

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor **en Ciencias Biológicas**

ROL SINÉRGICO DE LÍPIDOS FUNCIONALES EN LA PREVENCIÓN DE ALTERACIONES LIPÍDICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO-ALCOHÓLICO

Lic. Ignacio Gabriel Scanarotti

Director de Tesis: Dr. Claudio Adrián Bernal
Co-director de Tesis: Dra. Juliana Sain

Lugar de realización: Cátedra de Bromatología y Nutrición – FBCB – UNL

-2024-

Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos, el océano

– Isaac Newton –

AGRADECIMIENTOS

Frente a la finalización de este trabajo de Tesis Doctoral quiero manifestar mi infinito agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado desde el inicio de este proyecto y durante el largo camino recorrido.

Agradecer a la educación pública de nuestro país, a la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por la enseñanza de sus docentes quienes me brindaron herramientas que aplique en la carrera de Doctorado. También por brindarme el espacio y los elementos necesarios para formarme como profesional y como persona, no sólo a lo largo del Doctorado sino también en mi carrera de grado, y en mi desempeño como docente.

A la Universidad Nacional del Litoral, por financiar mi Beca de Iniciación al Doctorado, y porque a través de su subsidio CAI+D-Orientado: 21820210100082LI “Obtención sustentable de tocoferoles y fitosteroles a partir de subproductos de bajo valor comercial de la industria aceitera para la elaboración de suplementos funcionales” Dir: Claudio Bernal; y CAI+D-Orientado: 2020 PI TIPO II “Acción benéfica del aceite de lino virgen rico en lignanos sobre alteraciones lipídicas asociadas al hígado graso no alcohólico en dos modelos experimentales”. Dir: Claudio Bernal; colaboró con la financiación para la realización de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la Beca de Finalización del Doctorado recibida.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, porque a través de su proyecto PICT2020-002066 “Efecto sinérgico de lípidos funcionales sobre la acumulación de colesterol hepático en un modelo nutricional de enfermedad del hígado graso no alcohólico” Dir: Juliana Sain; colaboró con la financiación para la realización de este trabajo de tesis.

A COPLASAN SA, por la gentil donación de semillas de lino utilizadas en este trabajo.

A Ana Fabro y a la Cátedra de Morfología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por la ayuda con el desarrollo de las técnicas histológicas aplicadas en el presente trabajo de tesis

A mi director, Claudio Bernal, quien puso su confianza en mí y me permitió formar parte de su grupo de trabajo, por las enseñanzas y oportunidades, por su apoyo, por los consejos recibidos, por ser un referente y por brindarme la posibilidad de continuar avanzando en mi formación académica.

A mi co-directora, Juliana Sain, por enseñarme básicamente todo lo que he aprendido sobre lo que implica hacer ciencia. Por alentarme siempre a seguir y transmitirme su buena energía.

Gracias por los mates, cafés, y comidas compartidas; y sobre todo, por el tiempo dedicado a mi formación.

A Mati, por iniciarme en este camino de la investigación, por las charlas, consejos y comidas compartidas.

A Jime, Caro y Anita por su gran paciencia para enseñar y explicarme, las veces que fue necesario, las distintas técnicas que utilicé. Por su rol de “madres sustitutas” cuando hizo falta, y por haber resignado tiempo de sus actividades de investigación para ayudarme.

A Luciana y Emilse por su ayuda con la obtención y el análisis del aceite de lino virgen, así como también por la provista de los purificados de destilados de desodorización de aceite de soja.

A las demás personas de la Cátedra y del Departamento de Ciencias Biológicas por su compañía y colaboración en las tareas y el aprendizaje del día a día.

A mis amigos, por la amistad que nos une desde hace años, por estar siempre, por compartir viajes, reuniones y demás momentos imprescindibles, para hacer este camino científico más ameno.

A mi madre por darme la vida, por brindarme la posibilidad de estudiar lo que me gustaba, formarme como persona, cuidarme, ayudarme y acompañarme durante todo este proceso.

A mis hermanos por sostenerme y acompañarme durante todo este proceso. Por ser mis tutores y consejeros en cada paso que me ha tocado dar.

A mis sobrinos, por ser mi motivación a tratar de ser el mejor ejemplo posible para ellos. Por su compañía y por el aprendizaje que brindan al crecer con uno.

A mi esposa, por ser un soporte incondicional durante toda esta etapa. Por llevarse la peor parte de los días grises, donde los resultados no dan y la desmotivación abunda. Por ser siempre una palabra de aliento y sostener mi Fe. Por incitarme a cada día tratar de ser un mejor hombre, por ella y para ella.

Por último, a mi padre, por los valores que me enseñó y por proveerme el ejemplo que quiero seguir.

Aportes científico-tecnológicos

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados, o se encuentran en revisión, en revistas de divulgación científica y se han presentado en numerosos congresos nacionales e internacionales.

Trabajos publicados

- **Scanarotti, I., Sain, J., Fabro, A., Bernal, C. (2024).** *Virgin flaxseed oil supplemented or not with tocopherols and phytosterols prevents liver steatosis induced by high-fat diets in male Wistar rats.* European Journal of Lipid Science and Technology. DOI: 10.1002/ejlt.202300203.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE GENERAL	6
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	11
RESUMEN	15
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	22
1. Lípidos dietarios y Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT)	22
1.1- Lípidos dietarios y sus efectos en la salud	22
1.2- Lípidos Funcionales	23
1.2.1- Ácidos Grasos Poliinsaturados	24
1.2.2- Tocoferoles	27
1.2.3- Fitoesteroles	30
1.3- Los destilados de desodorización como fuentes de lípidos funcionales	31
1.4- El aceite de lino como alimento funcional	32
2. Esteatosis hepática	33
2.1- Generalidades de la esteatosis hepática	33
2.2- El hígado y su histoarquitectura	35
2.3- Enfermedad del hígado graso no alcohólico	39
2.3.1- Epidemiología de la NAFLD	39
2.3.2- Mecanismos involucrados en la NAFLD	40
2.3.2.1 Rol de la captación de AG circulantes	41
2.3.2.2- Rol de la lipogénesis <i>de novo</i>	42
2.3.2.3- Rol de la secreción hepática de TAG	43
2.3.2.4- Rol de la β -oxidación	44

2.3.2.5- Rol de la acumulación de colesterol a nivel hepático	45
2.3.3- Progresión de la NAFLD	46
2.3.4- Métodos diagnósticos	47
2.3.4.1- El análisis histopatológico como gold standard	49
2.3.4.1.1- Esteatosis macro- y micro-vesicular	49
2.3.4.1.2- Inflamación lobulillar y portal	50
2.3.4.1.3- Hepatocitos balonizados	50
2.3.4.1.4- Fibrosis	51
2.4- Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD)	52
3. Modelos animales de NAFLD	52
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	60
1. Animales	60
2. Dietas experimentales	60
3. Tratamiento y seguimiento de los animales	63
3.1- Ingesta energética	64
3.2- Ganancia de peso	64
3.3- Sacrificio de los animales y toma de muestras	64
4. Composición corporal	65
4.1- Determinación del contenido de agua	65
4.2- Determinación del contenido de proteínas	65
4.3- Determinación del contenido de grasa	65
5. Parámetros metabólicos plasmáticos y tisulares	66
5.1- Cuantificación de triacilglicéridos en suero	66

5.2- Cuantificación de colesterol total en suero	66
5.3- Cuantificación de glucosa plasmática	66
5.4- Cuantificación de triacilglicéridos y colesterol total hepático	67
5.5- Cuantificación de colesterol libre y esterificado en hígado	67
6. Composición y relaciones de ácidos grasos circulantes y tisulares	67
6.1- Obtención del extracto lipídico	68
6.2- Derivatización de AG	68
6.3- Identificación y cuantificación de ácidos grasos	69
6.4- Flujo a través de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico	69
7. Actividad de enzimas reguladoras del metabolismo lipídico en hígado	70
7.1- Acetil-CoA carboxilasa	70
7.2- Carnitina palmitoil transferasa-1 ^a	71
8. Actividad tisular de la enzima lipoproteína lipasa	71
8.1- LPL en tejido adiposo epididimal	71
8.2- LPL en músculo gastrocnemio	72
9. Secreción hepática de TAG-pre-β-lipoproteínas	73
10. Test de tolerancia oral a la glucosa	73
11. Grado de peroxidación lipídica en hígado	74
12. Niveles de ARNm de diferentes parámetros metabólicos en hígado	74
13. Análisis histológico	76
13.1- Obtención de los tacos	76
13.2- Tinción de los tacos	76
13.3- Análisis histológicos H-E	77
13.4- Análisis histológico Sirius Red	78

14. Análisis estadístico	79
RESULTADOS	81
1. Parámetros nutricionales	81
1.1- Consumo de alimento e ingesta energética	81
1.2- Ganancia de peso y composición corporal	81
1.3- Peso de tejidos	83
2. Test de tolerancia oral a la glucosa	84
3. Parámetros lipídicos	87
3.1- Concentración de triacilglicéridos y colesterol en suero	87
3.2- Perfil de ácidos grasos en suero	88
3.3- Contenido de triacilglicéridos y colesterol en hígado	90
3.4- Perfil de ácidos grasos en hígado	93
3.5- Flujo a través de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico en hígado	96
3.6- Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal	100
3.7- Actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio	103
4. Parámetros asociados a la regulación de los triacilglicéridos hepáticos	104
4.1- Lipogénesis en hígado	104
4.1.1- Actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa	104
4.1.2- Expresión de enzimas y reguladores de la síntesis de lípidos en hígado	105
4.2- Secreción hepática in vivo de TAG-pre- β -lipoproteínas	106
4.3- Oxidación de ácidos grasos	107
4.3.1- Actividad de la enzima CPT-1a	107
4.3.2- Expresión de enzimas y reguladores de la oxidación de lípidos en hígado	107
4.4- Proteínas transportadoras de ácidos grasos en hígado	109

5. Marcadores de daño hepático	110
5.1- Transaminasas hepáticas	110
5.2- Estado de lipoperoxidación hepático	111
6. Histología	112
DISCUSIÓN	118
1. Modelo experimental	118
1.1- Dietas <i>high-fat</i> y ganancia de peso	121
1.2- Perfil de AG suero y TAE	123
1.3- Utilización de la glucosa	125
2. Análisis histológico	127
2.1- TAG y esteatosis hepática	127
2.2- Análisis de la progresión del NAFLD	133
2.3- Estrés oxidativo	136
2.4- Transaminasas circulantes	137
3. Regulación de lípidos hepáticos	139
3.1- Perfil de AG hepáticos	139
3.2- Regulación de triacilglicéridos hepáticos	143
3.2.1- Captación de AG	144
3.2.2- Lipogénesis <i>de novo</i>	147
3.2.3- Secreción de VLDL-TAG	148
3.2.4- Oxidación de AG	149
CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFÍA	159

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	ácido araquidónico
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ACOX	acil-CoA oxidasa
AG	ácidos grasos
AGL	ácidos grasos libres
ALA *	ácido α -linolénico (por su nombre en inglés: <i>α-linolenic acid</i>)
ALT	alanina aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
CD36 *	translocasa de ácidos grasos (por su acrónimo del inglés <i>cluster of differentiation 36</i>)
CEHC	2,7,8-trimetil-2-(β -carboxietil)-6-hidroxichromanol
Col	colesterol
CPA *	área ocupada por colágeno (por su nombre en inglés: <i>collagen proportionate area</i>)
CPT-1	carnitina palmitoil transferasa-1
DD	destilados de desodorización
DGLA *	ácido dihomo- γ -linolénico (por su nombre en inglés: <i>dihomo-γ-linolenic acid</i>)
DHA *	ácido docosahexanóico (por su nombre en inglés: <i>docosahexaenoic acid</i>)
ECNT	enfermedades crónicas no transmisibles
EPA*	ácido eicosapentanóico (por su nombre en inglés: <i>eicosapentaenoic acid</i>)
FAS *	sintasa de ácidos grasos (por su nombre en inglés: <i>fatty acids synthase</i>)
FATP *	proteína transportadora de ácidos grasos (por su nombre en inglés: <i>fatty acids transport protein</i>)
FE	fitoesteroles
GLA *	ácido γ -linolénico (por su nombre en inglés: <i>γ-linolenic acid</i>)

HCC *	carcinoma hepatocellular (por su nombre en inglés: <i>hepatocellular carcinoma</i>)
IR	insulino-resistencia
LA *	ácido linoléico (por su nombre en inglés: <i>linoleic acid</i>)
LC-PUFA *	ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (por su nombre en inglés: <i>long chain polyunsaturated fatty acids</i>)
LD	Gotas lipídicas (por su nombre en inglés: <i>lipid droplets</i>)
LDL *	lipoproteína de baja densidad (por su nombre en inglés: <i>low-density lipoprotein</i>)
LPL	lipoproteína lipasa
MAFLD *	enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (por su nombre en inglés: <i>metabolic associated fatty liver disease</i>)
Mttp *	proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (por su nombre en inglés: <i>microsomal triglyceride transfer protein</i>)
MUFA *	ácidos grasos monoinsaturados (por su nombre en inglés: <i>monounsaturated fatty acids</i>)
NAFLD *	enfermedad del hígado graso no alcohólico (por su nombre en inglés: <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NASH *	esteatohepatitis no alcohólica (de su nombre en inglés: <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>)
OA *	ácido oléico (de su nombre en inglés: <i>oleic acid</i>)
PPAR *	receptor que activa la proliferación de peroxisomas (por su nombre en inglés: <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>)
PUFA *	ácidos grasos poliinsaturados (por su nombre en inglés: <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
SFA *	ácidos grasos saturados (de su nombre en inglés: <i>saturated fatty acids</i>)
SREBP *	proteína de unión al receptor de respuesta a esteroides (por su nombre en inglés: <i>sterol regulatory element binding protein</i>)
TAE	tejido adiposo epididimal
TAG	triacilglicéridos
TAR	tejido adiposo retroperitoneal
TF	tocoferoles

TP	triada portal
TTP *	proteína de transferencia hepática de alfa tocoferol (por su nombre en inglés: <i>tocopherol transfer protein</i>)
VC	vena central
VLDL *	lipoproteínas de muy baja densidad (de su nombre en inglés: <i>very low density lipoprotein</i>)

*En inglés, debido a su reconocido empleo como acrónimo.

Resumen

Y

Abstract

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), está convirtiéndose rápidamente en una de las enfermedades hepáticas crónicas más comunes, afectando entre un 20-30% de la población mundial. La misma se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática (acumulación anormal de triglicéridos -TAG-), en ausencia de causas secundarias de acumulación de lípidos hepáticos. Esta acumulación de TAG hepáticos, puede darse por distintas condiciones de estrés, como pueden ser: un cuadro de obesidad, dislipemias, o la ingesta de un alto contenido de grasas y/o carbohidratos. En este sentido, tanto el tipo, como la cantidad de grasa dietaria, pueden tener un gran impacto tanto en el desarrollo, como en la prevención de las diferentes formas de expresión de esteatosis hepática, incluyendo NAFLD.

En virtud de los efectos bioactivos de ciertos lípidos dietarios, surge el concepto de “Lípidos Funcionales”, los cuales poseen la potencialidad de influir en la salud humana, reduciendo el riesgo de enfermedades y mejorando la calidad de vida. Dentro de los diversos lípidos funcionales, se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los Tocoferoles (TF) y Fitosteroles (FE). Desde el punto de vista nutricional, los ácidos grasos (AG): linoleico (LA) y α -linolénico (ALA), son considerados esenciales, ya que estos no pueden ser sintetizados por el organismo y por este motivo, deben ser incorporados a partir de la dieta. Estos PUFA han demostrado tener diversas funciones benéficas para la salud, asociadas a la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la NAFLD. Particularmente el ALA, perteneciente a la familia de los PUFA n-3, así como también sus productos finales de biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga (LC-PUFA): ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) se han asociado con una mayor oxidación de AG, efectos anti-inflamatorios y mejoras en la resistencia insulínica.

Los TF son una familia de 4 compuestos (α , β , γ y δ) lipofílicos naturales, conocidos principalmente por su potente actividad antioxidante. Mientras que los FE son compuestos que presentan una estructura química similar al colesterol, con múltiples efectos benéficos para la salud, como: reducción del colesterol sérico, actividad antiinflamatoria y antioxidante. A su vez, tanto los TF, como los FE, están presentes naturalmente en los aceites vegetales; pero durante una de las etapas de refinamiento industrial de aceites comestibles, conocida como “desodorización”, una gran parte de estos compuestos bioactivos son removidos. Esta fracción extraída durante el proceso de refinamiento del aceite se puede recolectar como “destilado de

desodorización" (DD), los cuales constituyen una fuente rica y económica para la obtención de diversos lípidos funcionales.

Dada las propiedades benéficas de los PUFA n-3, TF y FE, y su rol potencial en la prevención de ECNT como la NAFLD; en el presente trabajo de tesis se optó por investigar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en el potencial efecto preventivo de una combinación sinérgica de lípidos funcionales compuesta por aceite de lino y destilados de desodorización (DD) purificados de aceite de girasol sobre el desarrollo de hígado graso no alcohólico (NAFLD), y sus alteraciones asociadas, en un modelo animal de ratas alimentadas con dietas ricas en grasas.

Para lograr los objetivos generales y específicos en el diseño experimental se emplearon ratas Wistar machos jóvenes, las que fueron aleatoriamente divididas en 7 grupos dietarios. En función de las variables experimentales: 1) nivel de grasa (7 ó 30% -p/p-), 2) tipo de grasa (Soja -S-, Maíz -M- y Lino -L-), y 3) suplementación o no con DD, se conformaron los siguientes grupos dietarios: S7, S30, M30, L30, S30DD, M30DD y L30DD. Durante el tratamiento dietario (60 días) se evaluaron parámetros nutricionales de seguimiento, y al final del mismo las investigaciones principalmente se centraron en el estudio de niveles plasmáticos y tisulares de lípidos; las actividades y expresiones de enzimas claves en la regulación de la biosíntesis *de novo* y β -oxidación de AG; expresión génica de transportadores de AG; velocidad de secreción hepática y remoción plasmática de TAG; biosíntesis LC-PUFA; niveles de glucosa y utilización de la glucosa; lipoperoxidación hepática; y estudios histológicos de hígado.

Los resultados del presente trabajo de tesis, muestran que los animales alimentados con una dieta rica en grasas (S30 vs S7) presentaron un incremento en la ingesta energética, que se vio reflejado en un incremento tanto en la ganancia de peso corporal, como del peso total del tejido adiposo retroperitoneal (TAR). A su vez, el incremento de los niveles de grasa dietarios, llevaron al aumento de los niveles basales de glucosa sérica, junto a una menor tolerancia frente a una sobrecarga de glucosa.

A nivel hepático, el aumento de los niveles de grasa dietaria (S30 vs S7), produjo un incremento del contenido de TAG, junto con la aparición de esteatosis macro- y microvesicular, y hepatocitos balonizados. Este incremento en los TAG hepáticos estuvo asociado a una alta afluencia de AG dietarios y a una baja remoción periférica de TAG (mediada por la LPL de TA y músculo gastrocnemio), sin una respuesta compensatoria de la secreción de VLDL-TAG, y/o de la β -oxidación de AG.

Notoriamente, las dietas conteniendo 30% (p/p) de aceite de lino, en ausencia como en presencia de DD (grupos L30 y L30DD), lograron prevenir el incremento de peso corporal observado en S30, M30, S30DD y M30DD; y mostraron los menores niveles tanto de peso del TAR, como de tejido adiposo epididimal (TAE). A su vez, ambos grupos tratados con aceite de lino mostraron los menores valores de glucosa basal y glucosa post-sobrecarga a los 180 min del TTOG, alcanzando niveles similares a los del grupo control (S7). Estos valores, llevaron a que los animales tratados con aceite de lino presenten una mejor utilización de la glucosa, reflejada por los reducidos valores del área bajo la curva (AUC) durante TTOG.

Los grupos S30, M30, S30DD y M30DD mostraron una acumulación de TAG hepáticos asociado a esteatosis macro- y microvesicular, y presencia de hepatocitos balonizados. En los grupos M30 y M30DD se observó una esteatosis mucho más pronunciada, junto a un incremento del peso del hígado (hepatomegalia), e inflamación leve. Por el contrario, los grupos L30 y L30DD lograron prevenir el incremento de los TAG hepáticos observado en las demás dietas ricas en grasas, mostrando una microesteatosis muy leve, en ausencia de macroesteatosis lipídicas y hepatocitos balonizados.

