

Artículo Original

Reducción de la esteatosis hepática, insulino resistencia y pérdida de la defensa antioxidante en ratones alimentados con dieta alta en grasa suplementados con AGPICL n-3 más aceite de oliva extra virgen

Rodrigo Valenzuela B.¹, María Catalina Hernández-Rodas¹, Cynthia Barrera R.¹, Francisco Pérez B.¹ y Manuel Ruz O¹.

Reduction of hepatic steatosis, insulin resistance and loss of antioxidant defense in high fat diet fed mice supplemented with n-3 LCPUFA more extra virgin olive oil

¹Departamento de Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Correspondencia a:

Independencia, Santiago, Chile.
Casilla 1227
Teléfono: 56-2-29786014
Fax: 56-2-29786182
E mail: rvalenzuelab@med.uchile.cl

Recibido: 01-07-2015
Aceptado: 01-09-2015

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is directly associated with insulin resistance and oxidative stress. In NAFLD is established a reduction in n-3 LCPUFA (EPA + DHA) levels and hepatic activity of transcription factor PPAR- α . EPA and DHA inhibit lipogenesis and stimulate fatty acid oxidation in the liver. Extra virgin olive oil (EVOO) has important antioxidant properties. This study evaluated the prevention of insulin resistance and prevention of depletion of hepatic antioxidant defense in C57BL/6J mice fed high-fat diet (HFD), supplemented with n-3 LCPUFA plus EVOO. HFD generated insulin resistance and hepatic steatosis, together with significant reduction in i) n-3 LCPUFA hepatic levels, ii) DNA binding activity of PPAR- α , iii) activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase), respect to control group (fed with control diet). Supplementation with n-3 LCPUFA plus EVOO prevent development insulin resistance and attenuate increased of fat in liver ($p < 0.05$), together with a normalization of i) DNA binding activity of PPAR- α , ii) activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) and iii) reducing depletion of n-3 LCPUFA levels in liver tissue, compared to the control group ($p < 0.05$). Supplementation with n-3 LCPUFA plus EVOO reduced hepatic steatosis and prevent development of insulin resistance, along with preserving the antioxidant defense in liver. Projecting the use of this mixture of AGPICL n-3 plus EVOO as a potential treatment of NAFLD.

Key words: Liver steatosis, insulin resistance, antioxidant enzymes, n-3 LCPUFA (EPA + DHA), extra virgin olive oil.

Introducción

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por la acumulación anormal (superior al 5% del peso total del hígado) de triacilglicéridos (TAG) en el tejido hepático en ausencia de un consumo mayor a 20 g de alcohol/día, fenómeno conocido como esteatosis, el cual si va acompañado de inflamación puede evolucionar a esteatohepatitis no alcohólico, fibrosis y cirrosis hepática¹. En sujetos obesos, la incidencia de EHGNA alcanza entre un 60-90%, la es-

teatohepatitis un 20-25% y la cirrosis hepática un 2-8%². La resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación serían factores desencadenantes de la enfermedad³, y por este motivo la EHGNA puede ser considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico, siendo su incremento directamente vinculado a una mayor prevalencia de obesidad y diabetes tipo 2⁴. En la EHGNA se generan importantes alteraciones del metabolismo hepático, favoreciendo la lipogénesis de *novo* e inhibiendo tanto la oxidación como exportación de ácidos grasos desde el hígado a otros órganos⁵. Además, en aso-

ciación con la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación, se observa una significativa y drástica disminución en los niveles hepáticos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga n-3 (AGPICL n-3), específicamente el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA)⁶. El agotamiento de los AGPICL n-3 y la disminución en la actividad del factor de transcripción PPAR- α (del inglés peroxisome proliferator-activated receptor alpha) pueden jugar un papel fundamental en el aumento de la capacidad de unión al ADN de los factores de transcripción pro-inflamatorios NF- κ B (del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) y AP-1 (del inglés activator protein 1), lo que constituiría uno de los mecanismos más importantes para la progresión de la esteatosis a la esteatohepatitis⁷.

El EPA y el DHA, presentan diversas propiedades fisiológicas para el organismo, el DHA tiene un rol fundamental en el desarrollo cerebral y visual⁸, mientras que el EPA tiene un importante efecto cardio-protector, siendo incluso considerado como una alternativa no farmacológica para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades cardiovasculares⁹. Además, estos ácidos grasos son capaces de estimular la lipólisis, inhibir la lipogénesis y la inflamación a nivel hepático¹⁰. Antecedentes que permiten plantear la posibilidad de utilizar estos ácidos grasos como un tratamiento nutricional específico para la EHGA; sin embargo, las dosis necesarias de EPA + DHA para lograr un efecto significativo en humanos podrían generar potenciales efectos secundarios adversos, particularmente un aumento en el estrés oxidativo^{11,12}.

