Biagi *et al*, 1990).

En este estudio, pudo apreciarse que las actividades 6 y 5 desaturasas se correlacionaron muy bien con algunos marcadores tempranos de EOx, como la disminución en la relación GSH/GSSG y la concentración de GSSG, relativamente bien con marcadores intermedios, como los niveles tisulares de MDA y la pérdida de actividad SOD y no se correlacionaron con marcadores más tardíos de EOx, como la reducción de las actividades CAT (solo hubo una correlación débil para la 5 desaturasa) y GSH-Px. Este comportamiento se debería a que el modelo de estudio utilizado como inductor de EHGNA llegó a un nivel de esteatosis patológica que no evolucionó a esteatohepatitis, no alcanzándose niveles oxidación capaces de afectar marcadores tardíos de EOx. La ausencia de diferencias en marcadores tardíos de EOx entre casos y controles, implica que las diferencias observadas a nivel de las actividades enzimáticas 6 y 5 desaturasas entre ambos grupos no están siendo explicadas por dichos marcadores.

La respuesta secuencial de distintos marcadores de EOx ha sido descrita para la EHGNA en pacientes humanos. Se ha observado que marcadores asociados a los niveles de glutatión, MDA y la actividad SOD son muy sensibles al grado de progresión de la enfermedad (Araya *et al*, 2004, Videla *et al*, 2004 a, Videla *et al*, 2004 b). Contrariamente, los mismos estudios reportaron pérdida de actividad catalasa solo para pacientes con esteatohepatitis y no para aquellos con esteatosis, mientras que para la GSH-Px, no se encontraron variaciones entre individuos sanos y pacientes con EHGNA, presentando solo una tendencia a la baja en la esteatohepatitis, que no alcanzó la significancia estadística.

A pesar de la similitud en la respuesta secuencial de distintos marcadores de EOx al grado de progresión de la EHGNA entre pacientes humanos y los roedores de la presente investigación, existieron diferencias.

En los pacientes con esteatosis del estudio de Videla y colaboradores (2004 a) los niveles tisulares de GSH fueron inferiores en relación al grupo control, lo que no ocurrió en esta tesis. Contrariamente, las ratas del presente estudio no mostraron diferencias significativas para este parámetro entre ambos grupos e incluso presentaron una tendencia a tener mayores niveles de GSH que los animales control, comportamiento que probablemente podría haber mostrado significancia estadística incrementando el tamaño muestral. Este distinto comportamiento explica, a lo menos en parte, la mejor capacidad de las ratas en relación a nuestra especie, para compensar

agresiones metabólicas inductoras de EOX y el subsecuente efecto de esta última condición sobre las actividades  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas.

El origen de la diferencia en los niveles de GSH entre ratas y humanos radicaría en una mayor capacidad de estos animales para aumentar la síntesis *de novo* de GSH en respuesta a una depleción, respuesta sugerida como una adaptación fisiológica temprana de la célula al EOX (Hardwick *et al*, 2010). Este tipo de adaptación se propuso en base a la observación de que la velocidad de síntesis *de novo* de GSH puede exceder a la de su recuperación intracelular (Richman & Meister, 1974). El aumento en la síntesis *de novo* de GSH depende de la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa, cuya expresión génica se ha visto incrementada hasta 50 veces en respuesta a citotóxicos en distintas líneas celulares (Galloway *et al*, 1997). Sin embargo, a pesar de la existencia de este aumento en la síntesis *de novo* de GSH como respuesta compensatoria a EOX, los resultados de esta tesis demuestran que en el modelo estudiado, el incremento en la síntesis de este compuesto no alcanza a compensar su tasa de oxidación. Aquel comportamiento queda de manifiesto en el elevado aumento de los niveles hepáticos de GSSG en las ratas caso, parámetro que determinó la muy significativa disminución de la relación GSH/GSSG en dicho grupo, que es la condición que finalmente determina el estatus REDOX la célula.

La imposibilidad de la síntesis *de novo* de GSH para compensar alteraciones de su recuperación a partir de GSSG, tiene como fundamento el hecho de que la lipoperoxidación presenta una cinética autocatalizada que luego de cierto período se acelera exponencialmente (Brimberg, 1993), dificultando cualquier tipo de compensación biológica.

Otra divergencia de esta tesis con estudios en humanos fue que a pesar de que la diferencia de medianas entre los niveles de MDA hepáticos para los grupos caso y control resultó significativa, la magnitud de esta diferencia fue bastante menor a la apreciada en los estudios en humanos anteriormente mencionados. Esta diferencia es muy probablemente una consecuencia de una mayor capacidad de los roedores, en relación al humano, para compensar la pérdida de GSH intracelular.