Los efectos benéficos observados en los animales tratados con aceite de lino, pueden relacionarse con una mayor β -oxidación a nivel hepático, dada por la mayor actividad CPT-1a, y un incremento en los niveles de ARNm de *Cpt-1a*, *Ppara* y *CyP4a*. Los resultados observados en L30 y L30DD sugieren que los altos niveles de ALA, junto con la baja relación PUFA n-6/n-3 de estas dietas, indujeron una mayor β -oxidación, previniendo el desarrollo de esteatosis, a diferencia de los demás grupos ricos en grasas. Por último, la suplementación con DD mostró efectos benéficos: a nivel de la β -oxidación, incrementando los niveles de ARNm de *Ppara* y *Cpt-1a*; redujo los niveles de colesterol hepático (tanto libre como total); redujo los niveles de TBARS; y mostró un leve incremento en los niveles de secreción de VLDL-TAG.

En conclusión, el aceite de lino virgen, suplementado o no con TF y FE, previno eficazmente la esteatosis hepática y la hepatomegalia inducidas por las dietas HF. Este efecto benéfico se atribuye principalmente a los altos niveles de ALA dietarios, más que a la suplementación con TF y FE. Los mecanismos involucrados en la prevención de la esteatosis hepática podrían estar relacionados a la mayor bioconversión e incorporación de EPA y DHA en el hígado, lo que conducirían a una incrementada β -oxidación hepática. Adicionalmente, la suplementación del aceite de lino con TF y FE promovió la expresión de genes relacionados con la β -oxidación. Estos hallazgos respaldan el uso potencial de lípidos funcionales, como aceites

ricos en PUFA n-3, TF y FE derivados de fuentes vegetales, como alternativas para el tratamiento dietario de la NAFLD y sus alteraciones metabólicas asociadas.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is rapidly becoming one of the most common chronic liver diseases, affecting between 20-30% of the global population. It is characterized by the presence of hepatic steatosis (abnormal accumulation of triglycerides -TAG-), in the absence of secondary causes of hepatic lipid accumulation. This accumulation of hepatic TAG can occur due to various stress conditions, such as obesity, dyslipidemia, or the intake of a high content of fats and/or carbohydrates. In this regard, both the type and amount of dietary fat can have a significant impact on the development and prevention of different forms of hepatic steatosis, including NAFLD.

Due to the bioactive effects of certain dietary lipids, the concept of "Functional Lipids" arises, which have the potential to influence human health by reducing the risk of diseases and improving quality of life. Among the various functional lipids are polyunsaturated fatty acids (PUFA), Tocopherols (TF), and Phytosterols (FE). From a nutritional point of view, the fatty acids (FA): linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (ALA), are considered essential, as they cannot be synthesized by the body and must therefore be incorporated from the diet. These PUFA have been shown to have various beneficial functions for health, associated with the prevention of non-communicable chronic diseases (NCDs) such as NAFLD. Particularly ALA, belonging to the n-3 PUFA family, as well as its final biosynthesis products of long-chain fatty acids (LC-PUFA): eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have been associated with increased FA oxidation, anti-inflammatory effects, and improvements in insulin resistance.

TF are a family of 4 lipophilic natural compounds (α , β , γ , and δ), primarily known for their potent antioxidant activity. While FE are compounds that have a chemical structure similar to cholesterol, with multiple beneficial effects on health, such as: reduction of serum cholesterol, antiinflammatory, and antioxidant activity. Both TF and FE are naturally present in vegetable oils; however, during one of the stages of industrial refining of edible oils, known as "deodorization," a large part of these bioactive compounds is removed. This fraction extracted during the oil refining process can be collected as "deodorization distillate" (DD), which constitutes a rich and economical source for obtaining various functional lipids.

Given the beneficial properties of n-3 PUFA, TF, and FE, and their potential role in the prevention of NCDs such as NAFLD; in the present thesis work it has been chosen to investigate the biochemical and molecular mechanisms involved in the potential preventive effect of a synergistic combination of functional lipids composed of flaxseed oil and deodorization distillates (DD) purified from sunflower oil on the development of non-alcoholic fatty liver (NAFLD), and its associated alterations, in an animal model of rats fed high-fat diets.

To achieve the general and specific objectives in the experimental design, young male Wistar rats were employed, which were randomly divided into 7 dietary groups. Based on the experimental variables: 1) fat level (7 or 30% -w/w-), 2) fat source (Soy -S-, Corn -M-, and Flax -L-), and 3) supplementation or not with DD, the following dietary groups were formed: S7, S30, M30, L30, S30DD, M30DD, and L30DD. During the dietary treatment (60 days) nutritional parameters were evaluated, and at the end of the treatment, the studies have been mainly focused on the investigation of plasma and tissue lipid levels; activities and expressions of key enzymes in the regulation of *de novo* biosynthesis and β -oxidation of FA; gene expression of FA transporters; hepatic secretion rate and plasma removal of triglycerides (TAG); LC-PUFA biosynthesis; glucose levels and glucose utilization; hepatic lipid peroxidation; and liver histological studies.

The results of this thesis work show that animals fed a high-fat diet (S30 vs. S7) presented an increase in energy intake, which was reflected in an increase in both body weight gain and total retroperitoneal adipose tissue (TAR) weight. In turn, the increase in dietary fat levels led to an increase in baseline levels of serum glucose, along with lower glucose tolerance.

At the hepatic level, the rise in dietary fat levels (S30 vs. S7) resulted in an increase in TAG content, along with the appearance of macro- and microvesicular steatosis, and ballooned hepatocytes. This increase in hepatic TAG was associated with a high influx of dietary FAs and a low peripheral removal of TAG (mediated by LPL of TA and gastrocnemius muscle), without a compensatory response of VLDL-TAG secretion and/or FA β -oxidation.

Regarding diets containing 30% (w/w) flaxseed oil, in the absence or presence of DD (L30 and L30DD groups), prevented the increase in body weight observed in S30, M30, S30DD, and M30DD; and showed the lowest levels of both TAR weight and epididymal adipose tissue (TAE). In turn, both groups treated with flaxseed oil showed the lowest baseline glucose values and post-overload glucose at 180 min of the oral glucose tolerance test (OGTT), reaching levels similar to those of the control group (S7). These values led to animals treated with flaxseed oil showing

better glucose utilization, reflected by the reduced values of the area under the curve (AUC) during OGTT.

Groups S30, M30, S30DD, and M30DD showed an accumulation of hepatic TAG associated with macro- and microvesicular steatosis, and presence of ballooned hepatocytes. In the M30 and M30DD groups, a much more pronounced steatosis was observed, along with an increase in liver weight (hepatomegaly), and mild inflammation. On the contrary, the L30 and L30DD groups prevented the increase in hepatic TAG observed in the other high-fat diets, showing very mild microsteatosis, in the absence of lipid macrosteatosis and ballooned hepatocytes.

The beneficial effects observed in animals treated with flaxseed oil can be related to increased hepatic β -oxidation, given by the higher CPT-1a activity, and an increase in mRNA levels of *Cpt-1a*, *Ppara*, and *Cyp4a*. The results observed in L30 and L30DD suggest that the high levels of ALA, along with the low n-6/n-3 PUFA ratio of these diets, induced increased β -oxidation, preventing the development of steatosis, unlike the other high-fat groups. Finally, supplementation with DD showed beneficial effects: on β -oxidation, increasing mRNA levels of *Ppara* and *Cpt-1a*; reducing hepatic cholesterol levels (both free and total); reducing TBARS levels; and showing a slight increase in VLDL-TAG secretion levels.

In conclusion, virgin flaxseed oil, supplemented or not with TF and FE, effectively prevented HF diet-induced hepatic steatosis and hepatomegaly. This beneficial effect is mainly attributed to the high levels of dietary ALA, rather than supplementation with TF and FE. The mechanisms involved in the prevention of hepatic steatosis may be related to increased bioconversion and incorporation of EPA and DHA into the liver, leading to increased hepatic β -oxidation. Additionally, supplementation of flaxseed oil with TF and FE promoted the expression of genes related to β -oxidation. These findings support the potential use of functional lipids, such as n-3 PUFA-rich oils, TF, and FE derived from plant sources, as alternatives for the dietary treatment of NAFLD and its associated metabolic alterations.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Lípidos dietarios y Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT)

1.1- Lípidos dietarios y sus efectos en la salud

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), son enfermedades de larga duración y generalmente lenta progresión. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuatro tipos principales de ECNT son: enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes mellitus y cáncer (Alwan, 2011); y tienen principalmente las 3 primeras, una alta relación con el sobrepeso y la obesidad. Las ECNT son la principal causa de muerte en el mundo (Alwan et al., 2010) y representan alrededor de 40 millones de muertes al año, lo que equivale al 70% de todas las muertes en todo el mundo (Islam et al., 2014). En Argentina, son responsables del 73,4% de las muertes, del 52% de los años de vida perdidos por muerte prematura, y del 76% de los años de vida ajustados por discapacidad, acompañando la tendencia mundial. Sus factores de riesgo atribuibles explican 3 de cada 4 muertes por enfermedades no transmisibles, y comparten problemáticas y estrategias comunes de prevención y control (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, 2018).

El papel importante de la nutrición para la prevención y/o desarrollo de las ECNT es bien conocido. Una nutrición inadecuada, ya sea por déficit, sobrealimentación y/o desequilibrios de nutrientes pueden tener graves consecuencias (Egger & Dixon, 2014). En referencia a la sobrealimentación, durante años el énfasis comunicacional se centró en equilibrar la ingesta de calorías con el gasto energético y disminuir la grasa en la dieta. Así, durante varias décadas se recomendó reducir la grasa dietética total para disminuir la ingesta calórica, y al mismo tiempo minimizar el consumo de grasas saturadas (Department of Health and Human Services (DHHS), 1985). En este sentido, por la década de los '80, se recomendaron dietas bajas en grasas y altas en carbohidratos con el fin de inducir una pérdida de peso y disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El enfoque en la reducción de la grasa total resultó en un mayor consumo de carbohidratos refinados y azúcares simples, y redujo la ingesta de alimentos ricos en ácidos grasos (AG) insaturados saludables, como aquellos provenientes de frutos secos, semillas y aceites vegetales. Esto condujo finalmente a un aumento en la palatabilidad de los alimentos, un incremento del consumo de los mismos, y finalmente un aumento de la tasa de obesidad en ciertos países como los Estados Unidos (Austin et al., 2011; Ogden et al., 2014). A nivel global, en 2016 el 39% de los adultos tenían sobrepeso, y el 13% eran obesos. En forma muy

preocupante, la prevalencia de sobrepeso y obesidad se trasladó a los niños y adolescentes (de 5 a 19 años), incrementando así del 4% en 1975 a más del 18% en 2016. Según la 4ta Encuesta Nacional de Factores de Riesgo de la Argentina, 6 de cada 10 adultos presentaron exceso de peso (sobrepeso + obesidad). Dentro de los individuos con exceso de peso, según el índice de masa corporal, 3 de cada 10 individuos registraron sobrepeso, y en otros 3 de cada 10 se evidenció obesidad. De esta manera, se registró obesidad en un cuarto de la población nacional, indicador que aumentó un 22% respecto del 2013 y un 74% respecto del 2005 (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, 2018).

La grasa dietaria puede tener un gran impacto en la salud, tanto en la prevención, como así también en el desarrollo de las ECNT. Es reconocida su importancia en el crecimiento y desarrollo, como también en el mantenimiento de la salud. Además de ser los nutrientes con la mayor densidad energética (Freedman & Bagby, 1989), vehiculizan vitaminas liposolubles, pigmentos carotenoides y esteroides. Como componentes estructurales celulares tienen un rol fundamental en funciones de membranas, tales como permeabilidad, transporte y actividades enzimáticas (Segré et al., 2001). Aportan colesterol (Col), precursor de ácidos biliares, hormonas y una clase importante de moléculas de señalización intra- y extracelulares (Jump, 2011; Nadal Jimenez et al., 2012). Además, son fuente de ácido linoleico (LA) y ácido α -linolénico (ALA), que tienen el carácter de esenciales (Burr & Burr, 1929), ya que no pueden ser sintetizados por el organismo.

1.2- Lípidos Funcionales

Se considera como alimento funcional a todo alimento que, además de su valor nutritivo, contiene componentes biológicamente activos que aportan algún efecto añadido benéfico para la salud, y reducen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. Desde el punto de vista práctico, los alimentos funcionales pueden ser naturales, o alimentos a los que se les ha añadido, incrementado o eliminado el contenido de alguno de sus componentes (Beltrán, 2016). Estos compuestos biológicamente activos que convierten a los alimentos en funcionales son también comúnmente llamados "compuestos bioactivos". En la actualidad, ha cobrado gran relevancia el estudio de los compuestos bioactivos presentes en diversas fuentes alimentarias por su importancia en salud humana.

Si bien no existe una definición por consenso de lípidos funcionales, se pueden definir como un subconjunto de alimentos funcionales, que se consideran similares en apariencia a los alimentos convencionales consumidos como parte de una dieta habitual; pero que han

demostrado tener beneficios fisiológicos sobre la reducción del riesgo de ECNT, más allá de sus funciones nutricionales básicas (Moreau, 2011). Los lípidos funcionales se han relacionado con la prevención y el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, incluyendo: obesidad, hipertensión arterial, diabetes, depresión, síndrome metabólico, etc (Alabdulkarim et al., 2012; Nagao & Yanagita, 2015). Se ha demostrado que son eficaces, fáciles de conseguir y económicos para su inclusión en la cadena alimentaria/dieta (Alabdulkarim et al., 2012).

Dentro de los lípidos funcionales, se encuentran AG funcionales como los ácidos grasos poliinsaturados (o de su acrónimo en inglés, PUFA), triacilglicéridos (TAG) con AG de cadena media, AG de cadena corta (Ácido Propiónico, Butírico y Pentanoico), AG conjugados (conjugados del ácido linoleico -CLA-, conjugados del ácido linoléico -CLNA-), Glicerolípidos, Fosfolípidos, Tocoferoles (TF), Fitoesteroles (FE), Carotenos y Carotenoides, lípidos estructurados, entre otros (Alabdulkarim et al., 2012). En los últimos años se ha valorizado el aceite de lino y los destilados de desodorización de aceites por el aporte fundamentalmente de compuestos naturales como: ALA, TF y FE. Específicamente, el aceite de lino se caracteriza por ser uno de los aceites vegetales más rico en ALA, además del aporte de otros compuestos funcionales. Asimismo, tendencias actuales sobre economía circular y mantenimiento del ecosistema propendieron al aprovechamiento y agregado de valor, entre otros, de subproductos y residuos industriales ricos en compuestos bioactivos, dando lugar a la obtención de TF y FE a partir de productos secundarios de la industria aceitera.

1.2.1- Ácidos Grasos Poliinsaturados

Tanto el LA como el ALA, entran dentro del grupo de los PUFA. Debido a su preferencial metabolismo y oxidación, los PUFA dietarios influyen en la composición corporal, reduciendo el riesgo de obesidad (Gillingham et al., 2011), así como también, disminuyen el riesgo de ciertos tipos de cáncer (Binukumar & Mathew, 2005; Comba et al., 2010; Costa et al., 2011), y protegen contra el deterioro cognitivo relacionado con la edad y la enfermedad de Alzheimer (López-Miranda et al., 2010). Los PUFA han demostrado tener diversas funciones fisiológicas de relevancia en la salud, tales como: regulación del nivel de lípidos plasmáticos, efectos benéficos sobre la función cardiovascular e inmune, acción de la insulina y desarrollo de la función neuronal y visual. La ingesta de PUFA impacta en gran medida sobre la mayoría de las células corporales, alterando la composición de membranas, la síntesis de eicosanoides, y regulación de la expresión de diversos genes. La respuesta celular a los cambios en la composición de PUFA

está dada por el metabolismo lipídico celular específico, como así también, por la expresión de los factores reguladores de la transcripción de AG.

La importancia del LA y ALA, desde el punto de vista nutricional, radica no sólo en las funciones fisiológicas que ambos AG cumplen sobre distintas funciones metabólicas, sino también en que ambos son precursores para la síntesis de PUFA de cadena larga (LC-PUFA). La síntesis de LC-PUFA (**Figura 1**), ocurre principalmente en el hígado, aunque también, en menor medida, en otros tejidos. La vía de síntesis consiste en una secuencia alternativa de pasos de elongación y desaturación catalizados por elongasas de AG y las $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas (Gibson et al., 2011, 2013).

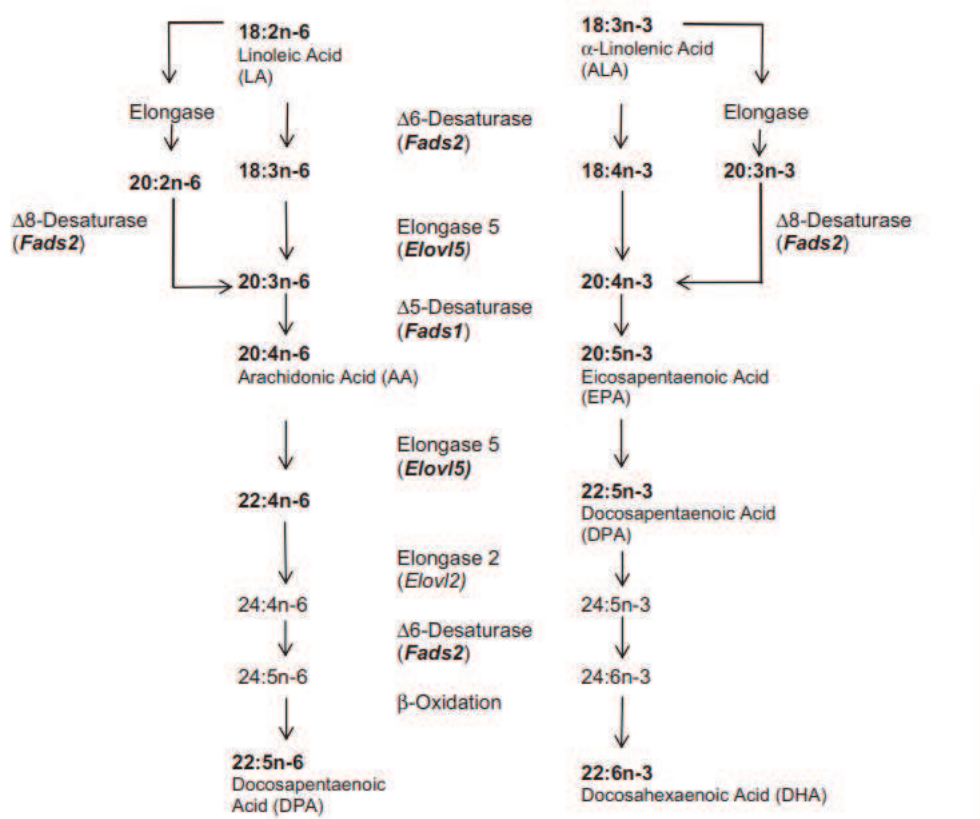


Figura 1: Vía de síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga de la familia n-3 y n-6. Extraído de: Haghighi, F., Galfalvy, H., Chen, S., Huang, Y. Y., Cooper, T. B., Burke, A. K., & Sublette, M. E. (2015). DNA methylation perturbations in genes involved in polyunsaturated Fatty Acid biosynthesis associated with depression and suicide risk. *Frontiers in neurology*, 6, 92.

El LA pertenece a la familia de los PUFA n-6 y, por lo tanto, funciona como un precursor para la síntesis de LC-PUFA n-6, entre los que se destaca el ácido araquidónico (AA). De la

misma manera, el ALA corresponde a la familia PUFA n-3, por lo que dará origen a los LC-PUFA n-3, entre los cuales se destacan el ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).