El aceite de oliva extra virgen (AOEV) tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias^{13,14}, beneficios atribuidos al alto contenido de vitamina E y de polifenoles, particularmente el hidroxitirosol (HT) y otros fenoles tales como: tirosol, oleuropeína aglicona y oleocantal, todos presentes en cantidades variables en el AOEV¹⁴⁻¹⁶. Respecto a las propiedades antioxidantes del AOEV, los compuestos fenólicos presentes en éste ejercerían un efecto protector frente al estrés oxidativo, previniendo especialmente la lipoperoxidación y el daño oxidativo del ADN¹⁴. Considerando estos antecedentes, el presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto protector de un protocolo combinado de AGPICL n-3 (EPA+DHA) más AOEV frente a la esteatosis hepática, insulino resistencia y pérdida de la defensa antioxidante hepática inducida por dieta alta en grasa en ratones.

Material y Métodos

Animales, dietas y suplementación dietaria

Ratones machos C57/6J (12-14 g) obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universi-

dad de Chile, fueron asignados al azar en cada grupo experimental. Siendo separados según dieta y tipo de suplementación que recibieron. Utilizándose una dieta control (DC) (Research Diet INC, Rodent Diet, Product data D12450B, USA.) que aportaba (expresado como % de las calorías totales) un 10% de grasa, 20% de proteína y 70% de hidratos de carbono, con un valor calórico de 3,85 Kcal/g, libre de EPA y DHA, que contenía 0,7 g de ácido α -linolénico (C18:3 n-3, ALA) (ALA)/100 g de dieta. La dieta alta en grasa (DAG) (Research Diet INC, Rodent Diet, Product data D12492, USA) aportaba un 60% de grasa, 20% de proteína y 20% de hidratos de carbono, con un valor calórico de 5,24 Kcal/g, libre de EPA y DHA, y con un aporte de 0,7 g de ALA. Los animales consumieron agua y dieta *ad libitum*, sometidos a ciclos de luz y oscuridad por 12 h cada uno, en un período de 12 semanas. Durante todo ese tiempo los animales recibieron una suplementación dietaria (vía oral) de EPA (67 mg/kg de EPA) + DHA (33 mg/kg de DHA) (100 mg/kg/día) (UP-Ultra Omega-3, New Science, Chile) o AOEV (100 mg/kg/día) (IV región de Coquimbo, Chile). Los grupos controles recibieron en cantidades iso-volumétricas una solución salina según el grupo experimental al que fueron asignados. Conformándose ocho grupos experimentales: a) DC; b) DC + AGPICL n-3; c) DC +AOEV; d) DC + (AGPICL n-3 + AOEV); e) DAG; f) DAG + AGPICL n-3; g) DAG + AOEV y h) DAG + (AGPICL n-3 + AOEV). Controlándose semanalmente el peso corporal y la ingesta dietaria. Al finalizar las 12 semanas de intervención los animales se mantuvieron en ayunas (6-8 h), siendo anestesiados con ketamina y xilacina (150 y 10 mg/kg, respectivamente), obteniéndose la muestra de sangre mediante punción cardíaca para determinar los niveles de glucosa e insulina. Las muestras de hígado se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C, para la posterior cuantificación de grasa hepática total y determinación de la composición de ácidos grasos. Todos los protocolos y procedimientos realizados en los animales cumplieron con la guía para el cuidado y uso de animales (National Academy of Sciences, NIH Publication 6-23, revised 1985) y fueron aprobados por el comité de bioética de investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA #0630 FMUCH).

Determinación de parámetros metabólicos y contenido de lípidos hepáticos

La glucosa en sangre (mM) se determinó usando un kit específico (Wiener Lab, Argentina). La insulina sérica (μ U/mL) se determinó utilizando un kit ultra-sensible (Mercodia, Uppsala, Suecia) acorde a las instrucciones del fabricante. La insulino resistencia fue estimada por el método "homeostasis model assessment method" (HOMA) [insulina en ayunas (μ U/mL) \times glucosa en ayu-

Artículo Original

nas (mM)/22,5]¹⁷. La grasa hepática total se determinó mediante el método descrito por Bligh y Dyer¹⁸, y el contenido hepático de TAG se evaluó utilizando un kit comercial específico (Wiener Lab, Argentina).

Determinación del perfil de ácidos grasos hepáticos totales

La extracción total de los lípidos hepáticos totales se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Bligh y Dyer¹⁷, las muestras de hígado (200 mg de tejido) fueron homogeneizadas en un ambiente frío (hielo) utilizando un homogeneizador Utraturax (Janke & Kunkel, Stufen, Germany) en tubos de vidrio, con una solución de metanol/cloroformo (2:1 v/v) que contenía 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Logrando un volumen de 1 mL de producto homogeneizado, adicionado H₂O bidestilada (3 mL) y cloruro de magnesio 0,5 N (1 mL) hasta alcanzar 5 mL de solución final. Posteriormente se obtuvo todo el cloroformo (fracción oleosa) y mediante extracción de solvente con nitrógeno gaseoso se logró obtener el contenido total de grasa hepática (TAG, mono y di-acilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, colesterol esterificado y libre) (mg grasa/100 mg hígado). Luego se prepararon los esteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de acuerdo a la metodología descrita por Morrison y Smith¹⁹, mediante hidrólisis alcalina y ácida, utilizando trifluoruro de boro al 12% en metanol e hidróxido de sodio en metanol 0,5N. Los EMAG fueron extraídos y recolectados con hexano (0,5 mL) para ser cuantificados mediante cromatografía gas-líquida en un equipo Agilent Hewlett-Packard (modelo 7890A, CA, USA) usando una columna capilar (Agilent HP-88, 100 m x 0,250 mm; I.D. 0,25 µm) con detector de ionización en llama (FID). La temperatura fue programada desde 140 a 220°C, con 3°C/min y con un tiempo final de 5 min. La temperatura del detector y el inyector fue de 250°C; utilizándose hidrógeno como gas de arrastre. Los ácidos grasos fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención, utilizando como estándar interno el ácido graso C23:0 (Nu-Chek Prep Inc, Elysian MN, USA) con aquellos estándares individuales a través de integración computarizada en un equipo Hewlett-Packard Chemstation (Palo Alto, CA, USA).