La mejor linealidad y significancia estadística de la correlación de las actividades  $\delta$  y  $\epsilon$  desaturasas con marcadores tempranos en relación a marcadores intermedios, puede dar indicios sobre el mecanismo mediante el cual el EOX esté afectando a las enzimas.

La elevada sensibilidad mostrada por la actividad ambas enzimas a la relación GSH/GSSG, uno de los marcadores tempranos más sensibles (y reflejo de la principal defensa antioxidante no enzimática del hepatocito), por sobre la correlación al MDA, un subproducto del daño oxidativo a membranas, sugiere que el perjuicio oxidativo a las actividades enzimáticas es anterior a la lipoperoxidación.

Esta sensibilidad al estatus REDOX de las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas podría explicarse en el hecho de que una baja en la relación GSH/GSSG, favorece la actividad enzimática GSH-reductasa a expensas de consumir NADPH, uno de los equivalentes reductores fundamentales para completar el ciclo de las desaturasas. La inhibición ocurriría porque la  $V_{max}$  de la GSH-reductasa se mueve en rangos de  $\mu$ moles/min (Prado *et al*, 2004) mientras que la  $V_{max}$  de desaturación de ácidos grasos bordea rangos de nmoles/min (Ivanetich *et al*, 1996). Sin embargo, dado que en esta tesis las actividades  $\Delta^6$  y  $\Delta^5$  desaturasas se determinaron in-vitro, con un gran exceso de NADPH en el medio de reacción, este mecanismo puede ser descartado. Otros mecanismos mediante los cuales una disminución del estatus REDOX pudiese afectar las actividades desaturasas estudiadas, independiente del NADPH, son una alteración irreversible de todas o parte del pool de proteínas con actividad  $\Delta^5$  o  $\Delta^6$  desaturasas disponibles o bien, la alteración oxidativa de alguno de los intermediarios de la cadena transportadora de electrones asociada.

La elevada y consistente disminución de la actividad de ambas desaturasas apreciada a partir de niveles de MDA superiores a 1,3 nmoles/mg de proteína, sugiere la existencia de un punto de corte en el cual el grado de lipoperoxidación comienza a afectar la funcionalidad de ambas enzimas, de manera más tardía al efecto del status REDOX. Una explicación a la existencia de este punto de corte puede estar en el desarrollo evolutivo de dichas enzimas. Aquello porque el hígado es un órgano que se ha tenido que ir adaptando a la agresión oxidativa, producto de que muchos de sus roles fisiológicos están vinculados a reacciones bioquímicas capaces de generar EOX, como por ejemplo el metabolismo de xenobióticos (Letelier *et al*, 2011). Este tipo de adaptación debió haber favorecido que las desaturasas hepáticas se adecuaron a funcionar bajo un amplio rango de niveles de lipoperoxidación, disminuyendo drásticamente su actividad solo cuando se alcanzaran niveles patológicos de desestructuración oxidativa de membranas celulares, marcados por el punto de corte.

A pesar de que los resultados de esta tesis concuerdan con la evidencia publicada con anterioridad, en relación a vincular a un EOX incipiente como marcador temprano de EHGNA, no aporta información sobre el origen del EOX en la esteatosis simple. Esta interrogante, aún no dilucidada en su totalidad, podría derivarse de una acumulación excesiva de AGL saturados, compuestos sindicados como mediadores mayores del EOX por lipotoxicidad en la EHGNA (Gormaz & Rodrigo, 2009). La acumulación de estos lípidos como marcadores tempranos de la enfermedad, concuerda con la teoría planteada por Trauner y colaboradores (2010), quienes señalaron que una de las características determinantes de aquellos individuos denominados “buenos almacenadores de grasa” a nivel hepático (Arrese, 2009) es una elevada expresión de la enzima  $\Delta^9$  desaturasa. Este catalizador transforma los AGL saturados en AGL monoinsaturados, sustancialmente menos lipotóxicos, dado que son más eficientemente esterificados a triacilgliceroles por la célula hepática. Los triacilgliceroles, al ser la forma natural de acumulación de reserva energética grasa en el hígado, son menos activos metabólicamente que los AGL, resultando sustancialmente menos dañinos que estos últimos (Gormaz *et al* 2010; Trauner *et al* 2010).