Es importante resaltar que los numerosos efectos benéficos que ejercen tanto los PUFA, como los LC-PUFA, dependen de su familia de origen: 1) Los LC-PUFA de las familia n-3 y n-6 tienen efectos hipotensores 2) ambos influyen fuertemente sobre la expresión de genes, siendo los LC-PUFA n-3 potentes activadores de los receptores que activan la proliferación de peroxisomas (PPAR), induciendo la oxidación de AG y la supresión de la síntesis de AG y TAG, 3) los LC-PUFA n-3 tienen un potente efecto anti-inflamatorio, mientras que los PUFA n-6 son pro-inflamatorios, 4) los derivados de la familia n-3 poseen efectos antitrombóticos, mejoran la hiperinsulinemia y resistencia insulínica, 5) los eicosanoides derivados de los LC-PUFA n-3 se han asociado a una disminución del crecimiento de células tumorales y metástasis, mientras que un efecto inverso ha sido observado con los derivados de los LC-PUFA n-6, 6) los LC-PUFA, principalmente el DHA se correlaciona con las sinapsis de tejidos neuronales, son importantes en la formación de nuevos tejidos y los derivados de la familia n-6 tienen una alta implicancia en el crecimiento y desarrollo. En función de lo mencionado anteriormente, es necesario destacar que los niveles y la relación de PUFA n-3 y n-6 poseen un significativo impacto en el desarrollo o prevención de alteraciones comunes a las ECNT (Benatti et al., 2004; Calvani & Benatti, 2003; Simopoulos, 1999).

La evolución histórica de la ingesta de lípidos en el humano describe la existencia de un equilibrio entre la ingesta de n-3 y n-6 durante miles de años, debido a dietas principalmente basadas en la agricultura, donde la relación n-6/n-3 era aproximadamente 1:1 (Simopoulos, 1999). En los últimos 100 años, la dieta humana ha sufrido grandes cambios debido tanto a modificaciones en el suministro de alimentos, como en los hábitos dietéticos. El seguimiento de las nuevas recomendaciones dietéticas, las cuales promueven el reemplazo de los ácidos grasos saturados (SFA) por AG insaturados, llevó al incremento del consumo de aceites vegetales, especialmente aceites de soja, maíz y girasol (aceites con altos contenidos de LA), en reemplazo de las grasas animales (Chilton et al., 2014). Como consecuencia de estos cambios en los hábitos alimenticios, la cantidad de n-6 consumida aumentó en gran medida, elevando así la relación LA/ALA a valores de 15:1-20:1, muy alejados de los recomendados (Chilton et al., 2014; Husted & Bouzinova, 2016).

Por estos motivos resulta de especial importancia incrementar la ingesta de n-3 dietarios. Los valores de ingesta recomendados son los siguientes: 0,5% de la ingesta energética para

ALA y 4% de la ingesta energética para LA. Sin embargo, los efectos positivos del ALA se observan para valores superiores a los recomendados (0,6%-1% de la ingesta energética) (Lenighan et al., 2019).

El pescado y las verduras son las principales fuentes dietéticas de PUFA n-3. Por ejemplo, los pescados grasos de aguas profundas como la sardina, el atún, la trucha, la caballa y el arenque son ricos en LC-PUFA n-3 (Meyer et al., 2003). El EPA y DHA son más frecuentes en los pescados grasos; de hecho, los suplementos de aceite de pescado suelen contener entre un 30% y un 50% de AG n-3 (Russo, 2009). Sin embargo, la contaminación del mar con metales tóxicos como el arsénico y el mercurio, han puesto reparos sobre el consumo de pescados de ciertas fuentes marinas dado el posible riesgo para la salud del consumidor en caso de ingestas significativas. Por otro lado, estos aceites poseen un fuerte sabor a pescado, lo cual reduce su aceptabilidad; sumado a la imposibilidad de incorporación en dietas vegetarianas y veganas (Timilsena et al., 2017). Numerosas campañas han tenido como objetivo incrementar la ingesta de pescado en la población, sin embargo, las mismas no han resultado efectivas debido a la dificultad para conseguir pescado fresco en regiones alejadas del mar, su bajo rendimiento como alimento (ya que en su preparación no se aprovechan la cabeza, cola, vísceras, etc.), la "baja sociedad generada" y el elevado costo en comparación con otras carnes (pollo, cerdo, pavo) (Valenzuela & Valenzuela, 2014).

Por estos motivos, han ido ganando cada vez más atención las fuentes vegetales ricas en PUFA n-3. En relación a esto, a pesar de que existen múltiples aceites vegetales ricos en ácido oleico (OA) y LA, cómo el aceite de maíz, soja, cártamo y girasol; los aceites vegetales ricos en n-3 son minoría (Turchini et al., 2010). Dentro de los aceites vegetales, el aceite de lino (*Linum usitatissimum*) es uno de los aceites vegetales con mayor contenido de PUFA n-3 (Stuchlík & Stanislav, 2002).

1.2.2- Tocoferoles

Vitamina E es un término que engloba a 8 compuestos lipofílicos naturales con potente efecto antioxidante, en los que se incluyen cuatro tocoferoles (α , β , γ y δ) y cuatro tocotrienoles (α , β , γ y δ); siendo el α -TF, la forma más abundante y con mayor actividad biológica en la naturaleza (Brigelius-flohe & Traber, 1999). Los cuatro tipos de TF difieren en el número y/o la posición de los grupos metilo unidos al anillo bencénico (**Figura 2**). La actividad antioxidante de estos compuestos se debe principalmente a su capacidad para donar sus hidrógenos unidos al anillo fenólico a los radicales libres lipídicos, estabilizándose por resonancia.

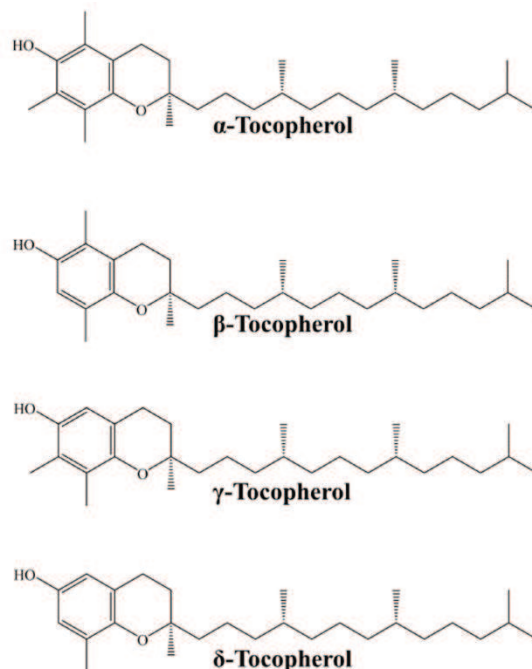


Figura 2: Estructura química de los distintos tocoferoles. Extraído de: Husain K., Malafa M. P., "Role of Tocotrienols in Chemosensitization of Cancer". *Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization*, 2018, (2), 77-97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812373-7.00004-8>.

La vitamina E se absorbe en el intestino y, junto a los demás componentes hidrofóbicos de la dieta, se incorpora a los quilomicrones. En este paso, se ha demostrado que la captación intestinal de los distintos TF no es selectiva, sino que todos son absorbidos e incorporados a los quilomicrones por igual. Luego de entrar en la circulación, a través del conducto linfático torácico, la vitamina E remanente asociada a los quilomicrones llega al hígado. Posterior a este paso, es cuando aparece preferentemente el α -TF en plasma, lo cual se debe a la mayor afinidad de la proteína hepática de transferencia de α -TF (α -TTP), por este tocoferol en particular (Hosomi et al., 1997; Traber et al., 2005). Una vez llegado al hígado el α -TF, se incorpora selectivamente a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mediante la α -TTP y se vuelve a secretar al torrente sanguíneo (Sato et al., 1993). Posteriormente, las lipoproteínas endógenas que contienen apoB, como las VLDL y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), intercambian α -TF con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Así, las LDL y las HDL son las principales portadoras de α -TF en la circulación.

Si bien el α -TF es el principal responsable de los efectos benéficos observados en la salud, el γ -TF es la forma más abundante de vitamina E en la dieta occidental (Jiang et al., 2001). Esto se debe al uso generalizado de aceites de maíz y soja, donde el γ -TF representa aproximadamente entre el 60%-70% del contenido de vitamina E consumida (McLaughlin &

Weihrauch, 1979). A pesar de su mayor abundancia en la dieta, la concentración sérica de γ -TF es entre 4-10 veces menor que la de α -TF (Jiang et al., 2001). Sin embargo, contrario a lo que sucede en suero, el γ -TF constituye alrededor del 30-50% de la vitamina E total en piel, músculo, venas y tejido adiposo (TA) humano (Burton et al., 1998).

Estas diferencias en la distribución γ -TF se deben en gran medida, a su metabolismo a nivel hepático. El γ -TF se metaboliza en gran medida a través de la ω -hidroxilación y oxidación iniciadas por el citocromo P₄₅₀ (CYP_{4F2}) en el retículo endoplasmático, seguida de la β -oxidación de su cadena alifática en el peroxisoma y la mitocondria, dando origen a su forma hidrofílica, el 2,7,8-trimetil-2-(β -carboxietil)-6-hidroxichromanol (γ -CEHC) (Jiang et al., 2022). Este metabolito del γ -TF se ha encontrado principalmente en orina, y se ha demostrado que posee actividad natriurética (Wechter et al., 1996). El γ -CEHC también se ha detectado en bilis, y se ha propuesto que la excreción biliar del mismo constituye una ruta alternativa para eliminar el exceso de γ -TF dietario (Traber et al., 1992).

Muchos estudios en humanos y animales han documentado que γ -TF se metaboliza más extensamente que α -TF, lo cual fue demostrado por las mayores cantidades de γ -CEHC, respecto al α -CEHC cuantificados en heces y orina (Jiang et al., 2022). En cuanto a las demás isoformas de vitamina E (β y δ -TF), la mayor parte de estas suele ser excretada en la bilis, o no se absorben y excretan directamente en las heces (Drevon, 1991).

Tanto estudios en modelos animales como estudios preclínicos, han indicado que, en comparación con el α -TF, el γ -TF parece tener propiedades biológicas diferentes que pueden ser útiles por sí mismas para la prevención y terapia contra enfermedades crónicas (Jiang et al., 2022). Dentro de los efectos benéficos asociados al γ -TF, se ha reportado que el mismo posee actividad antioxidante (interviene en la eliminación de especies reactivas de nitrógeno) (Williamson et al., 2002), efecto protector sobre la función mitocondrial (Pahrudin Arrozi et al., 2020), inhibición de la agregación plaquetaria (Liu et al., 2003), efectos antiinflamatorios y efectos anticancerígenos en varios tipos de células cancerosas, entre otros (Jiang et al., 2022).

1.2.3- Fitoesteroles

Los FE son compuestos de origen vegetal que presentan una estructura química similar al Col. Estos compuestos cumplen funciones estructurales, formando parte de la membrana de las células vegetales, son sustratos para la síntesis de numerosos metabolitos secundarios de las plantas, y actúan como precursores biogénicos de compuestos implicados en el crecimiento vegetal (Bacchetti et al., 2011).

Los FE abundan en productos vegetales, como aceites vegetales, frutas, nueces, cereales y legumbres. En los aceites vegetales, los procesos tecnológicos utilizados para la extracción y refinamiento del aceite de frutas o semillas, influye negativamente en sus niveles de FE. Estudios revelan que una dieta occidental normal contiene entre 200 y 400 mg/día de Col y entre 200 y 400 mg/día de FE (Bacchetti et al., 2011).

Si bien se han encontrado más de 200 FE diferentes en la naturaleza, el β -sitosterol, campesterol, y estigmasterol (**Figura 3**) son los FE más comunes dentro de la dieta occidental (Bacchetti et al., 2011).

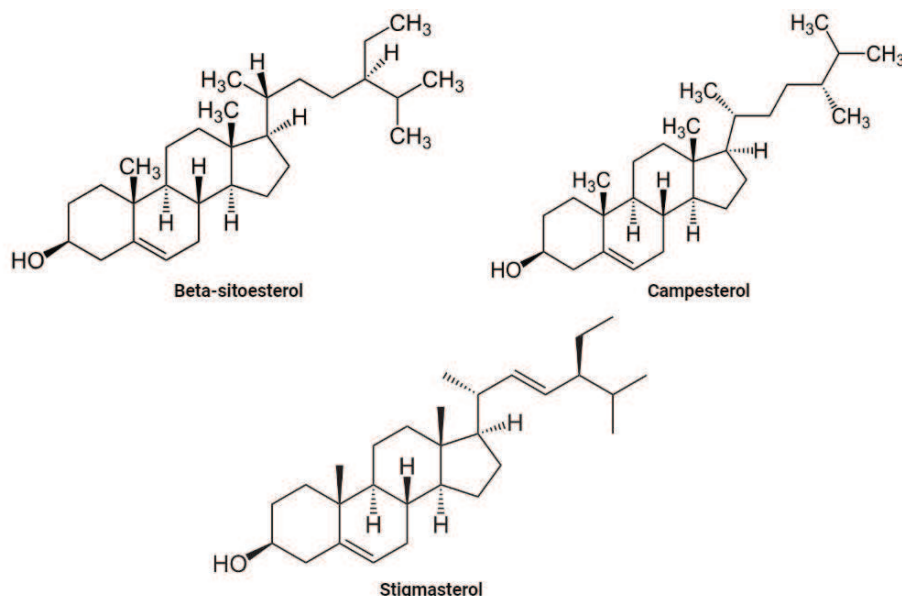


Figura 3: Estructura química de los principales fitoesteroles. Adaptado de: Matsuoka R., "Property of Phytosterols and Development of Its Containing Mayonnaise-Type Dressing". *Foods*, 2022,11(8), 1141. <https://doi.org/10.3390/foods11081141>.

Los FE compiten con el Col por su absorción en el intestino delgado, teniendo una tasa de absorción muy baja que oscila entre 0,4% y 5% del total de FE aportados por la dieta. Después

de la esterificación con acil-CoA en el enterocito, los FE se incorporan a los quilomicrones. Los FE no esterificados, se eliminan junto al contenido intestinal mediante un casete de unión a ATP. Una vez que el quilomicrón llega al sistema circulatorio, se van transfiriendo ácidos grasos libres (AGL) a los tejidos periféricos bajo la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) y así se forman los quilomicrones remanentes, que son absorbidos por el hígado (Kwan et al., 2007). Una vez en el hígado, se elimina directamente a través de la bilis. La tasa de excreción biliar de los FE es opuesta a su tasa de absorción (Bacchetti et al., 2011).

En la actualidad, dado que se conocen sus beneficios, cada vez más alimentos se fortifican con FE (Rawal et al., 2015). Varios estudios publicados en los últimos años han confirmado los efectos benéficos de estos compuestos sobre el metabolismo de los lípidos, como la reducción del Col sérico (Plat et al., 2015). Los FE también se consideran buenos candidatos para la síntesis de corticoides y hormonas. De manera similar, se ha informado del uso de estigmasterol en la preparación de corticoides y progesterona (Sampaio et al., 2015), mientras que el β -sitosterol se utiliza para la producción de estrógenos, anticonceptivos, diuréticos y hormonas masculinas (Moreau, 2004; Yang et al., 2010) han reportado que los FE poseen actividades antiinflamatorias, antiaterogénicas, anticancerígenas y antioxidantes (Yang et al., 2010).

1.3- Los destilados de desodorización como fuentes de lípidos funcionales

Los aceites vegetales extraídos de las semillas oleaginosas se encuentran, en primera instancia, en estado crudo. La mayoría de los aceites crudos, con excepción del aceite de oliva, no pueden utilizarse directamente con fines comestibles debido a que tienen un color y/u olor inaceptable para los consumidores (Naz et al., 2011, 2012), además de su inestabilidad. Esto se debe a la presencia de componentes indeseables como AGL, pigmentos, metales, gomas, ceras, fosfolípidos y materiales odoríferos, que deben eliminarse para obtener un producto estable con un sabor suave. Por lo tanto, a través de un proceso de refinamiento industrial eficiente, se busca eliminar estos componentes no deseados (Kamboh et al., 2015; Verhe et al., 2006).

Dentro de las etapas de refinamiento industrial de aceites comestibles, una de ellas es conocida como “desodorización”. La desodorización es un proceso de destilación simple, en el que se separan diversos componentes volátiles del aceite. La desodorización de aceites comestibles se realiza industrialmente en diferentes maneras (continua, semicontinua o por lotes) y con varias configuraciones de desodorizadores (recipientes horizontales o verticales, tipo bandeja o columnas empacadas). Durante este proceso, los componentes volátiles indeseados

son evaporados a gas, y posteriormente, se separan y colectan en estado líquido mediante un sistema de condensación (Sherazi et al., 2016).

Entre compuestos volátiles indeseables se incluyen: AGL, peróxidos, aldehídos, cetonas, alcoholes y carbohidratos. Sin embargo, algunos componentes bioactivos como TF, FE y escualeno también se destilan durante la desodorización y son removidos del aceite en cuestión. Esta fracción volátil extraída del aceite se recolecta y se conoce como “destilado de desodorización” (DD). Estos DD muchas veces se desechan como residuo de la industria aceitera, sin un aprovechamiento adecuado, perdiéndose así muchos componentes valiosos (Naz et al., 2011, 2012), o se comercializan a un muy bajo costo para la extracción de compuestos bioactivos. De esta manera, puede considerarse que los DD son un subproducto de bajo valor comercial, pero importante como fuente natural de compuestos bioactivos como TF, tocotrienoles, FE, hidrocarburos y escualeno, entre otros (Naz et al., 2014).

Por lo tanto, a pesar que el proceso de desodorización elimina componentes indeseados de los aceites vegetales, a partir de este mismo proceso se remueven una serie de compuestos bioactivos, que se obtienen en forma concentrada en los DD. Es por esto que los DD constituyen una fuentes rica y barata de compuestos valiosos con efectos benéficos para la salud, como TF y FE, con múltiples posibles aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria.

1.4- El aceite de lino como alimento funcional

El aceite de lino es bien reconocido por sus beneficios para la salud, los cuales se atribuyen a su composición química (Al-Madhagy et al., 2023), y por los cuales adquiere cada vez más importancia en la industria alimenticia mundial como alimento funcional (Gutte et al., 2015). Si bien, casi todas las partes de la planta de lino se utilizan para diversos fines, particularmente la semilla contiene aceite que puede ser empleado para fines comestibles (Singh et al., 2011, 2012). El Código Alimentario Argentino, por sus propiedades secantes, no incluye al aceite de lino como un aceite comestible, no obstante, el mismo se encuentra comercialmente disponible para su consumo como suplemento dietario. Uno de los atributos de la semilla de lino es que por prensado se obtiene una alta cantidad de aceite (35 - 5%), el cual a su vez se caracteriza por un 9 - 10% de SFA (palmítico y esteárico), aproximadamente un 20% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) (principalmente ácido oleico) y más de un 70% de PUFA, principalmente ALA (Al-Madhagy et al., 2023).

Además de su alto contenido de n-3, el aceite de lino posee otros compuestos con propiedades benéficas para la salud. Dentro de estos, tenemos a los TF y FE. El aceite de lino contiene aproximadamente unos 14 TF mg/100g de aceite, dentro de los cuales el 99,5% es γ -TF, y el 0.5% restante corresponde a α -TF (Gutte et al., 2015). Con respecto a la composición de FE, se detectaron 6 tipos de fitoesteros en el aceite de lino. El β -sitosterol es el isómero dominante, seguido del cicloartenol, campesterol, Δ 5-avenasterol, 2,4 metilencicloartenol y estigmasterol (Al-Madhagy et al., 2023).

Por la presencia de altos niveles de PUFA n-3, y de diversos compuestos bioactivos como TF, FE, y otros compuestos antioxidantes, el lino ha sido un foco de creciente interés para nutricionistas e investigadores en el área de la salud. Los efectos benéficos para la salud están relacionados con la prevención de enfermedades tales como: afecciones cardiovasculares, hipertensión arterial, cáncer, enfermedades de la piel y trastornos inmunológicos como insuficiencia renal, artritis reumatoide y esclerosis múltiple, entre otros (Gutte et al., 2015). Entre los principales efectos benéficos del lino asociados al alto contenido de ALA, se dispone de claras evidencias sobre: reducción de la tensión arterial, de los niveles de Col y TAG séricos, prevención de la aterosclerosis, artritis reumatoide y asma (Oomah & Mazza, 1998). A su vez, el aceite de lino posee propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras (Kremer, 2000).

2. Esteatosis hepática

2.1- Generalidades de la esteatosis hepática

El hígado desempeña un papel crucial en la homeostasis energética de todo el cuerpo, gracias a su capacidad de metabolizar los AG y la glucosa. Cuando la ingesta de alimentos es abundante, los carbohidratos se metabolizan principalmente para generar ATP y, una vez llenas las reservas de glucógeno, el exceso de glucosa se convierte en AG para la síntesis de TAG, que luego pueden almacenarse en el TA blanco. Aunque el TA blanco funciona esencialmente como un reservorio energético para almacenar TAG, el hígado, en menor medida, también es capaz de almacenar lípidos en condiciones asociadas con un consumo excesivo y prolongado de energía, o una oxidación alterada de AG y esto se manifiesta como esteatosis hepática (Wang et al., 2013).