Determinación de la actividad de unión al DNA de PPAR-α

Los extractos de proteínas nucleares se obtuvieron utilizando un kit comercial de extracción (Cayman Chemical Company, Item N° 10011223, Ann Arbor, MI, USA) y luego se realizó un ELISA utilizando un kit específico (Cayman Chemical Company, Item N° 10006915, Ann Arbor, MI, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje de unión de PPAR-α al ADN nuclear respecto a un control positivo.

Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en un buffer fosfato que contenía 1 mmol de EDTA y 250 mmol de sacarosa. Luego de una centrifugación por 10 min (750 rpm a 4°C), se utilizó una alícuota del sobrenadante para la determinación de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. La actividad de la catalasa se midió mediante la metodología descrita por Lück²⁰. Definiéndose una unidad de enzima como la cantidad de enzima que libera la mitad de peróxido de hidrógeno a partir de una solución de peróxido de hidrógeno en 100 s a 25°C. La evaluación cuantitativa de la actividad de la SOD se realizó utilizando un kit comercial (Cayman Chemical Company, Item N° 706002, Ann Arbor, MI, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los resultados finales se expresaron como promedios ± error estándar de la media para 9-12 animales por grupo experimental. La evaluación de la distribución normal de los datos se realizó mediante test Shapiro wilk. Las diferencias entre los grupos experimentales, se evaluaron mediante ANOVA unifactorial, seguido del test de Newman Keuls. (GraphPad Prisma versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.), con un límite de confianza de 5% (p < 0,05).

Resultados

La suplementación con AGPICL n-3 más AOEV reduce el incremento de peso del tejido adiposo visceral y la acumulación de grasa en hígado inducida por DAG

Los animales de los diferentes grupos experimentales no presentaron diferencias (p < 0,05) en el peso inicial, no obstante, a las 12 semanas de intervención, los ratones alimentados con DAG (con o sin suplementación) presentaron un incremento significativo de peso corporal respecto a los animales alimentados con DC (Tabla 1A). El peso del hígado no presentó diferencias (p < 0,05) entre los grupos experimentales. El peso del tejido adiposo visceral aumentó significativamente en los animales que recibieron DAG, pero en aquellos que fueron suplementados con AGPICL n-3 este incremento fue menor (p < 0,05), respecto a los no suplementados con este tipo de ácidos grasos (Tabla 1A). La DAG generó un incremento (p < 0,05) en el contenido de grasa hepática total y en los TAG hepáticos (Tabla 1B). La suplementación con AGPICL n-3 más AOEV en los ratones alimentados con DAG generó un menor incremento en estos parámetros de

Tabla 1. Parámetros generales y bioquímicos en los ratones alimentados con DC o DAG sometidos a suplementación dietaria con AGPICL n-3, AOEV o AGPICL n-3 + AOEV

	Grupos experimentales							
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
A. Parámetros generales								
Peso inicial (g)	13,4 ± 0,5	13,2 ± 0,3	13,6 ± 0,4	13,5 ± 0,4	13,6 ± 0,6	13,9 ± 0,6	14,1 ± 0,5	13,8 ± 0,5
Peso final (g)	28,2 ± 1,4 e,f,g,h	27,8 ± 1,3 e,f,g,h	27,3 ± 1,7 e,f,g,h	26,8 ± 1,2 e,f,g,h	38,7 ± 0,8 a,b,c,d	38,6 ± 1,4 a,b,c,d	38,3 ± 0,6 a,b,c,d	37,5 ± 0,8 a,b,c,d
Peso hígado (g)	0,99 ± 0,2	0,98 ± 0,2	1,01 ± 0,1	0,98 ± 0,1	1,06 ± 0,2	1,16 ± 0,2	1,10 ± 0,2	1,08 ± 0,1
Peso tejido adiposo (g)	1,09 ± 0,1 e,f,g,h	1,07 ± 0,1 e,f,g,h	1,09 ± 0,1 e,f,g,h	1,080,2 e,f,g,h	3,92 ± 0,3 a,b,c,d,f,h	2,92 ± 0,2 a,b,c,d,e,g	3,75 ± 0,2 a,b,c,d,f,h	2,25 ± 0,2 a,b,c,d,e,g
B. Parámetros hepáticos								
Grasa total (mg/g hígado)	34,6 ± 4,7 e,f,g,h	29,7 ± 2,3 e,f,g,h	31,5 ± 2,0 e,f,g,h	29,4 ± 3,6 e,f,g,h	103,1 ± 3,5 a,b,c,d,f,g,h	85,3 ± 5,8 a,b,c,d,e,h	82,7 ± 9,8 a,b,c,d,e,h	43,10 ± 4,8 a,b,c,d,e,f,g
TAG (mg/g hígado)	30,5 ± 2,3 e,f,g,h	26,5 ± 2,5 e,f,g,h	26,2 ± 2,5 e,f,g,h	26,9 ± 2,4 e,f,g,h	95,9 ± 6,9 a,b,c,d,f,g,h	74,9 ± 10,5 a,b,c,d,e,h	78,5 ± 8,7 a,b,c,d,e,h	38,0 ± 3,2 a,b,c,d,e,f,g
C. Insulino resistencia								
Glicemia (mg/dL)	124,5 ± 13,2 e,f,g	104,5 ± 10,5 e,f,g,h	110,2 ± 12,3 e,f,g,h	106,3 ± 14,2 e,f,g,h	230,1 ± 30,5 a,b,c,d	184,5 ± 20,5 a,b,c,d	221,3 ± 21,5 a,b,c,d	146,4 ± 10,0 b,c,d,e,f,g
Insulinemia (unidades/dL)	5,55 ± 0,84 e,f,g	5,20 ± 0,65 e,f,g	5,20 ± 0,74 e,f,g	5,19 ± 0,59 e,f,g	14,80 ± 1,95 a,b,c,d,f,g,h	11,02 ± 1,25 a,b,c,d,e,h	12,50 ± 1,68 a,b,c,d,e,h	5,45 ± 0,74 e,f,g
HOMA	1,24 ± 0,1 e,f,g	1,21 ± 0,1 e,f,g	1,17 ± 0,1 e,f,g	1,15 ± 0,1 e,f,g	8,15 ± 0,8 a,b,c,d,h	6,15 ± 0,5 a,b,c,d,h	7,21 ± 0,5 a,b,c,d,h	1,31 ± 0,1 e,f,g