Al margen de la capacidad de los AGL saturados para inducir EOx a nivel hepático, estos mediadores también podrían inhibir directamente las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Un aumento patológico de AGL saturados genera una desestructuración mayor de la membrana de retículo endoplasmático, producto de una acumulación de sales calcio (Gormaz & Rodrigo, 2009). Sin embargo, una desorganización masiva del retículo endoplasmático, derivada de un exceso de AGL, puede considerarse una consecuencia tardía de lipotoxicidad, que muy probablemente tenga a la célula al borde de la muerte celular. Aquello se contrapone con los resultados obtenidos en este estudio, que indicarían que la pérdida de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas son un fenómeno relativamente precoz en la escala temporal de progresión de la enfermedad. Por tanto, si la lipotoxicidad por AGL afecta las actividades de las  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, es mayoritariamente a través de su capacidad para inducir EOx, más que por el efecto directo de estos lípidos sobre la integridad de las membranas celulares.

### **5.2.3.- Actividades $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas y RI**

La asociación negativa, entre los niveles de insulina plasmática en ayunas y las actividades de ambas desaturasas, en conjunto con la mayor expresión génica de la enzima  $\Delta 6$  desaturasa (*fads 2*) en aquellas ratas con EHGNA, concuerdan con la evidencia directa e indirecta que dio origen a este estudio (Wang *et al*, 2006; Araya *et al*, 2010), en relación a la pérdida de la regulación molecular que la hormona ejerce sobre la funcionalidad de estas enzimas en estado fisiológico.

La incapacidad de la insulina para aumentar las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas en la EHGNA indican que por sobre la inducción génica insulino dependiente de ambas enzimas, está primando un mecanismo patológico asociado a un exceso de esta enzima. El mecanismo estaría relacionado con la capacidad de la hiperinsulinemia para fomentar EOx hepático, mediante distintos mecanismos, incluido inducción de lipotoxicidad (Gormaz & Rodrigo, 2009). Paralelamente, la lipotoxicidad insulino dependiente también podría tener una componente extrahepática, determinada por la capacidad de la hiperinsulinemia para fomentar una lipólisis adiposa capaz de generar un aumento del nivel de ácidos grasos libres en el plasma, intermediarios que terminan mayoritariamente siendo captados por el hígado (Saito *et al*, 2007).

### **5.3.- APORTES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

El principal aporte de esta tesis se enmarca en que es el primer trabajo en dar una respuesta plausible a un mecanismo patológico que no estaba completamente dilucidado, esto es el mecanismo por el cual las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas se afectan en presencia de EHGNA. Este aporte debe ser apreciado desde la perspectiva de la ciencia básica, partiendo de la base de una sólida validez interna del estudio, derivada de un diseño metodológico orientado a la obtención del más elevado control de las variables posibles.

Otro aporte de esta investigación es que determina un mecanismo principal mediante el cual se puede generar una deficiencia de AGPCL, entregando información que puede ser considerada para el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a prevenir y mitigar dicha alteración.

La principal limitación epidemiológica de este estudio es su escasa representatividad a nivel poblacional. El elevado control de las variables le resta validez externa al estudio ya que se basó en un tamaño muestral muy pequeño (16 ratas) y se utilizaron grupos artificialmente homogéneos, primero por la escasa variabilidad genética del modelo y más aún, por la exclusión en base estadística de aquellos animales que aumentaban la dispersión. Esta limitación obliga a tener mucho resguardo en la posible aplicabilidad clínica del estudio.

La principal limitación biológica de este estudio correspondió a la utilización de un modelo animal que presenta una mayor capacidad de afrontar desafíos hepáticos de origen nutricional que el humano (Zou *et al*, 2006) lo que minimiza los efectos de una inadecuación dietética sobre las actividades 6 y 5 desaturasas hepáticas comparativamente a nuestra especie. La inhibición de las actividades 6 y 5 desaturasas hepáticas asociada a un estadio similar de la patología fue comparativamente inferior en la ratas de esta tesis que la reportada en pacientes humanos (Araya *et al*, 2010). No considerar esta limitación podría inducir a pensar que a nivel clínico, grados similares de EHGNA inducirían niveles similares de alteración de la biosíntesis de AGPCL en ratas y humanos, lo que no se ajusta a la evidencia clínica existente hasta la fecha.

## CONCLUSIONES

En función de los resultados de este estudio y tomando en consideración la información publicada previamente, se puede concluir lo siguiente:

- 1) El EOX es el mecanismo principal mediante el cual la EHGNA genera una disminución de las actividades  $\omega$  6 y  $\omega$  5 desaturadas hepáticas.
- 2) Disminuciones sub-clínicas del potencial REDOX intracelular a nivel hepático están asociadas a una reducción de las actividades  $\omega$  6 y  $\omega$  5 desaturadas.
- 3) La presencia de lipoperoxidación en el hígado se asocia a una reducción de las actividades  $\omega$  6 y  $\omega$  5 desaturadas en el hepatocito.
- 4) La pérdida de defensas antioxidantes enzimáticas celulares del tejido hepático, derivada de una reducida actividad SOD, está asociada con una disminución en las actividades  $\omega$  6 y  $\omega$  5 desaturadas.
- 5) La presencia de obesidad y RI están asociadas a una disminución de las actividades  $\omega$  6 y  $\omega$  5 desaturadas hepáticas en presencia de EHGNA.