El exceso de lípidos en la esteatosis hepática está formado principalmente por lípidos neutros, como los TAG y los ésteres de colesterol. En los hepatocitos y otras células del hígado, los lípidos neutros se almacenan en orgánulos dinámicos llamados “Gotas de lípidos” (o del

inglés *Lipid droplets*, LD). Las LD son orgánulos altamente dinámicos con una maquinaria celular específica que regula cada aspecto de su biología. Están compuestas por un núcleo de lípidos neutros, rodeado por una monocapa de fosfolípidos y proteínas específicas que se unen a su superficie (Gluchowski et al., 2017).

La esteatosis hepática se define como una acumulación anormal de macrovesículas (formación de LD más grandes que desplazan el núcleo) y/o microvesículas (acumulación de pequeñas LD con arquitectura celular preservada) lipídicas ricas en TAG dentro de los hepatocitos, sin signos de inflamación o daño hepático (Nassir et al., 2015). En ambas situaciones, las LD en los hepatocitos son mucho más grandes que las que normalmente se encuentran en el citoplasma. La formación de LD muy grandes en los hepatocitos es el sello distintivo de la esteatosis (Gluchowski et al., 2017).

La esteatosis hepática es el elemento característico de lo que se conoce como enfermedad del hígado graso no alcohólico (o de su acrónimo en inglés, NAFLD). La NAFLD se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática, en ausencia de causas secundarias de acumulación de lípidos hepáticos, como ser: consumo excesivo de alcohol, infecciones virales, uso de medicaciones esteatogénicas o desórdenes hereditarios. La síntesis y/o acumulación excesiva de TAG en el hígado constituye uno de los principales factores de riesgo para el progreso de esta enfermedad hacia sus estadios más avanzados, como la esteatohepatitis (o de su acrónimo en inglés, NASH) o la cirrosis (Koo, 2013).

Actualmente, la NAFLD se reconoce como la manifestación hepática del síndrome metabólico, debido a que esta enfermedad hepática, suele coexistir con otros desórdenes metabólicos, como la insulino-resistencia, obesidad y dislipemias, los cuales se encuentran contenidos dentro del espectro del síndrome metabólico (Fabbrini et al., 2009; Vanni et al., 2010). El síndrome metabólico comprende un conjunto de trastornos metabólicos (intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, niveles bajos de Col-HDL, niveles altos de Col-LDL, entre otros), los cuales constituyen factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (Han & Lean, 2015). Dada la relación del NAFLD con el síndrome metabólico, y, por ende, con un conjunto de alteraciones metabólicas extrahepáticas, recientemente se ha propuesto redefinir dicha patología, buscando entre otras cosas, un enfoque más integral del cuadro. Así surge el concepto de enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (o de su acrónimo en inglés, MAFLD). La MAFLD es una afección crónica caracterizada por la acumulación de lípidos hepáticos, combinada con una o más

desregulaciones metabólicas subyacentes. Habiendo evolucionado a partir del término NAFLD, la denominación MAFLD implica más estrechamente la presencia de sobrepeso/obesidad, diabetes tipo II y/o dislipemias, como factores patogénicos, lo que lleva a una mejor identificación de los pacientes con enfermedad hepática. MAFLD no sólo se asocia con complicaciones relacionadas con el hígado, sino también con resultados cardiometabólicos adversos (Lim et al., 2021).

Si bien este nuevo concepto del MAFLD resulta muy satisfactorio, recientemente Younossi et al. (2021), en nombre de la Asociación Estadounidense para el Estudio de la Enfermedad Hepática (AASLD), señalaron que cambiar el nombre de NAFLD puede ser prematuro; de hecho, la mayoría de los médicos que no son hepatólogos todavía tienen dificultades para reconocer la enfermedad hepática en la práctica. Además, se sugirió que aumentar la conciencia pública sobre la enfermedad hepática, tiene una mayor prioridad que trabajar en mejorar el algoritmo de diagnóstico (Z. M. Younossi et al., 2021). Por tales motivos, en el presente trabajo de tesis, se utiliza el concepto de NAFLD.

2.2- El hígado y su histoarquitectura

El hígado es un órgano de gran tamaño del cuerpo humano, pesando alrededor de 1,5 kg en un individuo adulto. Situado en la cavidad abdominal, es el órgano en el que los nutrientes absorbidos en el tubo digestivo se procesan y se almacenan para que luego puedan ser utilizados por otros órganos. El hígado posee una irrigación sanguínea especial, dado que recibe sangre tanto arterial como venosa, funcionando así como una interfaz entre el sistema digestivo y el sistema circulatorio (Carneiro & Junqueira, 2002; Geneser, 2020).

Todos los nutrientes que absorbe el intestino llegan al hígado por la vena porta, excepto los lípidos complejos (quilomicrones), que llegan por la arteria hepática. La posición del hígado en el sistema circulatorio es ideal para captar, transformar y acumular metabolitos, así como también, para neutralizar y eliminar sustancias tóxicas. La eliminación se produce por la bilis, una secreción exocrina del hígado importante para la digestión de lípidos. Este órgano también ejerce una función muy importante en la producción de proteínas plasmáticas como la albúmina y otras proteínas transportadoras (Geneser, 2020).

La estructura microscópica del hígado puede conceptualizarse de varias maneras para su estudio. Dentro de las más comunes tenemos: el lobulillo clásico, lobulillo portal y el acino hepático (**Figura 4**).

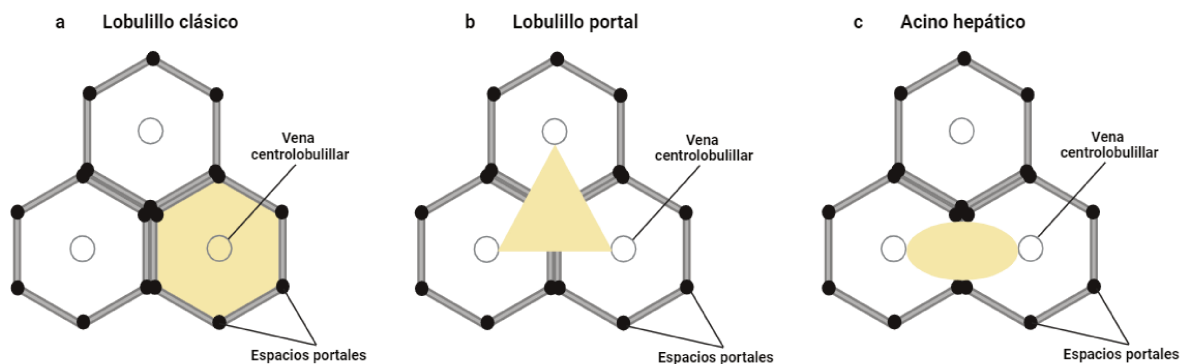


Figura 4: Comparación entre el lobulillo clásico (a), lobulillo portal (b) y acino hepático (c). Adaptado de: Ross, Pawlina, *Histología Ross Pawlina*, 2013, (6), 624-644. ISBN: 9789500603225

El lobulillo portal (**Figura 4, b**) pone de relieve las funciones exocrinas del hígado. La principal función exocrina del hígado es la secreción de bilis. En consecuencia, el eje morfológico del lobulillo portal es el conducto biliar.

Como alternativa, también puede utilizarse el concepto tradicional de lobulillo clásico (**Figura 4, a y 5**), en el que la estructura central es la vena centrolobulillar (o también llamada “vena central”) y la periferia está definida por los espacios portales. Las zonas acinares 1, 2 y 3 corresponden, respectivamente, a las zonas periportal, media y pericentral del lóbulo (Krishna, 2013).

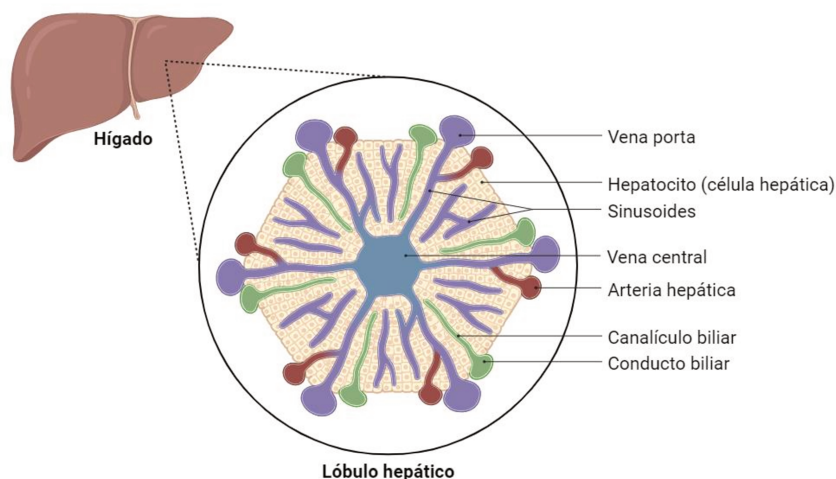


Figura 5: Histoarquitectura del lobulillo clásico. Adaptado de: Ross, Pawlina, *Histología Ross Pawlina*, 2013, (6), 624-644. ISBN: 9789500603225

Por último, el acino hepático (**Figura 4, c**) es una unidad que contiene un pequeño espacio portal en el centro y las venas centrales en la periferia. El acino hepático es la unidad estructural que provee la mejor concordancia entre la perfusión sanguínea, la actividad metabólica y la patología hepática. Además, se trata de la unidad funcional más pequeña del parénquima hepático. Los hepatocitos en la estructura del acino hepático, se describen dispuestos en tres zonas elípticas concéntricas (**Figura 6**):

- . La zona 1 es la más cercana a las ramas provenientes de la triada portal (vena porta, arteria hepática y conducto biliar), y corresponde a la periferia de los lobulillos clásicos.
- . La zona 3 es la se encuentra más cercana a la vena central. Esta zona corresponde al centro del lobulillo clásico, cuyos hepatocitos rodean la vena central.
- . La zona 2 está entre las zonas 1 y 3, pero no tiene límites definidos.

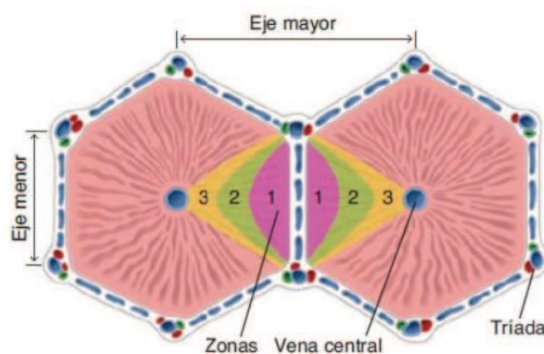


Figura 6: Distribución de zonas en el acino hepático. Adaptado de: Ross, Pawlina, *Histología Ross Pawlina*, 2013, (6), 624-644. ISBN: 9789500603225

La división en zonas es importante en la descripción e interpretación de modelos y efectos específicos del parénquima hepático. A su vez, debido al flujo sanguíneo sinusoidal a lo largo de las 3 zonas (flujo sanguíneo unidireccional que fluye desde la triada portal hacia la vena central), varía el gradiente de oxígeno, nutrientes y la actividad metabólica de los hepatocitos; así como también la distribución de enzimas hepáticas (Ríos-López et al., 2020).

Las células de la zona 1 son las primeras en recibir oxígeno, nutrientes y toxinas de la sangre. Estas células también suelen ser las últimas en morir si hay trastornos de la circulación

y son las primeras en regenerarse. En cambio, las células de la zona 3 son las primeras en sufrir necrosis isquémica en las situaciones donde disminuye la perfusión, las primeras en acumular lípidos y las últimas en responder a sustancias tóxicas. Entre las zonas 1 y 3 también se comprueban variaciones normales en la actividad de enzimas, la cantidad y dimensiones de los orgánulos citoplasmáticos, y el tamaño de los depósitos celulares de glucógeno. Por último, las células de la zona 2 poseen características morfológicas y funcionales intermedias entre los hepatocitos de las zonas 1 y 3 (Ríos-López et al., 2020).

Esta heterogeneidad estructural y funcional de los hepatocitos, es conocida como “zonación hepática” y parece ser la condición previa para realizar simultáneamente la amplia variedad de funciones necesarias para mantener la homeostasis hepática en las distintas condiciones fisiológicas. Esta zonación hepática se genera en parte por el tránsito diferencial de nutrientes y oxígeno, generándose diferentes microambientes en cada una de las zonas del acino (Ríos-López et al., 2020).

Además, Katz & col. (1992) informó que los hepatocitos periportales alrededor de los vasos aferentes (zona 1) y los hepatocitos perivenosos alrededor de los vasos eferentes del acino hepático (zona 3) exhiben diferentes capacidades metabólicas y estructuras subcelulares (Katz, 1992). En particular, mientras la zona 3 está más relacionada con la lipogénesis *de novo*, la zona 1 es responsable de la β -oxidación lipídica como se muestra en la **Figura 7**.

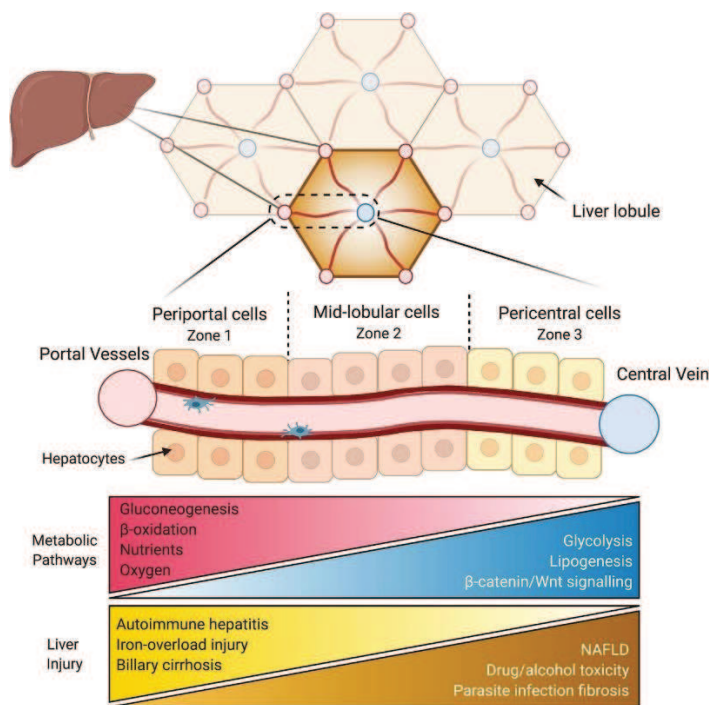


Figura 7: Funciones metabólicas de los hepatocitos en las distintas zonas del acino hepático. Extraído de: Cunningham, R. P., & Porat-Shliom, N. (2021). Liver zonation—revisiting old questions with new technologies. *Frontiers in physiology*, 12, 732929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732929>

2.3- Enfermedad del hígado graso no alcohólico

2.3.1- Epidemiología de la NAFLD

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (o de su acrónimo en inglés, NAFLD), está convirtiéndose rápidamente en una de las enfermedades hepáticas crónicas más comunes a nivel mundial (Z. Younossi et al., 2018) y se estima que llegará a ser la principal causa de trasplante de hígado en el futuro (Z. M. Younossi et al., 2019). En la actualidad, representa una epidemia mundial, siendo la patología hepática más frecuentemente diagnosticada, afectando entre un 20-30% de la población mundial (Z. Younossi et al., 2018). Además, se ha predicho que su prevalencia incrementará exponencialmente en las próximas décadas, concomitantemente con las epidemias globales de la obesidad, diabetes de tipo II y el estilo de vida sedentario (Arab et al., 2020).

En un estudio realizado por Younossi Z.M. & col. en el 2016, cuyos resultados se muestran en la **Figura 8**, se observa que la prevalencia global de la NAFLD se estimó en un 25.2%, mostrando los valores más altos en las regiones de Medio oriente y Sudamérica (31.8 y 30.4%, respectivamente), y los valores más bajos en África (13%). Adicionalmente, la prevalencia de la NAFLD en Norteamérica, Europa y Asia fueron de: 24.1%, 23.7% y 27.4%, respectivamente (Z. Younossi et al., 2018).

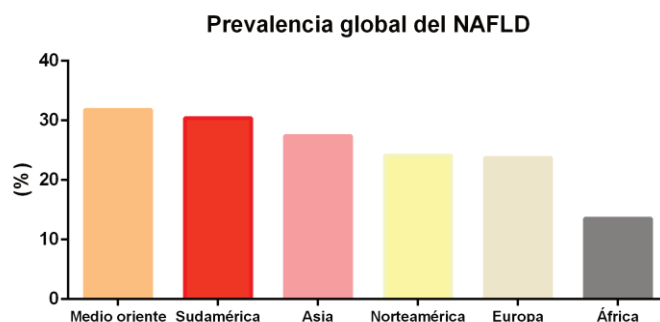


Figura 8: Prevalencia global de la NAFLD. Adaptado de “Younossi, Z. M., Marchesini, G., Pinto-Cortez, H., & Petta, S. (2019). Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: implications for liver transplantation. *Transplantation*, 103(1), 22-27”. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002484>

La prevalencia de la NAFLD está incrementando constantemente (15% en 2005, a 25% en 2010), y de forma similar la del NASH, que en el mismo intervalo de tiempo ha casi duplicado sus tasas (de 33% a 59%)(Z. Younossi et al., 2018). Estudios recientes muestran que la incidencia de la NAFLD a nivel mundial ya se encuentra por encima del 30%, afectando aproximadamente el 35% de la población en Sudamérica (Henry et al., 2022).

La frecuencia de la NAFLD varía en función de la población estudiada y del método diagnóstico utilizado, el cual puede ser: análisis de imágenes (resonancia magnética, ecografía, elastografía), biopsia y análisis histológico, o el análisis de las aminotransferasas circulantes, entre los más comúnmente utilizados (Chalasani et al., 2012). Los estudios diagnósticos a través de análisis de imágenes, como ultrasonografía o de resonancia magnética, han demostrado ser fidedignos para estimar la prevalencia de la NAFLD a lo largo de distintas ubicaciones geográficas; mientras que los estudios basados en la cuantificación de enzimas hepáticas, tienden a subestimar la prevalencia de esta patología (Chalasani et al., 2012).

La data obtenida de biopsias secuenciales de pacientes con NASH, sugieren que la progresión de la NAFLD a NASH no está del todo clara, ya que algunos pacientes con NASH no muestran fibrosis, e incluso otros mostraron lograr una regresión de la fibrosis (Z. M. Younossi et al., 2019). Los pacientes con NASH y NAFLD también tienen riesgo de desarrollar hepatocarcinoma (o de su acrónimo en inglés, HCC). Es interesante notar que existe abundante evidencia que sugiere que algunos pacientes con NAFLD pueden desarrollar HCC, incluso en ausencia de una fibrosis significativa (Z. M. Younossi et al., 2019).

En síntesis, la data epidemiológica sugiere que dentro de las últimas 2 décadas, se ha demostrado que la NAFLD se ha convertido rápidamente una enfermedad hepática de alta incidencia, asociada con la cirrosis y HCC, ubicándose así como una de las principales causas de trasplante de hígado (Z. M. Younossi et al., 2019).

2.3.2- Mecanismos involucrados en la NAFLD

La NAFLD, como se mencionó en la sección 2.2, se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática, en ausencia de causas secundarias de acumulación de lípidos hepáticos. Más precisamente, la esteatosis hepática o hígado graso, se define por una concentración de TAG hepáticos mayor al 5% del peso del hígado; o bien, por un porcentaje $\geq 5\%$ de hepatocitos conteniendo macro- y/o microesteatosis, sin signos de inflamación o daño hepático (Nassir et al., 2015).

La síntesis y/o acumulación excesiva de TAG en el hígado constituye uno de los principales factores de riesgo para el progreso de esta enfermedad (Koo, 2013). Esta acumulación ectópica de lípidos hepáticos, puede darse por distintas condiciones de estrés, como pueden ser: un cuadro de obesidad, una ingesta con un alto contenido de grasas y/o carbohidratos, o dislipemias. A su vez, muchos estudios previos sugieren que la grasa intrahepática, pero no la visceral, tiene una correlación directa con el desarrollo de insulino-resistencia y el síndrome metabólico (Fabbrini et al., 2009).