Grupos experimentales: DC^(a); DC+(EPA+DHA)^(b); DC+AOEV^(c); DC+(EPA+DHA+AOEV)^(d); DAG^(e); DAG+ (EPA+DHA)^(f); DAG+AOEV^(g); DAG+(EPA+DHA+AOEV)^(h). Los valores corresponden al promedio ± DSM para 8-10 animales por grupo. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados ($p < 0,05$; Anova unifactorial seguido de test de Newman-Keuls) se indica con las letras de los respectivos grupos.

esteatosis hepática, comparados con el grupo alimentado con DC. No obstante, dicha suplementación, no logró normalizar los niveles de grasa total y TAG hepáticos respecto al grupo control (Tabla 1B).

La suplementación con AGPICL n-3 más AOEV previene la insulino resistencia generada por DAG

Los animales que recibieron DAG presentaron un incremento significativo en la glicemia, insulinemia y HOMA respecto al grupo control, mientras que la suplementación con AGPICL n-3 más AOEV logró normalizar los parámetros evaluados (Tabla 1C). Siendo interesante destacar que la suplementación en forma separada de AGPICL n-3 o AOEV en aquellos ratones alimentados con DAG no redujo ($p < 0,05$) las alteraciones en dichos parámetros, comparados con los animales que recibieron DC (Tabla 1C).

Efectos de la suplementación con AGPICL n-3 más AOEV en el perfil de ácidos grasos hepáticos totales en los ratones alimentados con DAG o DC

Los animales alimentados con DAG presentaron un incremento ($p < 0,05$) en los niveles hepáticos de ácidos

grasos saturados (AGS), ácido palmítico (C16:0) y en la relación AGPICL n-6/n-3, observándose además una reducción ($p < 0,05$) en los niveles de AGPI, AGPICL n-6, AGPICL n-3, ácido linoleico (C18:2 n-6, AL), ácido alfa-linolénico (C18:3 n-3, ALA), ácido araquidónico (C20:4 n-6, AA), EPA y DHA (Tabla 2). Mientras que en el grupo alimentado con DAG suplementado con AGPICL n-3 más AOEV se observó una normalización en los niveles hepáticos de AGS, ácido palmítico, ALA, respecto al grupo control. Sin embargo, dicha suplementación no logró normalizar los niveles hepáticos de los AGPI, AGPICL n-6, AGPICL n-3, AA, EPA y DHA (Tabla 2).

Normalización de la actividad de unión de PPAR- α al ADN en ratones alimentados con DAG luego de la suplementación con AGPICL n-3 más AOEV

En los ratones alimentados con DAG se observó una reducción ($p < 0,05$) en la actividad de unión de PPAR- α al ADN respecto al grupo alimentado con DC. A su vez el grupo alimentado con AGPICL n-3 más AOEV logró normalizar la actividad de unión de PPAR- α al ADN (Figura 1). Además, en los grupos alimentados con DC y suplementados con AGPICL n-3 (grupo b y d) se observó un incremento en la actividad de unión de PPAR- α al ADN,

Artículo Original

Tabla 2. Composición de ácidos grasos hepáticos totales obtenidos de ratones alimentados con DC o DAG, sometidos a la suplementación con AGPICL n-3, AOEV o AGPICL n-3 + AOEV