## PROYECCIONES Y DESAFÍOS

En la actualidad, es poco lo que se conoce sobre el comportamiento de la biosíntesis de AGPCL bajo condiciones patológicas asociadas a enfermedades crónicas no transmisibles derivadas de una nutrición poblacional post-transición epidemiológica, incluido EHGNA. Aquello, a pesar de la información aportada en esta tesis y de la amplia evidencia que indicaría la existencia de importantes desbalances nutricionales de estos lípidos en una amplia gama de enfermedades crónicas no transmisibles, de elevada prevalencia en la población general. Paralelamente, la cada vez mayor evidencia sobre los efectos benéficos de una adecuada biodisponibilidad de AGPCL, sobretodo n-3, en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, especialmente cardiovasculares, sumado al bajo aporte dietético de estos mediadores preformados en la poblaciones occidentales, vuelven sumamente relevante el estudio de esta ruta metabólica bajo EHGNA.

La información sobre la regulación de la biosíntesis de AGPCL bajo alteraciones patológicas del metabolismo hepático, deriva de estudios moleculares en modelo murino que en general han sido poco concluyentes, y de una única línea de investigación en humanos, realizada en Chile con pacientes obesos con EHGNA. Dichos estudios, si bien han demostrado una asociación causal entre la enfermedad y la pérdida de actividad de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, no han entregado información sobre los mecanismos que dan cuenta de dicha asociación. El logro de los objetivos de la presente tesis ha aportado nuevo conocimiento sobre las bases moleculares de estos mecanismos que pueden, por un lado dar pie a nuevas investigaciones y por otro, favorecer el desarrollo de estrategias terapéuticas.

El principal desafío desde el punto de vista de la investigación básica estará vinculado a determinar cuáles son los mecanismos moleculares específicos a través de los cuales el EOX en sus distintos niveles, afecta la funcionalidad de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. En segunda instancia, se crea la necesidad de determinar si efectivamente ambas desaturasas son afectadas de la misma manera por EOX, o existen diferencias a nivel de magnitud o mecanismo de influencia. Por otra parte, se abre una nueva interrogante asociada a los posibles efectos que la EHGNA pudiese ejercer sobre las actividades desaturasas de manera independiente al EOX. Finalmente, también resultaría relevante conocer el grado de influencia o interacción de las patologías asociadas, obesidad y RI, con el efecto de la EHGNA sobre las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas.

Desde el punto de vista clínico, el desafío está en el desarrollo de estrategias orientadas a la prevención del daño hepático al que están expuestos pacientes con la enfermedad. El objetivo es favorecer la no progresión y ojalá regresión de la enfermedad mediante manejo farmacológico y/o no farmacológico, como por ejemplo nutricional, considerando además fomentar una óptima biosíntesis de AGPCL a partir de sus precursores.

Dentro de los blancos terapéuticos a explorar, derivados de esta investigación, estaría principalmente la relación GSH/GSSG, la que, según los resultados de esta tesis, debe mantenerse bajo rangos fisiológicos óptimos para permitir una adecuada desaturación. Por tanto, como recomendación preliminar estaría una dieta que fomentara la biosíntesis de GSH y con un potencial antioxidante que a su vez ayudara a mantener un óptimo status REDOX intracelular del tejido hepático.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.
- Amin K.A., Nagy M.A. 2009. Effect of Carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* **16**, 1-17.
- Anderson N. & Borlak J. 2008. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacological Reviews* **60**, 311-357.
- Angulo P. 2002. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of hepatology* **1**, 12-9.
- Abrams G.A., Kunde S.S., Lazenby A.J., Clements R.H. 2004. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **40**, 475-483.
- Angulo P. 2007. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutritional Reviews* **65S**, 57-63.
- Aragno M., Tomasinelli C.E., Vercellinato I., Catalano M.G., Collino M., Fantozzi R., Danni O, Boccuzzi G. 2009. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radicals in Biology and Medicine* **47**,1067-1074.
- Araya J., Rodrigo R., Videla L.A., Thielemann L., Orellana M., Pettinelli P., Poniachik J. 2004. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Science (London)* **106**, 635-643.
- Araya J., Rodrigo R., Pettinelli P., Araya A.V., Poniachik J., Videla L.A. 2010. Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients. *Obesity (Silver Spring)* **18**,460-1463.
- Arrese M. 2009. Burning hepatic fat: therapeutic potential for liver-specific thymomimetics in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **49**, 348-351.
- Babior B.M. 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* **16**, 42-47.
- Biagi P.L., Hrelia S., Stefanini G.F., Zunarelli P., Bordoni A. 1990. Delta-6-desaturase activity of human liver microsomes from patients with different types of liver injury. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **39**, 39-42.
- Blas N., Ortega C., Frankena K., Noordhuizen J. 1998. Software Win Episcope 2.0. Veterinary Faculty, Zaragoza and Agricultural University, Wageningen.

- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.
- Brimberg U.L. 1993. On the kinetics of the autoxidation of fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**, 249-254.
- Brenner R.R. 2003. Hormonal modulation of  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **68**, 151-162.
- Brenner R.R., Rimoldi O.J., Lombardo Y.B. 2003. Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids* **38**, 733-742.
- Brown J.E. 2005. A critical review of methods used to estimate linoleic acid  $\Delta 6$ -desaturation ex vivo and in vivo. *European Journal of Lipid Science and Technology* **107**, 119-134.
- Browning J.D., Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* **40**, 1387-1395.
- Brunt E.M. 2004. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* **24**, 3-20.
- Buege J.A., Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**, 302-310.
- Calder P.C. 2006. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**, 1505S-1519S.
- Cho H.P., Nakamura M.T., Clarke S.D. 1999 a. Cloning, expression and nutritional regulation of mammalian  $\Delta 6$  desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 471-477.
- Cho H.P., Nakamura M.T., Clarke S.D. 1999 b. Cloning, expression and regulation of human  $\Delta 5$  desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37335-37339.
- Campillo J.E. 2004. Vagabundos y carroñeros. *In El mono obeso: la evolución humana y las enfermedades de la opulencia: diabetes, hipertensión, arteriosclerosis.* pp 125-126. Editorial Crítica, Barcelona.
- Clarke S.D. 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *Journal of Nutrition* **131**, 1129-1132.
- Cunnane S.C. 2003. Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? *Progress in Lipid Research* **42**, 544-568.

- Das UN. 2005. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **72**, 343-350.
- Deckelbaum R.J., Worgall T.S., Seo T. 2006. N-3 Fatty acids and gene expression. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**, 1520S-1525S.
- Delarue J., Couet C., Cohen R., Bréchet J.F., Antoine J.M., Lamisse F. 1996. Effects of fish oil on metabolic responses to oral fructose and glucose loads in healthy humans. *American Journal of Physiol* **270**, E353-E362.
- Delarue J., LeFoll C., Corporeau C., Lucas D. 2004. N-3 Long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity?. *Reproduction Nutrition Development* **44**, 289-299.
- Delerive P., Fruchart J.C., Staels B. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *Journal of Endocrinology* **169**,453-459.
- Dreesen T. D., Adamson, A. W., Tekle M., Tang C., Cho HP., Clarke SD., Gettys TW. 2006. A newly discovered member of the fatty acid desaturase gene family: a non-coding, antisense RNA gene to delta5-desaturase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **75**, 97-106.
- Enoch H.G., Catalá A., Strittmatter P. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *Journal of Biological Chemistry* **251**, 5095-5103.
- Etlik O., Tomur A. 2006. The oxidant effects of hyperbaric oxygenation and air pollution in erythrocyte membranes (hyperbaric oxygenation in air pollution). *European Journal of General Medicine*. **3**, 21-28.
- Ficková M., Hubert P., Klimes I., Staedel C., Cremel G., Bohov P., Macho L. 1994. Dietary fish oil and olive oil improve the liver insulin receptor tyrosine kinase activity in high sucrose fed rats. *Endocrine Regulations* **28**, 187-97.
- Finlay J.W., Dillard R.F. 2007. Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays. *AAPS Journal* **9**, E260-E267.
- Flohé L, Günzler W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **105**, 114-121.
- Folch J., Lee M. y Sloane Stanley G.H. 1957. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.
- Fox B.G., Lyle K.S., Rogge C.E. 2004. Reactions of the Diiron Enzyme Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase. *Accounts of Chemical Research* **37**,421-429.