En el hígado, los AG provenientes de la dieta, de la lipólisis del TA o de la lipogénesis *de novo*, pueden ser oxidados o esterificados a TAG. Estos TAG pueden ser secretados posteriormente como parte de las VLDL ricas en TAG o pueden almacenarse como LD (**Figura 9**).

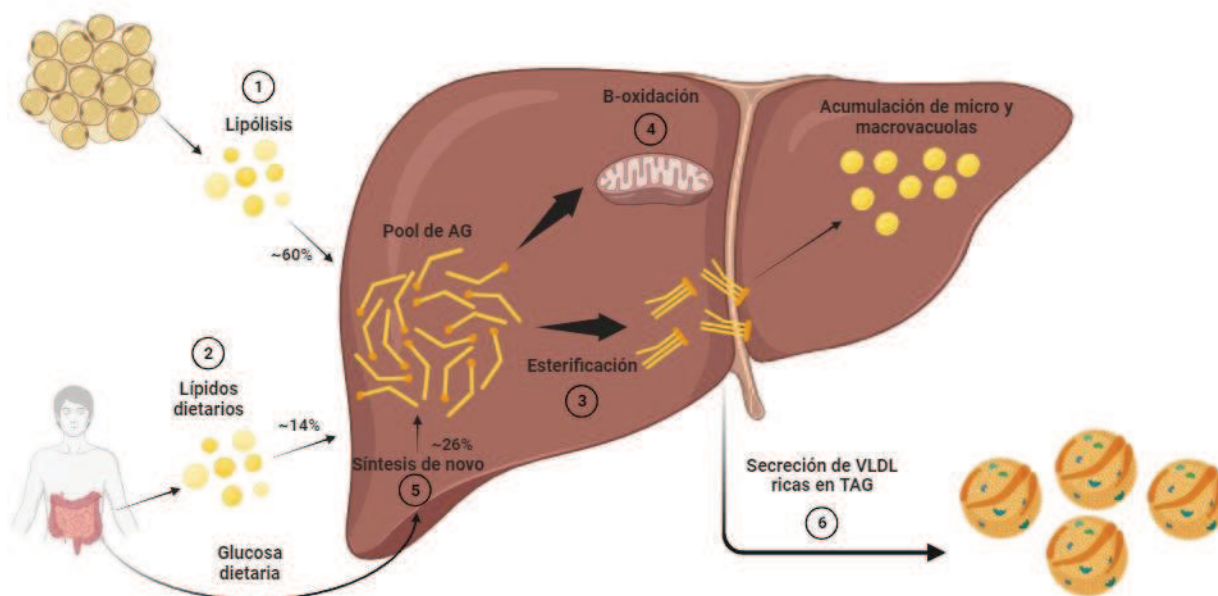


Figura 9: Esquema que representa las contribuciones de las distintas vías metabólicas a la esteatosis hepática. Adaptado de "Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & hepatology*, 11(3), 167".

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4836586/>

2.3.2.1- Rol de la captación de AG circulantes

Los AG de circulación, ya sea provenientes de la lipólisis del TA, como los remanentes de la dieta post-remoción por los tejidos extrahepáticos, son captados por el hígado (**Figura 9**, vías 1 y 2). En este sentido, el TA a través del proceso de lipólisis es una importante fuente de

AG, la cual se encuentra regulado por la acción de la insulina sobre los adipocitos. Una señalización deficiente de la insulina sobre el TA, contribuye al desarrollo del hígado graso, a través de una lipólisis exacerbada o desregulada, lo cual resulta en un *delivery* excesivo de AG hacia el hígado (Lomonaco, 2012).

La captación de AG a través de la membrana plasmática de los hepatocitos está mediada por proteínas transportadoras de membrana llamadas FATP (de su nombre en inglés *Fatty Acid Transport Protein*), y la traslocasa de ácidos grasos CD36. En cuanto a las proteínas transportadoras FATP, el hígado de los mamíferos expresa dos de ellas, las isoformas FATP2 y FATP5. Estudios realizados en ratones demostraron que la delección de los genes que codifican para dichas proteínas, reduce la absorción de AG por parte del hígado (Doege et al., 2006; Falcon et al., 2010). Por el contrario, en mutantes sobreexpresantes de FATP5, se vio incrementa la captación de AG de cadena larga (Doege et al., 2006).

En cuanto a la expresión hepática de CD36 en condiciones normales suele ser baja, pero la misma incrementa debido al consumo de una dieta rica en grasas, o en individuos obesos. La captación de AG de cadena larga y la acumulación de los mismos en el hígado, se relaciona directamente con los niveles de expresión de CD36 (Koonen et al., 2007; Nassir et al., 2013). En muestras de pacientes con NAFLD sometidos a biopsia, se observaron mayores niveles de CD36 que en los pacientes control, lo cual resalta la importancia clínica del CD36 en la patología de la NAFLD (Bugianesi et al., 2005; Fabbrini et al., 2009).

2.3.2.2- Rol de la lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* implica la formación de AG a partir de glucosa, mediante una serie de reacciones que comienzan en la matriz de la mitocondria y terminan en el citosol de la célula (**Figura 9**, vía 5). En el caso de un exceso de energía celular, el citrato generado mediante el Ciclo de Krebs en la matriz de la mitocondria, se exporta hacia el citosol para generar acetil-CoA, quien es luego convertido en malonil-CoA en el primer paso de la síntesis de AG, en una reacción catalizada por la enzima Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) (Ameer et al., 2014).

La lipogénesis *de novo* es un proceso activado por concentraciones elevadas de glucosa plasmática, los cuales producen un incremento de los niveles de insulina circulantes, y esta última estimula la expresión de enzimas lipogénicas. El efecto de la insulina sobre la expresión de las enzimas lipogénicas está regulado por la proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides-1c (de su nombre en inglés: SREBP-1c) (Ameer et al., 2014). En un estudio

desarrollado por Lambert J.E & col. (2014), donde se comparó sujetos con alto contenido de grasa hepática vs individuos con bajo contenido de grasa hepática (sujetos de control), encontraron que las personas con niveles altos de grasa hepática tuvieron una mayor síntesis *de novo* de AG, respecto a los sujetos de control (Lambert et al., 2014). Además de esto, en pacientes con hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y esteatosis, se observó que aproximadamente el 14% de la grasa provenía de la dieta, un 60% de los AG libres circulantes, y un 26% de la lipogénesis *de novo*. A partir de estos resultados, se encontró que los AG provenientes de la lipogénesis *de novo* tienen un peso importante en la acreción de TAG hepáticos característica de la NAFLD (Diraison et al., 2003; Donnelly et al., 2005).

2.3.2.3- Rol de la secreción hepática de TAG

Una de las principales funciones del hígado es la síntesis y secreción de TAG unidos a las VLDL (**Figura 9**, vía 6), proceso que depende principalmente de la disponibilidad de TAG (Fisher et al., 2001). Los TAG utilizados para el ensamblaje de VLDL, son sintetizado en la luz del RE como una respuesta preventiva del hígado frente a una incrementada afluencia de AG. Las VLDL nacientes producidas en el hígado, están compuestas por un núcleo de TAG, rodeado de fosfolípidos, Col, ésteres de Col y apolipoproteínas específicas (Pan et al., 2002). Dentro de las apolipoproteínas, la apolipoproteína B (apoB) es el más importante, ya que es quien proporciona estabilidad estructural a la partícula de VLDL naciente (Olofsson & Boren, 2005). Apo B es una glicoproteína anfipática, que existe en 2 formas: apoB₁₀₀ y apoB₄₈. En humanos, la apoB₁₀₀ se expresa en el hígado y es la proteína estructural clave de las VLDL y LDL, mientras que la apoB₄₈ se sintetiza principalmente en el intestino y es la proteína estructural clave de los quilomicrones (Lo et al., 2008).

La biogénesis de VLDL ocurre en la luz del RE y este proceso en su primer paso, requiere de la lipidación de la apoB₁₀₀, para formar una partícula VLDL naciente. Este paso es catalizado por la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP). De esta manera, el ensamblado y secreción de las VLDL requiere de la función de 2 proteínas principalmente: la apoB y de la MTTP (Diraison et al., 2003). Pacientes con un defecto en la apoB o MTTP, son incapaces de exportar los lípidos desde el interior del hígado, y como consecuencia terminan desarrollando esteatosis (Sundaram & Yao, 2010; Tarugi et al., 1996). Estudios realizados en ratones muestran que el silenciamiento de *apoB* o *Mttp*, induce una acumulación de TAG hepáticos (Tep et al., 2012). A pesar del rol de los mecanismos responsables de la secreción de TAG hepáticos en el desarrollo de la esteatosis, se ha demostrado que un incremento de la

secreción de VLDL es insuficiente para normalizar el contenido de TAG hepáticos, en pacientes con NAFLD. Esto se debe a que la secreción de VLDL incrementa proporcionalmente con el contenido de TAG hepáticos, hasta alcanzar un *plateau* (Fabbrini et al., 2008).

2.3.2.4- Rol de la β -oxidación

Los AG circulantes, luego de ingresar en el hígado, deben ser metabolizados ya sea: hacia su β -oxidación (**Figura 9**, vía 4), o bien, esterificarse para formar moléculas de TAG. Algunos pacientes con NAFLD y/o NASH han reportado disfunción mitocondrial y, por lo tanto, una β -oxidación deficiente. Lo que aún no está claro es si la disfunción mitocondrial es lo que predispone a estos individuos hacia el desarrollo de NASH, o si el desarrollo del estrés celular asociado al NAFLD es lo que produce esta disfunción mitocondrial (Pessayre & Fromenty, 2005).

Existen múltiples trabajos que sugieren una relación directa entre la disfunción mitocondrial y el desarrollo de esteatosis hepática (Nassir & Ibdah, 2014). La β -oxidación es la vía más común para la obtención de energía en forma de ATP, a partir de la oxidación de los AG en el interior de la mitocondria. Mientras que los AG de cadena corta y media, entran a la mitocondria a través de la membrana mediante un transporte pasivo; los AG de cadena larga deben ser activados en primer lugar, mediante el agregado de una molécula de CoA, por acción de la enzima acil-CoA sintasa. Posteriormente, estos AG activados, entran a la mitocondria a través de las proteínas transportadoras carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1) y 2 (CPT-2).

En la NAFLD avanzado, existe un deterioro de la β -oxidación mitocondrial, el cual se debe a: (1) la inducción mediada por SREBP-1c de ACC con una sobreproducción de malonil-CoA, el cual es un metabolito inhibidor de la enzima clave CPT-1a; (2) la acumulación hepática de lípidos tóxicos atípicos que inhiben la β -oxidación mitocondrial, (3) la acumulación de sub-productos de oxidación dentro de las mitocondrias, que pueden dañar los complejos de la cadena respiratoria o el ADN mitocondrial (Fon Tacer & Rozman, 2011).

Sin embargo, la β -oxidación hepática de AG puede aumentarse en etapas posteriores de NASH, como un mecanismo compensatorio frente al aumento de la absorción y síntesis de AG (Igoudjil et al., 2004). Esto último, implica tanto la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α), como el consiguiente incremento de la actividad de CPT-1a, así como la pérdida de afinidad de CPT-1a por su inhibidor (malonil-CoA) (Begrache et al., 2006). Otros mecanismos celulares alternativos a la β -oxidación mitocondrial de AG, como la oxidación microsomal (ω -oxidación) y/o peroxisomal (β -oxidación), también pueden regularse

positivamente para disminuir la acumulación de AG, a expensas de un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno. En síntesis, el exceso de flujo de AG hacia el hígado sobrecarga a la mitocondria, llevando a una acumulación de productos incompletos de oxidación, los cuales promueven la producción de especies reactivas del oxígeno (Cheng & Ristow, 2013; Sookoian et al., 2010).

2.3.2.5- Rol de la acumulación de colesterol a nivel hepático

Como se mencionó previamente, la progresión de una esteatosis simple a una esteatohepatitis (NASH), suele implicar un segundo golpe, como el estrés oxidativo y la inflamación. Estudios nutricionales realizados en modelos animales, indican que la acumulación hepática de Col en lugar de AG/TAG, juega un papel crítico en esta progresión (Fernández et al., 2008).

Puri et al. (2007), a través de análisis lipídicos de biopsias hepáticas de pacientes con NAFLD, han demostrado una acumulación de Col libre, sin un aumento del Col esterificado en subgrupos con esteatosis aislada y NASH (Puri et al., 2007). Estudios más recientes han demostrado que la acumulación hepática de Col libre es una característica conservada en la NAFLD, que a su vez, se correlaciona con la severidad histológica del cuadro (Caballero et al., 2009; Min et al., 2012). Estudios en animales demostraron que la inducción experimental de la acumulación hepática de Col libre, promueve la esteatohepatitis y fibrosis hepática; y que la reversión de la sobrecarga de Col libre mejora la gravedad de la enfermedad hepática (Mari et al., 2006; Savard et al., 2013; Wouters et al., 2010).

Aunque se ha descubierto que la acumulación de Col libre causa directamente apoptosis y necrosis en los hepatocitos, los mecanismos de la lipotoxicidad del Col libre en la NASH aún no están completamente delineados. Algunos de los mecanismos propuestos son: la activación de las células de Kupffer (que conduce a una respuesta inflamatoria); la activación de las células estrelladas hepáticas (desencadenando en procesos de fibrosis); y la acumulación de Col en las mitocondrias, lo que provoca una disfunción mitocondrial y el deterioro de sus funciones normales. Por lo tanto, la acumulación de Col libre es un fenómeno conservado en la patología de la NAFLD, y tiene un papel importante en la modulación de la lesión hepática (Gan et al., 2014).

2.3.3- Progresión de la NAFLD

La NAFLD comprende un amplio espectro de desórdenes hepáticos que van desde la presencia de una simple esteatosis hepática, hasta esteatohepatitis (NASH) (**Figura 10**), pudiendo esta última ser con o sin fibrosis (Chalasani et al., 2012). La NAFLD desde el punto de vista histológico, se puede clasificar en hígado graso no alcohólico (NAFL) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH). El NAFL está definido como la presencia de esteatosis hepática, sin evidencia de daño hepatocelular bajo la forma de hepatocitos balonizados. La esteatosis hepática se considera a menudo una condición benigna, de hecho, el riesgo de desarrollar cirrosis en pacientes con hígado graso es de 0.5% a 1% (Adams & Angulo, 2005). El NASH está definido como la presencia de esteatosis hepática e inflamación, junto con daño hepatocelular (hepatocitos balonizados) (Chalasani et al., 2012). El NASH puede eventualmente progresar a cirrosis y hepatocarcinoma (HCC) (**Figura 10**), de hecho, alrededor de 9-20% de los pacientes con NASH en etapa temprana progresan a cirrosis en un período de 5 a 10 años y parte de ellos desarrollan HCC en un período que ronda los 5 años (Matteoni et al., 1999).

La progresión a través de los distintos estadios de la NAFLD fue explicada por primera vez hace 2 décadas, por Day & col. (1998), quien propuso la hipótesis de los “dos golpes” (Day & James, 1998). Según esta teoría, el “primer golpe” se desencadena por la acumulación de lípidos en los hepatocitos (macro- y/o micresteatoxis hepática), un rasgo en el que la ingesta exacerbada de grasas y la insulino resistencia (IR) jugarían un papel clave. Este “primer golpe” aumentaría la vulnerabilidad del hígado frente a otros factores dañinos, denominados colectivamente “segundo golpe”, dentro de los cuales tenemos: el estrés oxidativo, los polimorfismos genéticos, y la activación de las vías inflamatorias, entre otros. Estos factores que constituyen el “segundo golpe”, actuarían por separado, impulsando el progreso de la esteatosis simple, hacia el NASH. Esta progresión incluye: apoptosis de hepatocitos, inflamación hepática y fibrogénesis. La fibrosis comienza como una fibrosis periportal, que va incrementando gradualmente hasta provocar una cirrosis con insuficiencia hepática y, eventualmente, la hepatocarcinogénesis (Day & James, 1998).

Más recientemente, surgió una nueva teoría para explicar la progresión de la NAFLD, llamada “teoría de impactos múltiples paralelos” (Tilg & Moschen, 2010). Según esta teoría, la IR, que es un factor de riesgo independiente de la NAFLD, sería el “primer golpe” que desencadena la enfermedad. La IR conlleva a un incremento de los AGL hepáticos, y eso es lo que vuelve al hígado vulnerable a los ataques adicionales mencionados anteriormente

(inflamación, estrés oxidativo, etc.). Este modelo conceptualiza al NASH como una afección precedida por IR y la esteatosis simple, con una progresión impulsada por una gran cantidad de lesiones hepáticas paralelas que se acumulan gradualmente con el tiempo (Tilg & Moschen, 2010).

Por último, ha surgido una teoría más reciente que propone que el NASH y el hígado graso puro, son dos afecciones gemelas independientes, causadas por IR (Yilmaz, 2012). Según esta nueva hipótesis, la combinación de eventos moleculares patogénicos, darían como resultado la activación diferencial de distintas vías que conducen a la esteatosis simple y/o NASH, considerándolas como dos patologías separadas. De acuerdo con este punto de vista, los pacientes con NASH pueden presentar mucha o ninguna esteatosis (Tilg & Moschen, 2010). Además, el estrés de los hepatocitos debido a la inflamación propia del NASH puede causar acumulación de lípidos, de modo que, en ciertos casos, la inflamación incluso precede a la esteatosis en lugar de ser una consecuencia de ella (Yilmaz, 2012).

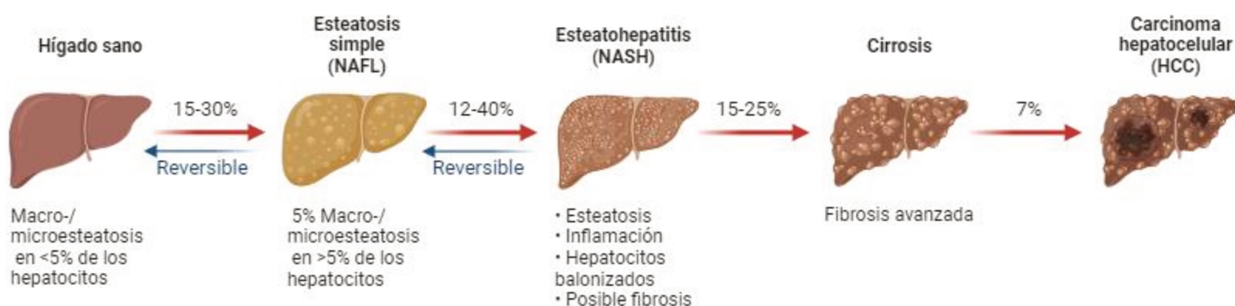


Figura 10: Progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Adaptado de “Bessone, F., Razori, M. V., & Roma, M. G. (2019). Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 99-128.” <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2947-0>

2.3.4- Métodos diagnósticos

El diagnóstico de NAFLD se basa en la detección de esteatosis hepática, la cual se considera cuando existe más de un 5% de los hepatocitos comprometidos con macro- o microesteatosis; o bien, cuando el contenido de TAG hepáticos supera el 5.5% (cuantificado por resonancia magnética), en ausencia de otras enfermedades hepáticas (Bessone et al., 2019). El diagnóstico de NAFLD es el primer paso para evaluar la severidad del mismo.

La biopsia hepática siempre ha sido el método de referencia para evaluar la gravedad de la NAFLD, y así seleccionar pacientes para tratamiento farmacológico, controlar la progresión de

la enfermedad o la respuesta al tratamiento y desarrollar nuevos fármacos. Sin embargo, la biopsia hepática es un procedimiento invasivo con un pequeño riesgo de complicaciones como el sangrado (McGill et al., 1990). Por esta razón, se han estudiado múltiples variantes de biomarcadores, ya sean análisis séricos, o análisis de imágenes, a los fines de aplicar métodos no invasivos para el diagnóstico de esta patología. Dentro de los métodos no invasivos, tenemos dos grandes ramas: por un lado, se encuentran los análisis bioquímicos de marcadores séricos, y por el otro, los análisis de imágenes.