	Perfil de ácidos (g/100 g EMAG)							
	Dieta control (DC)				Dieta alta en grasa (DAG)			
	Salino	AGPICL n-3	AOEV	AGPICL n-3 + AOEV	Salino	AGPICL n-3	AOEV	AGPICL n-3 + AOEV
(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	
Ácidos grasos								
16:0	35,4 ± 2,8 _e	34,8 ± 2,9 _e	34,0 ± 2,7 _e	30,3 ± 2,6 _{e,f,g}	45,4 ± 3,1 _{a,b,c,d,h}	41,3 ± 3,1 _d	41,4 ± 3,5 _{b,c,d}	35,2 ± 2,8 _e
18:1, n-9	23,5 ± 2,4 _{c,d,g,h}	22,7 ± 1,8 _{c,d,g,h}	27,8 ± 2,5 _{a,b,e}	28,8 ± 1,9 _b	26,8 ± 2,3 _g	24,5 ± 2,1 ^g	32,0 ± 2,3 ^b	29,0 ± 2,1 _{a,b}
18:2, n-6 (AL)	15,5 ± 1,2 _{b,c,d,e,f,g,h}	10,5 ± 0,9 _a	12,1 ± 0,7 _a	11,4 ± 0,8 _a	11,3 ± 1,1 _a	9,5 ± 0,7 _a	11,8 ± 0,9 _a	11,5 ± 0,9 _a
18:3, n-3 (ALA)	1,08 ± 0,1 _e	1,05 ± 0,1 _e	0,93 ± 0,05 _e	0,98 ± 0,1 _e	0,77 ± 0,1 _{a,b,c,d,f,g,h}	1,02 ± 0,4 _e	1,02 ± 0,4 _e	1,03 ± 0,4 _e
20:4, n-6 (AA)	12,1 ± 0,9 _{b,d,e,f,g,h}	8,85 ± 0,7 _a	9,40 ± 0,8 _{a,e,f}	8,12 ± 0,3 _a	7,50 ± 0,3 _{a,c}	7,90 ± 0,5 _{a,c}	7,05 ± 0,6 _a	9,01 ± 0,4 _a
20:5, n-3 (EPA)	1,05 ± 0,1 _{b,c,e,g}	2,80 ± 0,3 _{a,c,e,f,g,h}	0,75 ± 0,03 _{a,b,d,e,f,g,h}	2,14 ± 0,4 _{a,c,e,f,g,h}	0,44 ± 0,05 _{a,b,c,d,f,g,h}	0,82 ± 0,05 _{a,b,d,e,h}	0,62 ± 0,03 _{a,b,d,e,f,h}	0,92 ± 0,04 _{a,b,c,d,e,f,g}
22:6, n-3 (DHA)	4,05 ± 0,2 _{b,c,d,e,f,g,h}	5,60 ± 0,5 _{a,c,b,e,f,g,h}	3,72 ± 0,2 _{a,b,d,e,f,g}	4,31 ± 0,5 _{b,c,f,g}	2,00 ± 0,3 _{a,b,e,f,g}	2,80 ± 0,4 _{a,b,d,e}	2,44 ± 0,5 _{a,b,c,d}	3,05 ± 0,3 _b
AGS	36,5 ± 3,0 _e	36,1 ± 2,7 _{e,f,g}	35,0 ± 2,7 _{e,f,g}	32,0 ± 2,0 _{e,f,g}	47,6 ± 3,4 _{a,b,c}	42,4 ± 2,3 _{b,c,d}	42,7 ± 3,2 _{c,d}	37,5 ± 2,9 _d
AGMI	26,4 ± 2,1 ^{c,g}	24,8 ± 2,4 _{c,g}	29,6 ± 2,1	30,5 ± 3,8	29,3 ± 2,0	26,8 ± 2,1	34,9 ± 2,9	31,9 ± 2,7
AGPI	37,1 ± 2,9 _{e,g}	39,1 ± 3,7 _{e,f,g,h}	35,4 ± 2,9 _{e,g}	37,5 ± 2,6 _{e,g}	23,1 ± 1,9 _{a,b,c,d,f,h}	30,8 ± 2,6 _{b,e,g}	22,4 ± 1,9 _{a,b,c,d,f,h}	30,6 ± 2,8 _{a,b,d,e,g}
AGPICL	17,5 ± 1,7 _{d,e,f,g,h}	17,5 ± 1,4 _{d,e,f,g,h}	15,8 ± 1,3 _{e,f,g}	14,4 ± 1,0 _{a,e,f,g}	10,0 ± 0,7 _{a,b,c,d,h}	11,9 ± 0,6 _{a,b,c,d}	10,2 ± 0,6 _{a,b,c,d,h}	12,8 ± 0,9 _{a,b,c,d,e}
AGPICL n-6	12,4 ± 1,1 _{b,d,e,f,g,h}	9,50 ± 0,5 _{a,c,d,e,b}	10,6 ± 0,9 _e	8,20 ± 0,5 _{a,b,c,e}	7,50 ± 0,6 _{a,b,c,h}	8,18 ± 0,5 _{a,b}	8,02 ± 0,6 _{a,b}	8,90 ± 0,5 _{a,e}
AGPICL n-3	5,10 ± 0,2 _{b,c,d,e,f,g,h}	8,00 ± 0,8 _{a,c,d,e,f,g,h}	5,20 ± 0,5 _{b,d,e,f,g,h}	6,20 ± 0,3 _{a,b,c,e,f,g,h}	2,50 ± 0,4 _{a,b,c,d,f,g,h}	3,72 ± 0,4 _{a,b,c,d,e,h}	2,18 ± 0,2 _{a,b,c,d,e,h}	3,90 ± 0,3 _{a,b,d,e,f,g}
Relación AGPICL n-6/n-3	2,43 ± 0,2 _{b,d,e}	1,19 ± 0,2 _{a,c,d,e,f,g}	2,04 ± 0,3 _{b,d,e}	1,32 ± 0,1 _{a,c,e,f,g,h}	3,00 ± 0,6 _{a,b,c,d,e,f,h}	2,13 ± 0,5 _{b,d,e}	3,70 ± 0,5 _{b,d,e}	2,28 ± 0,3 _{b,d,e}