- Galloway D.C., Blake D.G., Shepherd A.G., McLellan L.I. 1997. Regulation of human gamma-glutamylcysteine synthetase: co-ordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in HepG2 cells. *Biochemical Journal* **328**,99-104.
- Ganong, W. 2000. *Fisiología Médica*, pp 321-385. El manual moderno, Mexico D.F.
- García-Díaz D., Campión J., Milagro F.I., Martínez J.A. 2007. Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers. *Molecular and Cellular Biochemistry* **305**, 87-94.
- Glen I., Skinner F., Glen E., MacDonell L. 1987. The role of essential fatty acids in alcohol dependence and tissue damage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **11**, 37-41.
- Genova M.L., Bianchi C., Lenaz G. 2005. Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications. *Biofactors* **25**, 5-20.
- Gormaz J.G. y Rodrigo R. 2009. Nonalcoholic steatohepatitis. *In Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease*. Rodrigo R, editor. pp 223–256. Nova Science Publishers Inc, New York.
- Gormaz J.G., Rodrigo R., Videla L.A., Beems M. 2010. Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research* **49**, 407–419.
- Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A. 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research* **49**, 186-99.
- Hamilton J.A., Era S., Bhamidipati S.P., Reed R.G. 1991. Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 2051-4.
- Haque M., Sanyal A.J. 2002. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **16**, 709-731.
- Hardwick R.N., Fisher C.D., Canet M.J., Lake A.D., Cherrington NJ. 2010. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metabolism and Disposition* **38**, 2293-2301.
- Harnack K., Andersen G., Somoza V. 2009. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n-6/n-3 fatty acids. *Nutrition & Metabolism (Lond)* **19**, 6-8.
- Hissin P.J., Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* **74**, 214-226.

- Houstis N., Rosen E.D., Lander E.S. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**, 944-948.
- Ivanetich K.M., Bradshaw J.J., Ziman M.R. 1996. Delta 6-desaturase: improved methodology and analysis of the kinetics in a multi-enzyme system. *Biochimica et Biophysica Acta* **1292**, 120-132.
- Jacobi S.K., Lin X., Corl B.A., Hess H.A., Harrell R.J., Odle J. 2011. Dietary arachidonate differentially alters desaturase-elongase pathway flux and gene expression in liver and intestine of suckling pigs. *Journal of Nutrition* **141**, 548-553.
- Jaeschke H. 2000. Reactive oxygen and inflammatory liver injury. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15**, 718-24.
- Kleiner D.E, Brunt E.M, Van Natta M., Behling C., Contos M.J., Cummings O.W., Ferrell L.D., Liu Y.C., Torbenson M.S., Unalp-Arida A., Yeh M., McCullough A.J, Sanyal A.J. 2005. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313-1321
- Koteish A. & Diehl A.M. 2001. Animal models of steatosis. *Seminars in Liver Disease* **21**, 89-104.
- Lauritsen J.M., Bruus M., Myatt M.A. 2001. EpiData, version 2.1. An extended tool for validated entry and documentation of data. The EpiData Association, Odense, Denmark.
- Le Marchand-Brustel Y., Gual P., Grémeaux T., Gonzalez T., Barrès R., Tanti J.F. 2003. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signaling. *Biochemical Society Transactions* **31**, 1152-1156.
- Leclercq I.A. 2004. Antioxidant defence mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis? *Clinical Science (London)* **106**, 235-237.
- Letelier M.E., López-Valladares M., Peredo-Silva L., Rojas-Sepúlveda D., Aracena P. 2011. Microsomal oxidative damage promoted by acetaminophen metabolism. *Toxicology in Vitro* **25**, 1310-1313.
- Li H., Lelliott C., Håkansson P., Ploj K., Tuneld A., Verolin-Johansson M., Benthem L., Carlsson B., Storlien L., Michaëlsson E. 2008. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism* **57**, 1704-1710.
- Lillie, R.D. 1965. Staining Technics. *In* *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. pp 176. McGraw-Hill Book Co. New York.
- Lindström P. 2007. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *Scientific World Journal* **7**, 666-685.

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Lund E.K., Harvey L.J., Ladha S., Clark D.C., Johnson I.T. 1999. Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers. *Annals of Nutrition and Metabolism* **43**, 290-300.
- Mandon E.C., de Gómez Dumm I.N., de Alaníz M.J., Marra C.A., Brenner R.R. 1987. ACTH depresses delta 6 and delta 5 desaturation activity in rat adrenal gland and liver. *Journal of Lipids Research* **28**, 1377-1383.
- Mann H.B., Whitney D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* **18**, 50-60.
- Marchesini G., Brizi M., Bianchi G., Tomassetti S., Bugianesi E., Lenzi M., McCullough A.J., Natale S., Forlani G., Melchionda N. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* **50**, 1844-1850.
- Misra H.P., Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 3170-3175.
- Molendi-Coste O., Legry V., Leclercq I.A. 2011. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? *Gastroenterology Research and Practice* 2011, 364040.
- Montanaro M.A., Rimoldi O.J., Igal R.A. 2003. Hepatic delta9, delta6, and delta5 desaturations in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rats. *Lipids* **38**, 827-832.
- Montanaro, Bernasconi, Gonzalez. 2005. Effects of fenofibrate and insulin on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in streptozotocin diabetic rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **73**, 369-78.
- Musso G., Gambino R., Cassader M. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research* **48**, 1-26.
- Montanaro M.A., González M.S., Bernasconi A.M., Brenner R.R. 2007. Role of Liver X Receptor, Insulin and Peroxisome Proliferator Activated Receptor a on in Vivo Desaturase Modulation of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis. *Lipids* **3**, 197-210.
- Nakamura M.T., Nara T.Y. 2004. Structure, function, and dietary regulation of 6, 5, and 9 desaturases, *Annals of Nutrition and Metabolism* **24**, 345-376.
- Neuschwander-Tetri B.A., Caldwell S.H. 2003. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference, *Hepatology* **37**, 1202-1219.
- Pettinelli P., Del Pozo T., Araya J., Rodrigo R., Araya A.V., Smok G., Csendes A., Gutierrez L., Rojas J., Korn O., Maluenda F., Diaz J.C., Rencoret G., Braghetto I,