Dentro de los marcadores séricos más comúnmente utilizados para el diagnóstico de NAFLD, tenemos algunas citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α o IL-6 (las cuales se encuentran elevadas en pacientes con NASH), la citoqueratina 18 (un producto de degradación resultante de la apoptosis de los hepatocitos), la ferritina sérica (la cual se ha encontrado elevada en pacientes con NAFLD), entre otros (Castera et al., 2013; Wong et al., 2018). Además, la alanina aminotransferasa o glutamato-piruvato transaminasa (ALT), y la aspartato aminotransferasa o glutámico oxalacético transaminasa (AST), han sido los marcadores bioquímicos más comúnmente utilizados para el *screening* diagnóstico de enfermedad hepática. Estas enzimas se filtran de las células dañadas, por lo cual se consideran indicadores de lesión hepática. Las mismas pueden estar levemente elevadas en condiciones patológicas, pero no más de 2 o 3 veces el valor del límite superior de referencia (Graffigna et al., 2017). Sin embargo, es importante aclarar que las transaminasas no son marcadores confiables de NASH por si solas, puesto que pueden ser normales aún en casos de fibrosis avanzada (Graffigna et al., 2017). Según la bibliografía disponible, las mismas tienen una sensibilidad menor al 50% para identificar pacientes con NASH (Friedman et al., 2018). De hecho, el NASH se correlaciona mejor con los niveles de TAG hepáticos, que con los niveles séricos de transaminasas (Wong et al., 2018). Sin embargo, los niveles séricos de aminotransaminasas siguen siendo el parámetro sanguíneo más comúnmente utilizado para la evaluación de la enfermedad hepática (incluyendo la NAFLD), ya que no existen a la actualidad mejores biomarcadores disponibles para identificar pacientes con NASH.

El otro posible método para el diagnóstico de la NAFLD es mediante estudios por análisis de imágenes, incluyendo ultrasonido (ecografía), tomografías computarizadas o resonancia magnética. De todas las posibilidades disponibles, el ultrasonido y la tomografía computarizada tienen un grado de sensibilidad comparable (Friedman et al., 2018). La tomografía no es sensible para detectar incrementos leves o moderados del contenido de lípidos hepáticos (5-30%), y al asociarse con la exposición a radiación, su uso se ve limitado en estudios longitudinales y en

niños (Castera et al., 2013). En cuanto al ultrasonido, este tiene un grado de fiabilidad alto cuando la esteatosis comprende un porcentaje mayor o igual al 20% de la masa hepática. La sensibilidad del ultrasonido se reduce cuando más de un 30% del parénquima hepático está infiltrado por grasa, y también posee escasa sensibilidad en pacientes con obesidad mórbida. Por último, la resonancia magnética puede detectar niveles tan bajos como un 5% de esteatosis, sin embargo no es considerado un análisis de rutina por su elevado costo y alto consumo de tiempo (Friedman et al., 2018).

En resumen, los estudios por análisis de imágenes como ecografía abdominal, tomografía computarizada o resonancia magnética no pueden distinguir entre NAFLD y NASH. Por lo tanto, a pesar de que el diagnóstico de NAFLD es bastante directo, el de NASH, caracterizado por esteatosis, hepatocitos balonizados e inflamación lobular con grados variables de fibrosis, requiere indefectiblemente de biopsia hepática (Friedman et al., 2018).

2.3.4.1- El análisis histopatológico como *gold standard*

Como se mencionó en la sección anterior, actualmente la biopsia hepática continúa siendo el "*gold standard*" para el diagnóstico de NAFLD en estudios clínicos (Liang et al., 2014). A los fines de poder cuantificar la progresión de la patología y poder comparar los resultados de distintos estudios clínicos, en 2005, la Red de Investigación Clínica NASH (NASH-CRN) estableció y validó un sistema de evaluación histológica para todo el espectro de la NAFLD, llamado "*NAFLD activity score*" (NAS) (Kleiner et al., 2005). El *score* del NAS se calcula como la suma no ponderada de las puntuaciones de: esteatosis (0-3), inflamación lobulillar (0-3) y hepatocitos balonizados (0-2). El objetivo principal del NAS es poder evaluar los cambios histológicos a lo largo del tiempo. El problema con este sistema desarrollado por Kleiner et al. (2005), es que ha sido diseñado para estudios clínicos en humanos. Por lo que años después, Liang et al. (2014) analizaron un conjunto de estudios histológicos en modelos animales, y basándose en las características de la NAFLD en modelos de roedores, propusieron un sistema de *scoring* basado en el de Kleiner, con ciertas modificaciones. De esta forma, el sistema desarrollado por Liang podría ser utilizado para el análisis y la comparación de resultados en modelos preclínicos de roedores (Liang et al., 2014). A continuación, se describen cada uno de los elementos histológicos claves en la patología de la NAFLD, según el NAS:

2.3.4.1.1- Esteatosis macro- y micro-vesicular

La esteatosis hepatocelular es el elemento característico de NAFLD, y se define por la presencia de macro- y/o microvesículas (formadas por LD de distintos tamaños) en más del 5 % de los hepatocitos (Kleiner et al., 2005). La esteatosis hepatocelular se clasifica en dos tipos: macrovesicular y microvesicular. En la esteatosis macrovesicular, una sola LD de gran tamaño, ocupa el citoplasma del hepatocito, empujando su núcleo hacia la periferia de la célula. En la esteatosis microvesicular, el citoplasma de los hepatocitos está lleno de pequeñas LD, mientras que el núcleo permanece ubicado en el centro de la célula. Según Shwimmer et al. (2005), la región más común para el comienzo del desarrollo de esteatosis hepática es la zona 3, debido a la baja tensión de oxígeno y disponibilidad de nutrientes (Schwimmer et al., 2005). Sin embargo, en estadios más avanzados, puede observarse esteatosis panacinar (presente en todo el parénquima hepático) (Takahashi & Fukusato, 2014).

2.3.4.1.2- Inflamación lobulillar y portal

La inflamación intralobulillar está presente en el cuadro del NASH, donde suele ser leve y consiste en un infiltrado mixto de células inflamatorias (pudiendo ser linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células de Kupffer). En el cuadro de esteatosis simple, la inflamación suele estar ausente, o puede existir una inflamación leve a nivel portal, constituida principalmente por linfocitos. Cuando la inflamación portal se vuelve grave, se debe considerar la posibilidad de concurrencia de otras enfermedades hepáticas, tales como la hepatitis C o hepatitis autoinmune (Takahashi & Fukusato, 2014).

La inflamación se evalúa contando el número de agregados inflamatorios por campo, utilizando un aumento de 100x. Un agregado inflamatorio se define como un grupo de cinco o más células inflamatorias. Para la cuantificación del nivel de inflamación hepática, en la práctica, se enfocan 5 (cinco) campos diferentes y se cuantifica el número de agregados de células inflamatorias en cada campo. Finalmente el promedio de estos se clasifica en una de las siguientes categorías: normal (<0,5 agregados), leve (0,5–1 agregado), moderado (1–2 agregados), grave (>2 agregados) (Liang et al., 2014).

2.3.4.1.3- Hepatocitos balonizados

Los hepatocitos balonizados se caracterizan por ser hepatocitos “hinchados” con un citoplasma “enrarecido” (Takahashi & Fukusato, 2014). Se pueden observar múltiples LD de gran tamaño en los hepatocitos balonizados. El concepto de “balonización” se refiere a la pérdida de los ángulos agudos de los hepatocitos normales (Bedossa, 2016), y se cree que la misma se

debe a una alteración del filamento intermedio del citoesqueleto. Las citoqueratinas 8 y 18 se rompen y dejan de estar presentes en el citoplasma, migrando hacia la periferia de los hepatocitos (Brunt, 2010).

Liang et al. (2014), propuso cambiar el parámetro de hepatocitos balonzados, por el de “hepatocitos hipertrofiados”, siendo estos con un tamaño celular $\geq 1,5$ veces el diámetro de los hepatocitos normales (Liang et al., 2014). Sin embargo, a diferencia de los hepatocitos balonzados, la hipertrofia hepatocelular no es un signo de lesión celular; simplemente se refiere a un agrandamiento anormal de las células, sin conocer la causa de este incremento de tamaño (Liang et al., 2014).

2.3.4.1.4- Fibrosis

La fibrogénesis hepática es consecuencia de una reparación tisular exacerbada ante un daño hepático crónico. La fibrosis consiste en el depósito progresivo de proteínas de matriz extracelular en el parénquima hepático (principalmente colágeno de tipo I), que se observa en la mayoría de enfermedades crónicas del hígado y que precede al desarrollo de cirrosis.

El sistema de puntuación NAS no incluye la fibrosis dentro de la puntuación de actividad, sino que utiliza un sistema de clasificación separado para esta, basado en si la fibrosis es perisinusoidal, periportal y/o en puente. Esto se debe a que la fibrosis no es un requisito para el diagnóstico de NASH, aunque suele estar presente en pacientes con dicha patología. Hasta hace poco, el NASH era el único cuadro dentro de la NAFLD que se asociaba con el desarrollo de fibrosis (Liang et al., 2014). Hoy en día, como se mencionó en secciones anteriores, se sabe que el desarrollo de fibrosis puede darse sin necesariamente la existencia de esteatosis.

La fibrosis en el NASH suele ser perisinusoidal/pericelular, en un patrón conocido como patrón “alambre de gallinero”, y generalmente comienza en la zona 3. La fibrosis en el NASH suele estar acompañada de una reacción necroinflamatoria activa; sin embargo, también puede encontrarse fibrosis sin lesiones, los cuales sugieren episodios previos de esteatohepatitis (Takahashi & Fukusato, 2014).

Por lo tanto, según el NAS establecido por Kleiner et al. (2005), se describió la progresión y los grados de la fibrosis de la siguiente manera: el estadio 1 implica fibrosis perivenular o periportal aislada; el estadio 2 incluye fibrosis portal y venular, sin fibrosis puente; la etapa 3 se da cuando existe “fibrosis puente” (es decir, conectando los depósitos de colágeno de la región

central y la región portal) ; y la etapa 4 finalmente es lo que se conoce como cirrosis (Kleiner & Brunt, 2012).

2.4- Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD)

Como se mencionó previamente, la NAFLD es una enfermedad que afecta a una cuarta parte de la población mundial, y que, al día de la fecha, no cuenta con un tratamiento farmacológico aprobado. Si bien existe una serie de farmacoterapias en desarrollo, las tasas de respuesta de las mismas no parecen ser muy prometedoras. Esto se debe en parte, a la heterogeneidad de las alteraciones metabólicas del hígado graso. Por este motivo, en el 2019 un consenso de expertos internacionales propuso renombrar al NAFLD y adoptar el acrónimo MAFLD, o “Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica”, dando relevancia a la disfunción metabólica sistémica subyacente al NAFLD propiamente dicho (Eslam et al., 2020).

El diagnóstico de MAFLD contempla la presencia de NAFLD (detectada mediante biomarcadores séricos, diagnóstico por imágenes o histología), y al menos uno de los siguientes criterios: (a) sobrepeso/obesidad, (b) diabetes tipo II y (c) desregulación metabólica. Este último punto, implica al menos 2 de los siguientes factores: aumento de circunferencia de cintura, hipertrigliceridemia, niveles bajos de Col-HDL en suero, hipertensión, hiperglucemia en ayunas, resistencia a la insulina e inflamación subclínica crónica (Mantovani, 2021).

Aunque no todos, varios expertos consideran apropiado el uso de los criterios MAFLD, dado que estos identificarían una condición más homogénea que la NAFLD, superando las dificultades y controversias en la definición del consumo de alcohol, fomentando nuevos desarrollos y facilitando estudios clínicos (Bianco et al., 2020). Sin embargo, aún se necesitan estudios adicionales para explorar este tema de manera amplia y rigurosa, a los fines de respaldar la elección de los criterios utilizados para el diagnóstico de MAFLD, en lugar de los criterios de NAFLD, en la práctica clínica.

3. Modelos animales de Esteatosis Hepática

Los modelos animales de enfermedades humanas son una parte integral de la investigación pre-clínica, permitiendo a los investigadores realizar distintos tipos de estudios, para obtener información que pueda ser luego aplicada a patologías humanas (Im et al., 2021). Un modelo preclínico “ideal” debería imitar lo más fielmente posible, la fisiopatología de la enfermedad humana que se desea estudiar. Si este modelo se aplica para identificar y validar posibles tratamientos, este debería mostrar las características clínicamente más relevantes de

dicha enfermedad (Jahn et al., 2019). Además, dentro de los modelos animales de una misma patología, cada uno de estos permite obtener información diferente; por lo que los investigadores deben tener una comprensión muy clara de que aspecto, vía o mecanismo de dicha patología se pretenden estudiar, para poder elegir el modelo animal que mejor se adapte a los objetivos de la investigación (Nevzorova et al., 2020).

Particularmente, en el caso de la NAFLD, el modelo "ideal" debería reflejar todo el espectro humano de la enfermedad hepática, desde el punto de vista clínico, bioquímico e histológico, además de las características del síndrome metabólico asociado (Nevzorova et al., 2020). Los estudios de NAFLD utilizan normalmente modelos de roedores obesos, para inducir esteatosis hepática (Im et al., 2021). Dentro de los modelos animales para el estudio de la NAFLD, se distinguen dos grandes grupos: los que son resultado de modificaciones genéticas, y los no genéticamente modificados (inducidos por agentes externos como dietas, fármacos o toxinas).

La capacidad de modificar genéticamente animales, mediante la sobreexpresión de genes que promueven la lipogénesis, o la eliminación de genes que regulan la oxidación de AG; ofrece una vía para descifrar los mecanismos asociados al desarrollo de NAFLD. Existen distintos modelos de animales genéticamente modificados de NAFLD, como el caso de los ratones deficientes en leptina (*ob/ob*), deficientes en el receptor de leptina (*db/db*), deficientes en el receptor de LDL (*Ldlr*^{-/-}), entre otros. Si bien estos modelos son útiles para estudiar ciertos aspectos de la patología del hígado graso, tienen la limitante de que la modificación genética de los mismos no suele ser suficiente para inducir el espectro completo de la patología. Para lo lograr esto, precisan adicionalmente de un "estímulo metabólico" (como la exposición a pequeñas dosis de agentes químicos o el uso de dietas específicas). Sumado a esto, las modificaciones genéticas de los modelos citados (*ob/ob*, *db/db*, *Ldlr*^{-/-}), generan deficiencias que están generalmente ausentes en los pacientes humanos con NAFLD (Jahn et al., 2019).

Dentro de los modelos animales no modificados genéticamente, tenemos: aquellos modelos que utilizan toxinas u hormonas para inhibir o inducir determinadas vías metabólicas (como puede ser la inhibición de la oxidación de AG o la inducción de la lipogénesis hepática); y, por otro lado, los modelos dietarios. A su vez, dentro de los modelos dietarios, existen dos tipos: los modelos que se basan en dietas deficientes en ciertos nutrientes esenciales, como la dieta deficiente en metionina y colina; y los modelos que emplean dietas obesogénicas, comúnmente llamadas dietas *High-fat* (HF).

En los últimos años, ha incrementado en gran medida el número de estudios que emplean dietas obesogénicas para validar posibles tratamientos para la NAFLD. Estos modelos suelen basarse en dietas ricas en grasas, pero que además pueden contener mayores cantidades de azúcares y/o Col. En comparación con los demás modelos descritos anteriormente, los modelos basados en dietas HF consumen mucho tiempo y requieren tamaños de muestra mayores, debido a la mayor variabilidad inter-individuo. Sin embargo, el uso de estas dietas obesogénicas condujo a modelos preclínicos capaces de imitar el espectro completo de características metabólicas e histológicas de la NAFLD humano, incluyendo la obesidad, resistencia a la insulina, inflamación y fibrosis hepática. Además, el uso de animales de cepas “salvajes” con información genética ampliamente disponible, facilita la validación de posibles tratamientos (Jahn et al., 2019).

Las dietas HF existentes hasta el momento, son bastante diferentes con respecto a su composición de macronutrientes y, desafortunadamente, hasta la fecha no existe ninguna dieta HF estandarizada para la investigación de NAFLD. Lo más comúnmente aceptado para el diseño de dietas HF, es que entre un 40-60% de las calorías deriven de la grasa. En cuanto al tipo de grasa utilizada, el mismo es muy variable: aceites vegetales derivados de coco o soja, grasas animales derivadas de la manteca de cerdo o de la leche, etc. Además, las dietas HF pueden variar significativamente con respecto al contenido de Col (normalmente entre 0-2%) y el tipo de azúcar, el cual puede incorporarse tanto a la dieta como al agua de bebida (por ejemplo, sacarosa o fructosa) (Jahn et al., 2019).

Si bien las dietas ricas en SFA de origen animal son consideradas más perjudiciales que aquellas ricas en PUFA (Bray et al., 2002; Buettner R et al., 2007; Hariri et al., 2010; Krishnan, S., & Cooper, 2014), se ha demostrado que los PUFA exhiben mayor sensibilidad al daño inducido por especies reactivas de oxígeno, y esta susceptibilidad a la oxidación aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de AG (Bielski et al., 1983). Estudios con roedores alimentados con altos contenidos de grasas animales y/o vegetales (Chalkley et al., 2002; Gustafson et al., 2002; Honors et al., 2012; Lee et al., 2005), a diferencia de aquellos alimentados con aceites ricos en LC-PUFA n-3 de origen marino (Storlien et al., 1996), han mostrado que desarrollan hiperglucemia, hiperinsulinemia e IR sistémica (Buettner R et al., 2007; Ferramosca et al., 2014). Efectos similares a los observados en el metabolismo de la glucosa han sido observados en el contenido de los TAG circulantes, donde roedores alimentados con una dieta HF a base de grasa animal y/o vegetal (Briaud et al., 2002; Yaqoob et

al., 1995) presentan hipertrigliceridemia, mientras que en los alimentados con aceite de pescado los niveles de TAG circulantes tendieron a disminuir (Rokling-Andersen et al., 2009).

En virtud de sus potenciales efectos benéficos y aplicación al consumo humano, el aceite de lino virgen parecería tener grandes ventajas frente al resto de los aceites vegetales comestibles. Sus beneficios se atribuyen no sólo, a que es una de las principales fuentes vegetales de ALA, sino también su contenido de compuestos biológicamente activos (mucílagos, lignanos, carotenos, péptidos bioactivos, TF, FE, etc.).

Además, la suplementación de este aceite con una mezcla de TF y FE naturales, le confiere un valor agregado al mismo. Por un lado, incrementando la estabilidad del aceite, gracias al poder antioxidante de estos compuestos sobre los PUFA, y, por otro lado, por el enriquecimiento del aceite en compuestos con propiedades benéficas para la salud humana. Al mismo tiempo, la recuperación de los TF y FE, a partir de DD de la industria aceitera, resulta en el aprovechamiento de un desecho industrial, como una fuente económica para la obtención de compuestos bioactivos.

Por estas razones, nos resultó relevante investigar en el presente trabajo de Tesis, algunos de los potenciales efectos benéficos que podría tener tanto el aceite de lino virgen, como la suplementación de aceites comestibles con una mezcla de TF y FE, en los mecanismos involucrados en la prevención o atenuación del desarrollo de la enfermedad del hígado graso. Para tal fin, se analizaron los mecanismos involucrados en la regulación de lípidos hepáticos, alteraciones en la utilización de la glucosa y parámetros relacionados, en un modelo experimental que comparte los elementos característicos de la NAFLD humano.

Los resultados de esta investigación podrían contribuir a la profundización del conocimiento sobre las propiedades bioactivas de los compuestos presentes en el aceite de lino, así como también, de algunos de los compuestos funcionales obtenidos a partir de DD de la industria aceitera. Además, contribuir para una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos implicados en la enfermedad del hígado graso no alcohólico, así como también, de los marcadores bioquímicos utilizados para la detección y el seguimiento de la misma.

Objetivos

HIPÓTESIS DE TRABAJO

De lo especificado anteriormente, para la construcción de la hipótesis es relevante destacar que: 1) la NAFLD se caracteriza por una acreción significativa de TAG a nivel hepático y la progresión de NAFLD a NASH es inducida, por una acumulación de especies lipotóxicas (como el colesterol libre), daño peroxidativo e inflamación; 2) A que los modelos de ratas alimentadas con dietas ricas en grasas han demostrado manifestar los elementos característicos de la NAFLD; 3) Los efectos benéficos del aceite de lino rico en PUFA n-3 sobre la acreción de lípidos hepáticos; 4) El efecto hipocolesterolémico y antioxidante de los FE; 5) Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los TF; la hipótesis del presente trabajo de tesis es que una mezcla de estos lípidos funcionales podría prevenir la acumulación de TAG hepáticos característica del NAFLD, junto con sus alteraciones metabólicas asociadas, en un modelo de animales tratados con dietas ricas en grasas.