Los valores son expresados como g de ácidos grasos por 100 g de EMAG y corresponden al promedio ± D.S.M. para 8-10 animales por grupo. Grupos experimentales: DC^(a); DC+(EPA+DHA)^(b); DC+AOEV^(c); DC+(EPA+DHA+AOEV)^(d); DAG^(e); DAG+(EPA+DHA)^(f); DAG+AOEV^(g); DAG+(EPA+DHA+AOEV)^(h). Ácidos grasos saturados (AGS) corresponden a 14:0, 16:0 y 18:0. Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) corresponden a 14:1, n-7, 16:1, n-7 y 18:1, n-9. Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) corresponden a 18:2, n-6, 18:3, n-3, 20:4, n-6, 20:5, n-3, y 22:6, n-3. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) corresponden a 20:4, n-6 (AGPICL n-6), 20:5, n-3 y 22:6, n-3 (AGPICL n-3). La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados (p < 0,05; Anova unifactorial seguido de test de Newman-Keuls) se indica con las letras de los respectivos grupos. Relación AGPICL n-6/n-3: 20:4, n-6/ (20:5, n-3 + 22:6, n-3).

comparado con el grupo control, sin embargo, en el grupo alimentado con DAG más suplementación con AGPICL n-3 sin AOEV no se observó este efecto (Figura 1).

La DAG reduce la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas catalasa y SOD en ratones; efectos normalizados por la suplementación con AGPICL n-3 más AOEV

La DAG generó en los animales una drástica y significativa reducción en la actividad de las enzimas antioxi-

dantes hepáticas catalasa (Figura 2A) y SOD (Figura 2B) 51% y 20% respectivamente. Reducción que fue normalizada en aquellos ratones alimentados con DAG que fueron suplementados con AGPICL n-3 más AOEV (Figura 2 A-B), respecto al grupo alimentado con DC. Siendo interesante mencionar que la suplementación con AOEV en los ratones alimentados con DAG si bien logra reducir (p < 0,05) la caída en la actividad de ambas enzimas, este efecto no logra normalizar dicha actividad respecto al grupo control.

Discusión y Conclusión

La DAG generó en los animales un incremento significativo en i) el peso corporal y del tejido adiposo visceral; ii) la acumulación de grasa total y TAG en hígado; iii) insulino resistencia, situación que ha sido descrita en otros estudios^{21,22}. Siendo la interrelación entre el estrés oxidativo, la inflamación y la insulino resistencia generada por esta dieta uno de los factores claves en el desarrollo de EHGNA³. Respecto a los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de la esteatosis hepática y posterior evolución a la EHGNA, es posible observar que una regulación negativa del factor de transcripción PPAR- α , acompañada de un incremento en la actividad de los factores de transcripción PPAR- γ y SREBP-1c (del inglés sterol regulatory element-binding protein 1), cambios que generan importantes alteraciones del metabolismo hepático, favoreciendo la lipogénesis de *nov*o e inhibiendo tanto la oxidación como exportación de ácidos grasos desde el hígado a otros órganos⁵. Además, en animales alimentados con DAG, se observa una directa correlación entre el estrés oxidativo inducido por esta dieta con la reducción en la actividad de las enzimas desaturasas hepáticas (Δ -5 y Δ -6), situación que repercute en una disminución en los niveles tisulares de AGPICL n-6 y n-3²². Efecto que también se observa en este estudio (Tabla 2). Otro aspecto interesante de discutir es que un estrés oxidativo prolongado o de gran intensidad inducido por especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, es capaz de deteriorar irreversiblemente estructuras sub-celulares, especialmen-

te las membranas mitocondriales²³, desencadenando una cascada inflamatoria y fibrogénica en el hígado²⁴, lo cual se refleja por ejemplo en la caída en la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas, tales como la catalasa y SOD (Figura 2 A-B). En relación a la insulino resisten-