Castillo J., Poniachik J., Videla L.A. 2009. 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. *Biochimica et Biophysica Acta* **1792**, 1080-1086.

- Prado H., Diaz P., Ortiz J.L., Baeza A. 2004. Polarographic Determination of  $K_m$  and  $V_{max}$  of Glutathione Reductase. *Current Separations* **20**, 117-120.
- Reddy J.K. 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal  $\alpha$ -oxidation, PPAR- $\alpha$ , and steatohepatitis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **281**, G1333-G1339.
- Richman P.G., Meister A. 1974. Regulation of  $\alpha$ -Glutamyl-Cysteine Synthetase by Nonallosteric Feedback Inhibition by Glutathione. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1422-1426.
- Rimoldi O.J., Finarelli G.S., Brenner R.R. 2001. Effects of diabetes and insulin on hepatic  $\Delta^6$  desaturase gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 323-326.
- Risé P., Ghezzi S., Carissimi R., Mastromauro F., Petroni A., Galli C. 2007.  $\Delta^5$  desaturase mRNA levels are increased by simvastatin via SREBP-1 at early stages, not via PPAR- $\alpha$ , in THP-1 cells, *European Journal of Pharmacology* **571**, 97-105.
- Rothwell N.J., Stock M.J. 1979. Combined effects of cafeteria and tube-feeding on energy balance in the rat. *Proceedings of the Nutrition Society* **38**, 5A.
- Saito T., Misawa K., Kawata S. 2007. Fatty Liver and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Internal Medicine* **46**, 101-103.
- Sampey B.P., Vanhoose A.M., Winfield H.M., Freerman A.J., Muehlbauer M.J., Fueger P.T., Newgard C.B., Makowski L. 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* **19**, 1109-1117.
- Sastre J., Pallardó F.V., Llopis J., Furukawa T., Viña J.R., Viña J. 1989. Glutathione depletion by hyperphagia-induced obesity. *Life Science* **45**, 183-187.
- Sclafani A., Springer D. 1976. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology & Behavior* **17**, 461-71.
- Seki S., Kitada T., Yamada T., Sakaguchi H., Nakatani K., Wakasa K. 2002. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Journal of Hepatology* **37**, 56-62.
- Sevanian A., Hochstein P. 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual Review of Nutrition* **5**, 365-390.

- Shapiro S.S., Wilk M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**: 591-611.
- Singer P., Richter-Heinrich E. 1991. Stress and fatty liver--possible indications for dietary long-chain n-3 fatty acids. *Medical Hypotheses* **36**, 90-94.
- Smith, A.H., Bing F. 1928 Improved rate of growth of stock albino rats. *Journal Nutrition* **1**, 179-189.
- Spearman C. 1904. The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology* **15**, 72-101.
- Spector, A.A. 1986. Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods in Enzymology* **128**, 320-339.
- Student. 1908. Probable Error of a Mean. *Biometrika* **6**, 1-25.
- Trauner M., Arrese M., Wagner M. 2010. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1801**, 299-310.
- Uauy R., Mena P., Rojas C. 2000. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proceedings of the Nutrition Society* **59**, 3-15.
- Valenzuela R., Gormaz J.G., Masson L., Vizcarra M. Cornejo P., Valenzuela A., Tapia G. 2012. Evaluation of hepatic bioconversion of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed oils from chia (*Salvia hispánica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*). *Grasas y Aceites*, en prensa, DOI: 10.3989/gya.057111.
- Videla L.A., Rodrigo R., Orellana M., Fernandez V., Tapia G., Quiñones L., Varela N., Contreras J., Lazarte R., Csendes A., Rojas J., Maluenda F., Burdiles P., Diaz J.C., Smok G., Thielemann L., Poniachik J. 2004 a. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science (London)* **106**, 261-268.
- Videla L.A., Rodrigo R., Araya J., Poniachik J. 2004 b. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain poly-unsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radicals in Biology and Medicine* **37**, 1499-1507.
- Videla L.A., Rodrigo R., Araya J., Poniachik J. 2006 a. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends in Molecular Medicine* **12**, 555-558.
- Videla L.A., Rodrigo R., Araya J., Poniachik J. 2006 b. "Bases moleculares de hígado graso no-alcohólico asociado a obesidad: papel de mediadores transcripcionales metabólicos (PPAR- $\alpha$  y SREBP-1c) y pro-inflamatorios (NF- $\kappa$ B y AP-1)". Proyecto FONDECYT N° 1060105.