OBJETIVOS

En función de lo expuesto anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos del trabajo de tesis:

Objetivo general

Investigar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en el potencial efecto preventivo de una combinación sinérgica de lípidos funcionales compuesta por aceite de lino y destilados de desodorización purificados de aceite de soja sobre el desarrollo de hígado graso no alcohólico, y sus alteraciones asociadas, en un modelo animal de ratas alimentadas con dietas ricas en grasas.

Objetivos específicos

A los fines de lograr el objetivo general se propone, en un modelo experimental de esteatosis moderada, los siguientes objetivos específicos:

1.- Evaluar, durante los tratamientos experimentales, parámetros nutricionales incluyendo: consumo de alimentos, ingesta energética y ganancia de peso.

- 2.- Estudiar, al final del tratamiento dietario: composición corporal, peso del hígado y de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal.
- 3.- Determinar los potenciales cambios en los niveles séricos de TAG, Col y glucosa.
- 4.- Evaluar la capacidad de asimilación y metabolización de la glucosa por los tejidos periféricos a través de un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG).
- 5.- Determinar la incorporación de los principales PUFA n-6 y n-3 en los lípidos de suero, hígado y tejido adiposo epididimal; como así también la estimar la capacidad de biosíntesis hepática de LC-PUFA de las familias n-3 y n-6.
- 7.- Cuantificar el contenido de TAG, Col total, Col libre y Col esterificado en hígado.
- 8.- Evaluar la secreción hepática *in vivo* de VLDL-TAG.
- 9.- Analizar las actividades y expresiones relativas de algunas de las enzimas claves de la lipogénesis y β -oxidación de AG a nivel hepático.
- 10.- Determinar la expresión relativa de factores de transcripción claves en la regulación del metabolismo lipídico en el tejido hepático.
- 11.- Evaluar la expresión relativa de las proteínas involucradas en la captación y transporte de AG en hígado.
- 12.- Determinar el daño peroxidativo y el estado inflamatorio a nivel hepático.
- 13.- Analizar los cambios histológicos en hígado mediante el estudio semi-cuantitativo de los principales elementos de la NAFLD.

Materiales

y

métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Para investigar los posibles efectos benéficos del aceite de lino y la suplementación con TF y FE, obtenidos a partir de DD, sobre la posible prevención o atenuación del NAFLD, se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV-UNL). Tanto durante el período de aclimatación como durante el período experimental, los animales fueron mantenidos en condiciones controladas (23 ± 2 °C y ciclo luz-oscuridad de 12 horas), con libre acceso a agua y comida. Todos los estudios fueron programados según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (K. Bayne, 1996) y fueron aprobadas por el comité de ética de la FBCB-UNL.

2. Dietas experimentales

Las dietas experimentales empleadas para los diferentes lotes de animales fueron preparadas en el laboratorio a partir de componentes de grado alimenticio, según un modelo de dieta estándar en base a las recomendaciones establecidas por el comité *ad hoc* del Instituto Americano de Nutrición (AIN-93G) para roedores en crecimiento (K. Bayne, 1996).

- **Soja al 7% (S7)**: dieta control según las recomendaciones establecidas por el comité *ad hoc* del Instituto Americano de Nutrición (AIN-93G) para roedores en crecimiento, conteniendo 7% (p/p) de aceite de soja.
- **Soja al 30% de grasa (S30)**: Dieta rica en aceite de soja (30% -p/p-), obtenida a partir de la sustitución de 23% (p/p) de hidratos de carbono (almidón) de la dieta S7, por 23% (p/p) de aceite de soja.
- **Maíz al 30% de grasa (M30)**: Dieta rica en aceite de maíz (30% -p/p-), obtenida a partir de la sustitución de 27% del aceite de soja de la dieta S30 por 27% de aceite de maíz.
- **Lino al 30% de grasa (L30)**: Dieta rica en aceite de lino (30% -p/p), obtenida a partir de la sustitución de 27% del aceite de soja de la dieta S30 por 27% de aceite de lino.
- **Soja al 30% de grasa + DD (S30DD)**: Dieta rica en aceite de soja suplementada con 1% (p/p) de DD. La misma fue obtenida a partir de la sustitución de 1% (p/p) de aceite de soja de la dieta S30 por 1% de DD. Contenido total de grasa dietaria: 30% (p/p).

- **Maíz al 30% de grasa + DD (M30DD)**: Dieta rica en aceite de maíz suplementada con 1% (p/p) de DD. La misma fue obtenida a partir de la sustitución de 1% (p/p) de aceite de maíz de la dieta M30 por 1% de DD. Contenido total de grasa dietaria: 30% (p/p).

- **Lino al 30% de grasa + DD (L30DD)**: Dieta rica en aceite de lino suplementada con 1% (p/p) de DD. La misma fue obtenida a partir de la sustitución de 1% (p/p) de aceite de lino de la dieta L30 por 1% de DD. Contenido total de grasa dietaria: 30% (p/p).

Todas las dietas cumplieron las recomendaciones de AG esenciales para así evitar cualquier posible alteración como consecuencia de un déficit dietario de los mismos, además, fueron preparadas semanalmente, conservadas a -20°C y ofrecidas a los animales *al libitum* diariamente durante el período experimental (60 días).

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales (g/kg dieta). S, aceite de soja; M, aceite de maíz; L, aceite de lino; DD, destilados de desodorización; Cis, cisteína; Met, metionina; Col, colina. †Mezcla de Vitaminas (por kg de dieta): nicotinamida, 30.0 mg; pantotenato cálcico, 15.0 mg; piridoxina, 6.0 mg; tiamina, 5.0 mg; riboflavina, 6.0 mg; ácido fólico, 2.0 mg; vitamina K, 750.0 µg; D-biotina, 200.0 µg; vitamina B12, 24.0 µg; retinil acetato, 1.2 mg; colecalciferol, 0.025 mg; DL- α -tocoferol acetato, 50 mg. ‡Mezcla de minerales (mg/kg de dieta): Ca, 5000.0; P, 1561.0; K, 3600.0; S, 300.0; Na, 1019.0; Cl, 1571.0; Mg, 507.0; Fe, 35.0; Zn, 30.0; Mn, 10.0; Cu, 6.0; iodo, 0.2; Mo, 0.15; Se, 0.15; Si, 5.0; Cr, 1.0; F, 1.0; Ni, 0.5; B, 0.5; Li, 0.1 and V, 0.1.

g/100 g de dieta	S7	S30	M30	L30	S30D	M30DD	L30DD
ACEITE DE SOJA	7	30	3	3	29	2	2
ACEITE DE MAÍZ	-	-	27	-	-	27	-
ACEITE DE LINO	-	-	-	27	-	-	27
DD	-	-	-	-	1	1	1
CASEÍNA	20	20	20	20	20	20	20
ALMIDÓN	52.95	29.95	29.95	29.95	29.95	29.95	29.95
SACAROSA	10	10	10	10	10	10	10
FIBRAS	5	5	5	5	5	5	5
VITAMINAS †	1	1	1	1	1	1	1
MINERALES ‡	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
CIS/MET/COL	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
ENERGÍA (KJ/G)	16.52	21.33	21.33	21.33	21.33	21.33	21.33

Para la obtención del aceite de lino, semillas de lino de la variedad *Caburé*, provistas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Entre Ríos, Argentina), fueron prensadas en frío en nuestro laboratorio, utilizando una prensa HONGLE Model PX7-550. El aceite de lino obtenido por prensado simple fue posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos para remover el material sólido suspendido. Finalmente, el mismo fue conservado en condiciones controladas hasta su utilización en la producción de las dietas experimentales.

La fracción purificada de DD de aceite de soja, rico en TF y FE, fue obtenida como parte de la Tesis Doctoral de Emilse Negro en el marco de proyectos de I+D que se desarrollan en nuestro grupo de trabajo. Dicho procedimiento se basa en la técnica de Moreira, 2004 (Moreira & Baltanás, 2004).

El grupo S30 (conteniendo 53% de calorías como grasas), tuvo como fundamento estimular la acreción de lípidos en tejidos claves para producir algunas de las alteraciones características de la NAFLD. Frente a dicho grupo, por un lado, las dietas M30 y L30 permiten inferir sobre los efectos ocasionados por los cambios composicionales en los AG dietarios. Es importante destacar que, pese a que los tres aceites son ricos en su contenido de PUFA, poseen distintas proporciones PUFA n-6/PUFA n-3. El aceite de lino posee los niveles más bajos de la relación n-6/n-3 entre los aceites dietarios (1/3); seguido del aceite de soja, el cual posee la proporción recomendada actualmente (8/1); y por último el aceite de maíz, el cual posee la mayor relación n-6/n-3 entre los aceites dietarios (20/1) representando los perfiles de estas familias de AG consumidas en la dieta occidental. Por otra parte, las dietas suplementadas con DD (S30DD, M30DD y L30DD) permiten evaluar el potencial efecto sinérgico de la suplementación con TF y FE, sobre el desarrollo del NAFLD. Así, la suplementación con DD persigue dos finalidades. Por un lado, al trabajar con aceites con un alto contenido de PUFA, los TF y FE adicionados cumplen una función protectora sobre los mismos mediante su actividad antioxidante. Por otro lado, el agregado de estos compuestos con propiedades bioactivas permite evaluar si, en la dosis utilizada en el presente trabajo, logran un efecto sinérgico al de los AG dietarios sobre la prevención o atenuación del desarrollo de la NAFLD.

La evaluación de la composición de AG de los lípidos constituyentes de los aceites utilizados para las dietas experimentales fueron determinados por cromatografía gaseosa (GC) a través de la técnica de Masson et al. (2015), la cual se explica con detalles en el apartado 6.

La composición de AG de las dietas experimentales se muestra en las **Tabla 2**.

Debido a la presencia de un elevado % de PUFA, se preservó la calidad de los lípidos dietarios para minimizar procesos de oxidación a través de la eliminación del oxígeno por desplazamiento con gas nitrógeno y se controló antes de su uso el grado de deterioro mediante la evaluación del índice de peróxidos, AGL y formación de dienos, trienos y tetraenos conjugados por análisis espectrales de absorción.

Tabla 2: Principales ácidos grasos de los aceites dietarios. Los valores del contenido de AG están expresados como un porcentaje de los FAME totales (FAME: fatty acids methyl esters); MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; SFA: ácidos grasos saturados; S, aceite de soja; M, aceite de maíz; L, aceite de lino.

% total de FAME	Soja	Maíz	Lino
16:0	10.63	11.24	5.81
9c-16:1	0.06	0.08	0.05
18:0	5.29	1.80	5.33
9c-18:1	22.47	30.17	18.55
11c-18:1	1.40	0.60	0.73
9c,12c-18:2	51.90	19.65	14.83
9c,12c,15c-18:3	6.00	0.93	53.59
% PUFA	58.39	20.58	68.66
% MUFA	24.50	65.42	19.68
% SFA	17.11	14.00	11.65
Relación n-6/n-3 PUFA	8.72	21.09	0.28

3. Tratamiento y seguimiento de los animales

Los animales fueron alimentados con dieta estándar de laboratorio para ratas en crecimiento, y luego de un período de aclimatación en el bioterio, ya habiendo alcanzado los 100 ± 10 g de peso, fueron distribuidos aleatoriamente en los 7 grupos experimentales y alimentados durante 60 días con alguna de las dietas experimentales mencionadas anteriormente. Para

desarrollar las diferentes experiencias se emplearon 3 lotes de los 7 grupos dietarios, con un tamaño muestral de 6 animales por grupo (n=6).

Un lote de animales fue utilizado para evaluar la composición corporal y la eficiencia energética de las dietas. Para ello, se realizó diariamente, un registro del peso de los animales junto con el de la ingesta de alimento (comida ofrecida y resto de alimento).

3.1- Ingesta energética

La ingesta energética se calculó multiplicando la ingesta dietaria (g) por la densidad calórica de la dieta (KJ/g de alimento). La ingesta dietaria se determinó por la diferencia entre la comida ofrecida y remanente, corregidos por los cambios en la humedad. Para corregir los cambios en el contenido de agua, se llevó a peso constante una fracción de la dieta proporcionada y el remanente de la dieta ofrecida. Con el factor de corrección de humedad estimado por el peso seco/ peso húmedo de la dieta ofrecida, y el peso seco de la dieta remanente, se determinó la masa de alimento sobrante en base seca.

3.2- Ganancia de peso

Con los datos obtenidos del registro diario de peso de los animales de cada grupo experimental (promedio \pm SEM), se confeccionaron curvas de peso. Se calculó, además, la ganancia de peso por diferencia entre el peso final e inicial del tratamiento dietario.

3.3- Sacrificio de los animales y toma de muestras

Al finalizar el tratamiento dietario experimental, los animales fueron ayunados 8-10 hs. y sacrificados (9.00-11.00 am) bajo anestesia (1 mg acepromicina + 100 mg ketamina/Kg peso). Se extrajeron muestras de sangre por punción cardíaca con o sin anticoagulante (según corresponda) y se centrifugaron a 4°C. El plasma/suero obtenido fue dividido en alícuotas y procesado de inmediato, o congelado a -80°C hasta el momento de su valoración, según corresponda. Hígado, tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TAR) y músculo gastrocnemio fueron extraídos en forma completa, pesados y alícuotas de cada uno de ellos fueron congeladas con una pinza enfriada en nieve carbónica, mortarizados y conservados en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento. Para los análisis histológicos se seccionó el extremo del lóbulo mayor del hígado de los animales pertenecientes a los diferentes grupos dietarios, se pesó y posteriormente se introdujo en una canasta dentro de una solución de formol bufferado 10%, para luego confeccionar los tacos de parafina. Finalmente, los animales fueron

eviscerados para la obtención de las carcasas, las cuales fueron pesadas y extendidas en bandejas para su análisis composicional.

4. Composición corporal

4.1- Determinación del contenido de agua

El contenido de agua fue determinado mediante método de secado térmico a 60°C (Windham, 1999), por diferencia de pesadas entre peso inicial y peso final determinado hasta pesada constante. Los resultados se expresaron como g de agua/100 g de carcasa.

Las carcasas secas fueron trituradas hasta obtener una muestra homogénea, a partir de la cual, distintas alícuotas fueron utilizadas para las determinaciones del contenido de proteínas y grasas.

4.2- Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación de nitrógeno (N) en alícuotas de carcasas secas y trituradas se realizó mediante el método de Kjeldahl (Windham, 1999). Para ello, la muestra se digirió en caliente con H₂SO₄ concentrado con el fin de destruir oxidativamente la materia orgánica. De esta manera todo el N orgánico fue transformado en NH₃, el cual quedó retenido como (NH₄)₂SO₄. El proceso fue acelerado mediante catalizadores como CuSO₄ y Se, y por elevación de la temperatura de ebullición del H₂SO₄ por el agregado de Na₂SO₄ o K₂SO₄ anhidro. El resto de la materia orgánica fue transformada en CO₂ y H₂O, que se eliminó por calentamiento. El NH₄⁺ se transformó en NH₃ por adición de una solución alcalina (NaOH concentrado). Este NH₃ fue arrastrado por vapor de agua y recibido en un frasco colector conteniendo HCl 0,1N. El exceso de HCl que no reaccionó con el NH₃ se tituló con NaOH 0,1N hasta neutralizar la solución (por viraje del indicador). Los miliequivalentes de N cuantificados corresponden a la diferencia entre los miliequivalentes de HCl totales presentes en el frasco colector y los miliequivalentes de NaOH necesarios para neutralizar la solución. El contenido total de N de la carcasa se afectó por el factor de conversión 6,25 con el fin de estimar la cantidad de proteínas presentes (Rafecas et al., 1994). Los resultados se expresaron como g de proteínas/100 g de carcasa.

4.3- Determinación del contenido de grasa

La cuantificación del contenido de grasa total se realizó en alícuotas de carcasas secas mediante el método extractivo con éter de petróleo utilizando el extractor tipo Twysselman. La

cantidad de grasa se obtuvo por gravimetría (Windham, 1999). Los resultados se expresaron como g de grasa/100 g de carcasa.

5. Parámetros metabólicos plasmáticos y tisulares

5.1- Cuantificación de triacilglicéridos en suero

La concentración de TAG en suero fresco fue determinada mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El método se basa en la hidrólisis enzimática (lipasas) de los TAG generando glicerol y AGL. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de la enzima glicerol kinasa y ATP, luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de la enzima glicerol fosfato oxidasa. El producto final de color es la quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 505 nm y la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TAG presentes en la muestra. Los resultados fueron expresados en g/l.

5.2- Cuantificación de colesterol total en suero

La concentración de colesterol (Col) total en suero fresco fue determinada mediante un método enzimático utilizando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres de Col por la enzima colesterol esterasa, liberando Col y AG. El Col producido en esta reacción, más el Col libre, es oxidado por acción de la enzima colesterol oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa y fenol, oxida el cromógeno 4-aminofenazona a un compuesto de color rojo. La quinona roja formada posee un pico de absorción a 505 nm y la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de Col presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/l.

5.3- Cuantificación de glucosa plasmática

La concentración plasmática de glucosa se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El fundamento se basa en que la glucosa circulante es oxidada por la enzima glucosa oxidasa, a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último en presencia de la enzima peroxidasa, oxida al cromógeno 4-aminofenazona a una quinonimina de color rojo cuya intensidad se mide

espectrofotométricamente a 505 nm y es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/l.

5.4- Cuantificación de TAG y colesterol total hepático

Para la cuantificación de TAG y Col hepático, se pesaron aproximadamente 20 mg de tejido, se adicionaron 9 volúmenes de H₂O destilada y se homogeneizaron en homogeneizador con vástago de teflón. Posteriormente, el homogeneizado obtenido se trasvasó a un tubo de centrífuga y se completó el volumen con 800 µl de H₂O destilada. A continuación, se siguió una adaptación del protocolo propuesto por Bligh & Dyer, (1959): a 0,8 ml de homogeneizado se le adicionaron 2 ml de metanol y 1 ml de cloroformo, se agitó en vortex 30 segundos para mezclar las fases y luego se incubaron en hielo durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se adicionaron 1 ml de cloroformo y 1 ml de H₂O destilada, se agitó en vortex por 30 segundos y luego se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Al cabo de la centrifugación, se extrajo la fase orgánica (cloroformo), y la misma se trasvasó a otro tubo, en el cual se llevó a evaporar el cloroformo bajo corriente de N₂. Finalmente, una vez evaporado el solvente, se procedió a re-suspender en el respectivo reactivo de trabajo, según corresponda, para seguir con la cuantificación de TAG y Col utilizando los kits mencionados en la sección 5.1 y 5.2, respectivamente. Los resultados fueron expresados como mg/g TH (tejido húmedo).

5.5- Cuantificación de colesterol libre y esterificado en hígado

Para la cuantificación de las fracciones de Col libre y esterificado, se siguió el protocolo descrito en la sección 5.5, basado en la técnica de extracción de Bligh & Dyer, (1959). Una vez evaporada la fase orgánica (cloroformo) se cuantificó el Col libre adicionando 1 ml del reactivo de trabajo del kit enzimático pero agregando 0,2 U/ml de la enzima colesterol oxidasa y 0,4 U/ml de la enzima peroxidasa, incubando por 30 minutos a 37°C y finalmente midiendo la absorbancia a 505 nm (Siedel, 1983). El Col esterificado se calculó como la diferencia entre el Col total (determinado bajo el procedimiento explicado en el punto 5.5) y el Col libre. Los resultados fueron expresados como mg/g TH.

6. Composición y relaciones de ácidos grasos circulantes y tisulares

El perfil de AG circulantes y tisulares se cuantificó mediante GC empleando un cromatógrafo gas-líquido marca Shimadzu (GC-2014), con detector FID y columna capilar CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm id x 20 mm de espesor). Los metil-ésteres de los AG circulantes y

tisulares fueron identificados por comparación con los tiempos de retención relativos a estándares comerciales.

La identificación y cuantificación de ésteres metílicos correspondientes a AG presentes en materias grasas, requiere de las siguientes etapas: obtención del extracto lipídico, derivatización de los AG, e identificación y cuantificación de AG.