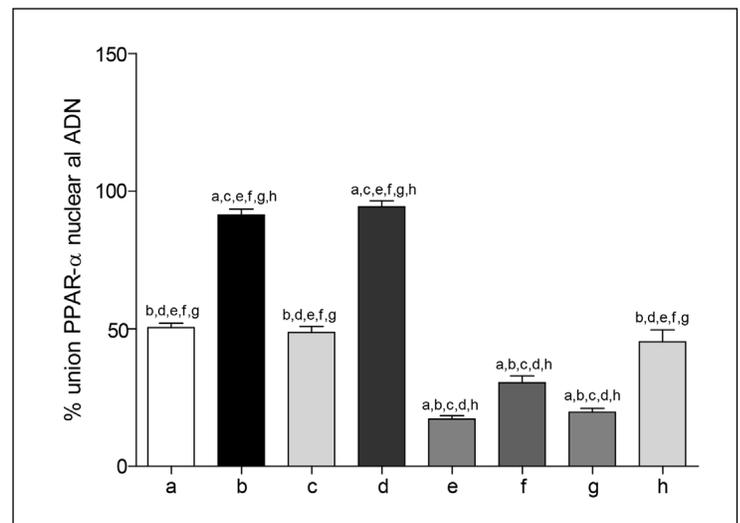


Figura 1. Actividad de unión de PPAR- α nuclear al DNA ratones alimentados con DC o DAG, sometidos a la suplementación con AGPICL n-3, AOEV o AGPICL n-3 + AOEV. Los valores corresponden al porcentaje de unión de PPAR- α respecto a un control positivo mediante ELISA y son \pm D.S.M. para 9 animales por grupo. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados ($p < 0,05$; Anova unifactorial y test Newman-Keuls) se indica con las letras de los respectivos grupos.

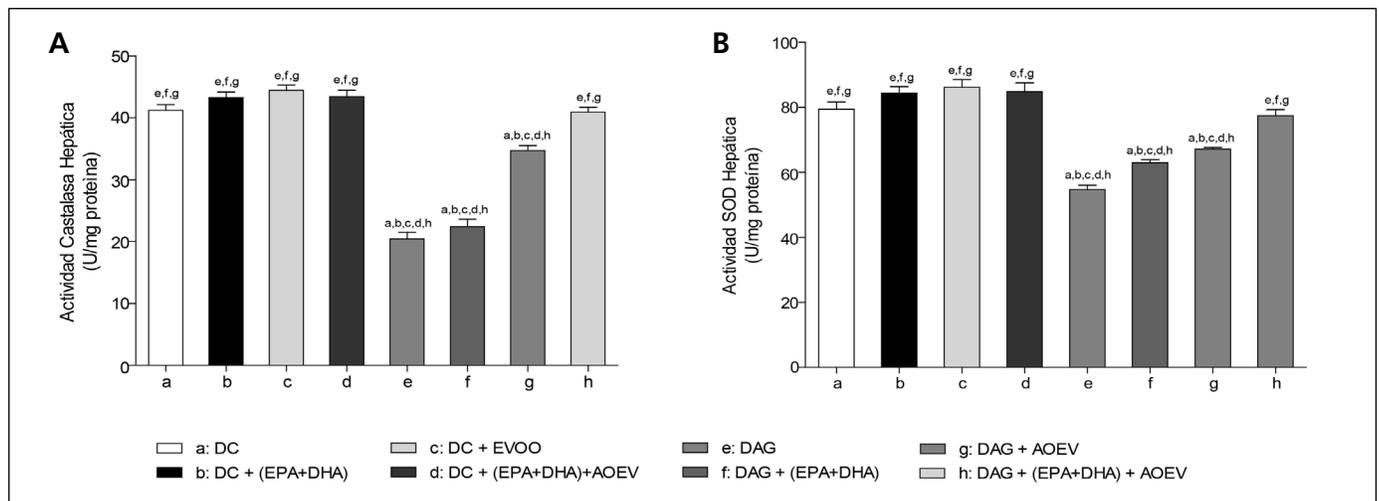


Figura 2. Cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa de ratones alimentados con DC o DAG, sometidos a la suplementación con AGPICL n-3, AOEV o AGPICL n-3 + AOEV. Grupos experimentales: DC^(a); DC+(EPA+DHA)^(b); DC+AOEV^(c); DC+(EPA+DHA)+AOEV^(d); DAG^(e); DAG+(EPA+DHA)^(f); DAG+AOEV^(g); DAG+(EPA+DHA)+AOEV^(h). Los valores corresponden al promedio \pm D.S.M. para 8-10 animales por grupo. La significancia de las diferencias entre los valores promedio de los animales controles y los tratados ($p < 0,05$; Anova unifactorial seguido de test de Newman-Keuls) se indica con las letras de los respectivos grupos.

Artículo Original

cia, esta es una alteración asociada a la obesidad, la cual favorece aún más la esteatosis hepática²⁵, observándose que la insulino resistencia estimula por retroalimentación β -pancreática un aumento en la secreción de insulina²⁶. Fomentándose la secreción de ácidos grasos desde el tejido adiposo al plasma (lipólisis), aportando así más sustrato al hígado para realizar lipogénesis²⁷. En la esteatosis hepática, una exposición permanente y excesiva de glucosa y ácidos grasos libres (AGL), puede generar glucotoxicidad y lipotoxicidad²⁸, fenómenos fuertemente asociados a condiciones de estrés oxidativo e inflamación²³, y el desarrollo de esteatohepatitis.