- Wang Y., Botolin D., Xu J., Christian B., Mitchell E., Jayaprakasam B, Nair MG, Peters JM, Busik JV, Olson LK, Jump DB. 2006. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *Journal of Lipids Research* **47**, 2028-2041.
- Whiting K.P., Restall C.J., Brain PF. 2000. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Science* **67**, 743-757.
- Young L.S., Trimble E.R. 1991. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Annals of Clinical Biochemistry* **28**, 504-508.
- Zhou Y., Park C.M., Cho C.W., Song Y.S. 2008. Protective effect of pinitol against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**, 1657-1666.
- Zivkovic A.M., German J.B., Sanyal A.J. 2007. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **86**, 285–300.
- Zou Y., Li J., Lu C., Wang J, Ge J, Huang Y., Zhang L., Wang Y. 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Science* **79**, 1100-1107.

## ANEXOS

### 9.1.- Presentaciones a Congresos

Se realizó una presentación a Congreso cuyo resumen se presenta a continuación.

Presentado en el Congreso Ciencia Joven 2011 realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, con motivo del XIV aniversario del ICBM. Santiago, Chile (2011):

#### 9.1.1.- ESTRÉS OXIDATIVO Y ALTERACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICA

**Gormaz JG**<sup>1</sup> Rodrigo R<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Doctorado en Nutrición Facultad de Medicina U de Chile  
<sup>2</sup>Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, U de Chile.

**Introducción:** En la enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA) se observa una disminución en los niveles tisulares ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL)  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, lo cual se podría explicar por una mayor lipoperoxidación y una menor biosíntesis, producto de la inhibición de las enzimas  $\omega$ -6 y  $\omega$ -5 desaturasas, donde el estrés oxidativo sería clave. **Objetivo:** Evaluar el efecto del estrés oxidativo hepático sobre la actividades de las enzimas  $\omega$ -6 y  $\omega$ -5 desaturasas. **Materiales y métodos:** Estudio caso-control en ratas (wistar) obesas, insulino resistentes con EHGNA, inducida por dieta de cafetería (dieta hipergrasa), pareadas con un grupo control eutrófico normopeso carente de la enfermedad. Se determinaron actividades hepáticas de las enzimas  $\omega$ -6 y  $\omega$ -5 desaturasas, y su correlación con estrés oxidativo tisular mediante: estatus REDOX (relación GSH/GSSG), lipoperoxidación (MDA), capacidad antioxidante celular enzimática (actividades SOD, CAT y GSH-Px). **Resultados:** Se encontraron correlaciones de Spearman inversas entre las actividades de las enzimas desaturasas  $\omega$ -6 y  $\omega$ -5 y parámetros de estrés oxidativo y correlaciones de Spearman directas entre dichas actividades y parámetros de capacidad antioxidante. El grupo con EHGNA manifestó una menor actividad desaturasa y mayores niveles de estrés oxidativo en comparación al grupo control (Test U- de Mann-Whitney). **Conclusiones:** El estrés oxidativo disminuye la biosíntesis de AGPICL-  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 en tejido hepático.  
FONDECYT 1060105; INNOVA-CORFO 07CT9Z-04

## 9.2.- Artículos Publicados

Los siguientes artículos han sido publicados como parte de la tesis doctoral:

- 9.2.1.- **Gormaz JG** y Rodrigo R. 2009. Nonalcoholic steatohepatitis. En *Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease*. Rodrigo R, editor. pp 223–256. Nova Science Publishers Inc, New York.
- 9.2.2.- **Gormaz JG**, Rodrigo R, Videla LA, Beems M. 2010. Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in Lipid Research* 49, 407–419.
- 9.2.3.- Valenzuela R, **Gormaz JG**, Masson L, Vizcarra M. Cornejo P., Valenzuela A., Tapia G. 2012. Evaluation of hepatic bioconversion of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed oils from chia (*Salvia hispánica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*). *Grasas y Aceites*, en prensa, DOI: 10.3989/gya.057111.