EL EPA y DHA (AGPICL n-3) tienen importantes efectos cito-protectores, especialmente frente al síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares⁹, mediados principalmente por i) un cambio en la composición de los fosfolípidos de membrana, favoreciendo la incorporación de diversos receptores, y por ende la mantención de vías de señalización incluidos el de la insulina; ii) la disminución en la síntesis de eicosanoides con efectos pro-inflamatorios derivados del AA y iii) la producción de eicosanoides y docosanoides derivados de AGPICL n-3, con importantes efectos antiinflamatorios⁹. Además, estos ácidos grasos al activar a PPAR- α , favorecen la expresión de genes que participan en la oxidación de ácidos grasos, lo cual sumado a la represión generada por estos mismos ácidos grasos sobre la actividad de unión al ADN, producen un estado anti-lipogénico a nivel hepático^{29,30}. Estableciéndose incipientemente que isoprostanos de la serie J₃ (compuestos derivados del EPA y DHA) participarían en la activación del factor de transcripción Nrf2 (del inglés nuclear erythroid 2-related factor), favoreciendo un incremento en la capacidad antioxidante intracelular³¹. En relación al AOEV, los antioxidantes que este posee le permiten disminuir la oxidación de la LDL, lo cual ayuda a prevenir el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular^{15,16}. Además de lograr una reducción en la generación de especies reactivas del oxígeno³², incrementando la capacidad antioxidante del plasma y reduciendo los niveles de F-2 isoprostanos (compuestos derivados de la oxidación específica del AA)³³. El AOEV permite también mejorar la relación GSH/GSSG, y aumentar la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) en eritrocitos³³, siendo este uno de los principales efectos protectores del AOEV frente a la lipoperoxidación y formación de placas de aterosclerosis³⁴. Dentro de los polifenoles presentes en el AOEV, el HT activaría también a Nrf2, fortaleciendo aún más la capacidad de respuesta antioxidante a nivel intracelular³⁵. En conclusión, la suplementación dietaria con suplementación con AGPICL n-3 (EPA+DHA) más AOEV, logró prevenir la esteatosis hepática, insulino resistencia y la pérdida de la defensa antioxidante (actividad de las enzimas Catalasa y SOD) en ratones alimen-

tados con DAG. Siendo la conservación de la actividad de unión del factor de transcripción PPAR- al ADN uno de los mecanismos involucrados en estos efectos, lo cual requiere continuar con más estudios al respecto.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes (SOCHED 2013-04 PROYECTO) por financiar esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. Byrne CD. 2012. Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. *Diabet Med* 29: 1098-1107.
2. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, et al. 2010. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 53: 372-384.
3. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, et al. 2006. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med* 12: 555-558.
4. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, et al. 2011. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 141: 1249-1253.
5. Musso G, Gambino R, Cassader M. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 48: 1-26.
6. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, et al. 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. *Clin Sci (Lond)* 106: 635-643.
7. Valenzuela R, Videla LA. 2011. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct* 2: 644-648.
8. Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, et al. 2012. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr* 107: S85-106.
9. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, et al. 2011. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res* 50: 372-387.
10. Sun C, Wei ZW, Li Y. 2011. DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver. *Mol Biol Rep* 38: 731-737.
11. Tsuduki T, Honma T, Nakagawa K, et al. 2011. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition* 27: 334-337.
12. Baarine M, Andreoletti P, Athias A, et al. 2012. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using

- RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and COX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* 213: 1-18.
13. Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol* 23: 129-135.
 14. Cicerale S, Conlan XA, Sinclair AJ, et al. 2009. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 218-236.
 15. Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, et al. 2006. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145: 333-341.
 16. De la Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jáuregui O, et al. 2010. Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J Nutr* 140: 501-508.
 17. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.
 18. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
 19. Morrison WR, Smith LM. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5: 600-608.
 20. Lüch H. 1965. *Methods of Enzymatic Assay* ed. H.U. Bermayer, Academic Press, New York pp. 885-894.
 21. Valenzuela R, Espinosa A, González-Mañán D, D'Espessailles A, Fernández V, Videla LA, et al. 2012. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS One* 7:e46400.
 22. Valenzuela R, Barrera C, Espinosa A, Llanos P, Orellana P, Videla LA. 2015. Reduction in the desaturation capacity of the liver in mice subjected to high fat diet: Relation to LCPUFA depletion in liver and extrahepatic tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 98: 7-14.
 23. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, et al. 2004. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* 106: 261-268.
 24. Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, et al. 2008. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 29: 22-35.
 25. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944-948.
 26. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, et al. 2004. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 37: 1499-1507.
 27. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, et al. 2007. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 583: 9-24.
 28. Anderson N, Borlak J. 2008. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 60: 311-357.
 29. Clarke SD. 2004. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol* 15: 13-18.
 30. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, González-Mañán D, et al. 2014. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- α upregulation and NF- κ B DNA binding abrogation. *Mol Nutr Food Res* 58: 1333-1341.
 31. Gao L, Wang J, Sekhar KR, et al. 2007. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem* 282: 2529-2537.
 32. Nakbi A, Dabbou S, Champion S, et al. 2011. Modulation of superoxide anion production and MMP-9 expression in PMA stimulated THP-1 cells by olive oil minor components: tyrosol and hydroxytyrosol. *Food Res Int* 44: 575-581.
 33. Bogani P, Galli C, Villa M, et al. 2007. Postprandial antiinflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 190: 181-186.
 34. Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, et al. 2004. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr* 134: 2314-2321.
 35. Zhu L, Liu Z, Feng Z, Hao J, Shen W, Li X, et al. 2010. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem* 21: 1089-1098.