6.1- Obtención del extracto lipídico

La extracción de la materia grasa se realizó mediante el método de Bligh & Dyer, (1959). Este método permite una rápida extracción de lípidos de tejidos o muestras que contienen una cantidad significativa de agua. El método se basa en la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua en proporciones 1:2:0,8 para formar una sola fase miscible con el agua de la muestra, que extrae, tanto la grasa libre, como estructural. La separación de fases se logra con la adición de alícuotas de cloroformo y agua. El material lipídico se encuentra en la fase orgánica, mientras que el material no lipídico se ubica en la fase acuosa. Los extractos fueron centrifugados, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica evaporada bajo corriente de gas N₂. Los extractos lipídicos obtenidos continuaron con su procesamiento o fueron resuspendidos en cloroformo y conservados en viales apropiados, herméticamente cerrados bajo corriente de gas N₂, a -80°C para su posterior análisis.

El volumen de suero utilizado fue de 0,8 ml para la extracción lipídica (ajustándose con el agregado de agua destilada, de ser necesario), ya que el contenido de agua de la muestra es crítico para conservar la proporción de cloroformo, metanol y agua, que permite la formación del sistema homogéneo.

6.2- Derivatización de AG

Para la derivatización de los AG es importante considerar que, incluso al estado de vapor, los mismos se encuentran en forma de un dímero, unidos por puente de hidrógeno. Esta estructura corresponde al doble de su peso molecular y se refleja en sus propiedades físicas, como el punto de ebullición. Así, los AG tienen sus puntos de ebullición anormalmente altos, lo cual impide su análisis directo por GC. Por esta razón los AG de los TAG presentes en la muestra son convertidos en ésteres metílicos con KOH 2N, previa disolución del extracto lipídico en hexano calidad HPLC. Los ésteres metílicos formados tienen un peso molecular algo mayor que el respectivo AG, pero, al romperse el puente de hidrógeno, bajan su punto de ebullición a la mitad, pudiendo ser analizados perfectamente por GC.

6.3- Identificación y cuantificación de ácidos grasos

La GC es una técnica de partición que permite que todo compuesto químico que habitualmente es un gas o susceptible de ser transformado en un gas, pueda ser identificado y cuantificado por esta metodología. Así, la muestra en estado gaseoso se reparte entre dos fases no miscibles: una gaseosa que corresponde al gas de arrastre o gas portador que es móvil, y una fase líquida estacionaria. A medida que va pasando el gas portador con la muestra formada por “n” componentes, la separación de cada uno de ellos se efectúa de acuerdo a su propio coeficiente de reparto entre el gas portador y la fase líquida. Los ésteres metílicos de los AG, de cualquier muestra de materia grasa, emergen como señales agudas denominadas picos, por lo tanto, la identificación se basa en comparar el tiempo que se demora (tiempo de retención) en emerger un pico determinado, con el tiempo que demora en hacerlo en iguales condiciones el éster metílico correspondiente al patrón conocido. El tiempo de retención del éster metílico de un AG en particular es característico para ese compuesto, que se ha analizado en una columna con una fase líquida específica, en condiciones estandarizadas de temperatura de la columna, temperatura del detector y del inyector, flujo del gas portador, iguales condiciones de partición de flujo conocido como “splits”. Este tiempo de retención total, se compara con el obtenido para el respectivo éster metílico de referencia, sometido a las mismas condiciones cromatográficas. Los resultados se expresaron como porcentaje de FAME (Masson et al., 2015).

6.4- Flujo a través de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico

El palmitato y el estearato son los precursores de los MUFA más abundantes en el tejido animal. El doble enlace es introducido en la cadena del AG mediante una reacción catalizada por la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (SCD). Para poder estimar el flujo de dicha enzima se realizó la relación porcentual producto/sustrato a partir de los niveles de dichos AG medidos por GC en hígado (Flowers, 2009; Sjögren et al., 2008).

$$\Delta 9\text{-desaturasa} \quad (9c\text{-}16:1 / 16:0) \times 100$$

$$(9c\text{-}18:1 / 18:0) \times 100$$

El LA (9c,12c-18:2) es uno de los dos AG absolutamente esenciales presente en la dieta, y es el precursor de los LC-PUFA de la serie n-6. Dentro de esta familia se destaca el DGLA (8c,11c,14c-20:3), que dará lugar a eicosanoides de la serie E1, y el AA (5c,8c,11c,14c-20:4) que deriva en eicosanoides de la serie E2 (con características pro-inflamatorias). Por otra parte, el ALA (9c,12c,15c-18:3) es otro AG esencial y es el precursor de los LC-PUFA de la serie n-3,

destacándose el EPA (5c,8c,11c,14c,17c-20:5), como principal precursor de los eicosanoides de la familia E3 (con características anti-inflamatorias), y el DHA (4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6). El metabolismo de los AG esenciales ocurre principalmente en el hígado e involucra reacciones de desaturación y elongación compartiendo las principales enzimas, como la $\Delta 5$ y 6-desaturasa y las elongasas 2 y 5 (Gibson et al., 2011; Hofacer et al., 2012; M. Wang et al., 2016). Para poder evaluar la biosíntesis de estos AG e intermediarios de ambas familias y estimar el flujo de las principales enzimas involucradas en esta vía, se realizó un cociente (porcentual) entre producto y sustrato, quedando conformado de la siguiente manera:

Biosíntesis de LC-PUFA n-6	$(AA / LA) \times 100$
$\Delta 6$ -desaturasa	$(GLA / LA) \times 100$
Elongasa 5	$(DGLA / GLA) \times 100$
$\Delta 5$ -desaturasa	$(AA / DGLA) \times 100$
Biosíntesis de LC-PUFA -3	$(DHA / ALA) \times 100$
Biosíntesis de EPA	$(EPA / ALA) \times 100$
Elongasa 2 y $\Delta 6$ -desaturasa	$(DHA / EPA) \times 100$

7. Actividad de enzimas reguladoras del metabolismo lipídico en hígado

7.1- Acetil-CoA carboxilasa

Para la determinación de la actividad de la enzima ACC (E.C. 6.4.1.2) se realizó un homogeneizado a partir de tejido hepático fresco en buffer fosfato pH: 7,0 (KH_2PO_4 9 mM, K_2HPO_4 85 mM, ditioneitol 1 mM y KHCO_3 70 mM) en proporción 1:10, el cual fue posteriormente centrifugado a 60.000g a 4°C durante 90 minutos, se separó el sobrenadante en dos alícuotas; en una se midió inmediatamente la actividad de ACC y la otra alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas utilizando la técnica de Bradford, (1976).

La actividad de la enzima ACC se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm con una mezcla de reacción a 37°C conteniendo: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), citrato de potasio 10 mM, MgCl_2 10 mM, glutatión 3,75 mM (pH 8,0), albúmina sérica bovina 0,75 mg/ml, acetil-CoA 0,125 mM, fosfoenolpiruvato 0,5 mM, NADH 0,125 mM, piruvato quinasa 15 $\mu\text{g/ml}$, lactato

dehidrogenasa 6 $\mu\text{g/ml}$ y cantidades adecuadas de sobrenadante en función de la concentración de proteínas. La reacción fue iniciada por la adición de ATP 150 mM y KHCO_3 1 M. La actividad de la enzima se determinó siguiendo el decaimiento de la absorbancia por oxidación del NADH durante 5 minutos y se expresó como nmol/min.mg proteína, donde una unidad de actividad enzimática representa 1 μmol de NADH oxidado por minuto a 37°C (Zimmermann et al., 2003).

7.2- Carnitina palmitoil transferasa-1a

La actividad de la enzima CPT-1a (E.C. 2.3.1.21) se determinó según Ling et al., (2012) con algunas modificaciones. Se realizó un homogeneizado (proporción 1:10) a partir de tejido hepático fresco en buffer (HEPES 20 mM pH 7,4, KCl 140 mM, EDTA 10 mM y MgCl_2 5 mM). El homogeneizado se centrifugó a 600g a 4°C durante 10 minutos, luego el sobrenadante se volvió a centrifugar a 9.500g a 4°C por 35 minutos; se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido con 500 μl de buffer, homogeneizado y centrifugado a 9.500g a 4°C por 10 minutos. Esta operación fue realizada en dos ocasiones. Por último, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet mitocondrial en 200 μl de buffer. Se determinó la concentración de proteínas siguiendo la técnica de Bradford, (1976). Para determinar la actividad total de CPT, se incubó a 37°C por 5 minutos 100 μg de proteínas del resuspendido con un buffer de reacción (HEPES 20 mM pH 7,4, sacarosa 220 mM, KCl 40 mM, EGTA 1 mM, ácido 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,1 mM, albúmina sérica bovina 1,3 mg/ml y palmitoil CoA 40 μM). La reacción se inicia con L-carnitina 1mM. La tasa de aparición de CoASH-DTNB se registró espectrofotométricamente a 412 nm. La actividad inespecífica se midió bajo las mismas condiciones en presencia de malonil CoA 10 μM (inhibidor de la CPT-1a). La actividad de CPT-1a se calculó por la diferencia entre la actividad total CPT menos la actividad inespecífica, y se expresó como nmol CoASH liberado por minuto por mg de proteína (nmol/min.mg proteína).

8. Actividad tisular de la enzima lipoproteína lipasa

8.1- LPL en tejido adiposo epididimal

La actividad total de la enzima LPL (E.C. 3.1.1.34) en TAE se determinó empleando el método fluorimétrico descrito por Del Prado et al., (1994). Para tal fin, una cantidad de TAE fresco se homogeneizó en frío con buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,2 a 4°C, en una proporción 0,2g de tejido/ml de buffer. Una alícuota del homogeneizado fue utilizada para la preparación de extracto enzimático "polvo de acetona" (Lutz et al., 1989). Esta preparación consistió en una doble extracción con acetona fría (dil. 1:4, -20°C) seguida de una doble extracción con éter

dietílico frío (dil. 1:4, -20°C). El polvo de acetona obtenido se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ (1 hora a 4°C) y se resuspendió en 1 ml de buffer NH₄Cl 25 mM pH 8,1 con 1 UI/ml de heparina. La concentración de proteínas en el resuspendido se determinó mediante la técnica de Bradford, (1976). Para la determinación de la actividad LPL se utilizó di-butiril fluoresceína (DBF) como sustrato enzimático, la cual fue sintetizada según Kramer & Guilbault, (1963). Para esto, 10 g de fluoresceína se mezclaron con 10 ml de piridina y 30 ml de anhídrido butírico, almacenada a temperatura ambiente por 24 hs. antes de la adición de 300 ml de etanol absoluto y finalmente, la mezcla se guardó a -20°C por 18 hs. El DBF fue recristalizado en 95% de etanol varias veces hasta remover las trazas de fluoresceína libre. La pureza del producto final se evaluó mediante un espectro de emisión, comprobando la ausencia de pico de excitación de fluoresceína a 490 nm.

La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia del hidrólisis enzimática del DBF. La reacción se realizó a 37°C en buffer fosfato 0,1 M pH 8 en presencia de 5% de 2-etoxietanol y 10 mM de DBF y se inició con la adición del polvo acetónico previamente resuspendido en 1 ml de buffer NH₄Cl 25 mM pH 8,1 con 1 UI/ml de heparina. Es importante considerar que los niveles de proteínas en la mezcla de reacción no deben superar los 15 mg, por tal motivo, en los resuspendidos de los polvos acetónicos se cuantificó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford, (1976).

Paralelamente, el mismo ensayo, fue llevado a cabo en presencia de NaCl 1M para inhibir la actividad enzimática específica. La actividad LPL en tejido adiposo se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 1M) de la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 1M). Los resultados se expresaron como nmol de fluoresceína liberada por minuto por gramo de tejido (nmol de fluoresceína/min/g).

8.2- LPL en músculo gastrocnemio

Una porción de músculo gastrocnemio fue homogeneizado (dil. 1:10) en una solución buffer NH₄Cl/NH₄OH-Heparina (50 mM, pH 8,6, conteniendo 4 UI/ml de heparina). Luego de reposar 15 minutos a 4°C los homogeneizados fueron centrifugados a 2.600g a 4°C durante 15 minutos obteniéndose los extractos crudos frescos tisulares. La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo durante 5 minutos el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$) producto de la liberación de fluoresceína como resultado de la hidrólisis enzimática del DBF. La reacción se llevó a cabo a 37°C en un buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 5% de

2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático (teniendo en cuenta de no superar los 15 mg de proteínas en la mezcla de reacción). La actividad medida fue expresada como nmol de fluoresceína liberada por minuto por gramo de músculo (nmol de fluoresceína/min/g).

9. Secreción hepática de TAG-pre- β -lipoproteínas

La velocidad de secreción de TAG-pre- β lipoproteínas (VSTG) se determinó *in vivo* utilizando la metodología propuesta por Otway & Robinson, (1967) modificada por Bernal et al., (1989). La misma se fundamenta en la inhibición de la remoción intravascular de las lipoproteínas de $\delta < 1,006$ g/ml por la administración de Triton WR 1339, de modo que los TAG se acumulan en el tiempo en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado. Animales pertenecientes a un segundo lote alimentado con alguno de los 7 tratamientos dietarios descritos, fueron ayunados 12-18 hs. Bajo la acción de anestesia, se administró por vía endovenosa una solución de Triton WR 1339 al 10% (v/v) en NaCl 0,9% (dosis: 600 mg/kg peso). Se tomaron muestras de sangre para el dosaje de TAG a tiempo 0 y 120 minutos (previo y dos horas posteriores a la administración de la droga). El volumen plasmático (Vp) se determinó en una experiencia paralela mediante la técnica de dilución del azul de Evans (C. Wang & Hegsted, 1949). La VSTG fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$VSTG_{(nmol/100g/min)} = \frac{([TAG]_{120} - [TAG]_0) \times Vp}{P \times t}$$

Siendo $[TAG]_{120}$ y $[TAG]_0$ las concentraciones de TAG a tiempo 120 y 0 minutos de la administración del Triton WR 1339 y expresadas en $\mu\text{mol/ml}$; el peso (P) en gramos del animal; Vp en ml y t en minutos.

En un trabajo previo ha sido demostrado que, en ratas, la dosis empleada es la que provee la máxima inhibición de la clarificación de lipoproteínas de muy baja densidad VLDL-TAG y que bajo estas condiciones el acúmulo de TAG en el plasma es lineal hasta los 150 minutos, razón por la que sólo se cuantificaron los niveles de TAG a los tiempos 0 y 120 minutos (Bernal et al., 1989).

10. Test de tolerancia oral a la glucosa

Con la finalidad de evaluar la capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos periféricos, se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG). El día de la experiencia, un lote de animales fue ayunado aproximadamente 10 hs. y se les administró por sonda oral una

solución de glucosa al 20% a razón de 1g de glucosa/ kg de peso corporal. Se recolectaron muestras de sangre de la cola en tubos conteniendo EDTA (18 mM de concentración final) inmediatamente antes y a los 30, 60, 120 y 180 minutos después de la incorporación de la glucosa (Teachey et al., 2003). Inmediatamente después de finalizado el TTOG, los animales recibieron subcutáneamente 2,5 ml de solución salina estéril 0,9% para compensar las pérdidas de plasma. Las concentraciones de glucosa en plasma a diferentes tiempos fueron cuantificadas mediante kit enzimático comercial. La respuesta al TTOG fue evaluada a través de la comparación de los valores individuales a cada tiempo y mediante la cuantificación del área integrada bajo la curva (AUC, 0 a 180 minutos).

11. Grado de peroxidación lipídica en hígado

El grado de peroxidación lipídica se evaluó a través del análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según el método de Buege & Aust, (1978), con algunas modificaciones. El método se fundamenta en la reacción del TBA con un producto secundario de la peroxidación lipídica, identificado como malonildialdehído (MDA), formado durante la incubación de homogeneizados tisulares bajo condiciones aeróbicas, para producir, en medio ácido y en caliente, un cromógeno rojo con un pico de absorción espectrofotométrica a 535 nm. Se homogeneizó 0,5 g de hígado en PBS 0,05 M; pH: 7,4; se tomaron 0,5 mL de cada homogeneizado y se le adicionó una mezcla compuesta por ácido tricloroacético (15%, v/v), ácido tiobarbitúrico (0,38 %, p/v) y HCl 0,25N. Posteriormente se incubó en un baño de agua a 90°C durante 45 min, luego se colocó en hielo 5 min y se centrifugó 15 min a 5.000 rpm. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm y los resultados se expresaron como nmol de MDA/mg prot, utilizando una curva estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano y cuantificando las proteínas según Bradford, (1976).

12. Niveles de ARNm de diferentes parámetros metabólicos en hígado

El ARN total fue aislado a partir de 100 mg de hígado utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con kit DNA-free (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para remover cualquier contaminación con ADN genómico. El rendimiento y calidad del ARN fue evaluado por medidas de absorbancia a 230, 260, 280 y 310 nm. De cada muestra, 1 µg de ARN total fue sometido a transcripción reversa para sintetizar la primera cadena de ADN complementaria (ADNc) usando el kit de síntesis FIREScript® KIT (Solis BioDyne).

Se analizaron los niveles de ARNm de las enzimas vinculadas a la lipogénesis y síntesis de AG: FAS, SCD1 y de las principales enzimas vinculadas a la β -oxidación: CPT-1a, ACOX1 y CyP450. También se evaluó la expresión génica de los factores de transcripción: SREBP-1c, PPAR α , de las proteínas transportadoras de ácidos grasos: FATP2, FATP5, CD36 y de una de las proteínas claves en la secreción de VLDL: Mttp.

Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados utilizando la información disponible en GenBank, utilizando el programa SnapGene® v7.0.2, junto con la herramienta Primer-BLAST provista por el NCBI®. Por último, los oligonucleótidos diseñados, fueron sintetizados comercialmente (Invitrogen Argentina S.A.-Thermo Fisher Scientific) y las secuencias se detallan a continuación (**Tabla 3**).

Tabla 3: Secuencia de los oligonucleótidos diseñados.

Genes	ID GenBank	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
<i>Acox1</i>	NM_017340.2	CCCGTCCCAAGAACTCCAGA	GCCTCGAAGATGAGTTCCGTG
<i>Cd36</i>	NM_031561.2	GTACTCTCTCCTCGGATGGC	ATGTGGCCTGGTTCAACTAAT
<i>Cpt-1a</i>	NM_031559.2	ACGTGAGTGACTGGTGGGAAGAAT	TCTCCATGGCGTAGTAGTTGCTGT
<i>Cyp4a</i>	NM_175837.1	CTTTCGTGTGAGGAGTGCC	CTCCATCTGTGTGCTCATGAG
<i>Fas</i>	NM_017332.1	CAGAACTCTTCCAGGATGTCAACA	GTCGCCCTGTCAAGGTTCCAG
<i>Fatp2</i>	NM_031736.1	GTGGTTGGGGCTACATTTGC	GTACCGAAGCAGTTCACCGA
<i>Fatp5</i>	NM_024143.2	GCTGCTTACAACCTGGAGCC	GGTTGCCCTGGGACATTACA
<i>Mttp</i>	NM_001107727.1	CGAGTGAAAAATCGGGTGGC	GGGTACTGGGAGAAGTGCAC
<i>Ppara</i>	NM_013196.1	CCCCACTTGAAGCAGATGACC	CCCTAAGTACTGGTAGTCCGC
<i>Scd1</i>	NM_139192.2	CACACGCCGACCCTCACAACCT	TCCGCCCTTCTCTTTGACAGCC
<i>Srebp-1c</i>	NM_001276708.1	GGAGCCATGGATTGCACATT	GCTTCCAGAGAGGAGCCCAG
β -actina	NM_031144.3	ACAACCTTCTTGACGCTCCTC	TCATCCATGGCGAACTGGTGG
<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	TCCTCCTCAGACCGCTTTTC	ATCACTAATCACGACGCTGGG

En primera instancia, se realizaron curvas estándar para cada par de oligonucleótidos, utilizando diluciones seriadas (1/10 - 1/1250) de un pool de muestras de ADNc. La eficiencia correspondiente a cada par de primers fue calculada de un ciclo en fase exponencial, de acuerdo con la ecuación $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$ (Rasmussen et al., 2001). A partir de la curva obtenida, se definió la dilución de trabajo para la cuantificación de los genes de interés. Todas las eficiencias de los primers utilizados fueron $100 \pm 10\%$.

Los niveles de ARNm relativos fueron cuantificados usando PCR en tiempo real con un equipo de detección StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Se tomó 1 μ l de cada

ADNc diluído 1/50 para la mezcla de reacción de PCR, HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne) con los primers (par de oligonucleótidos) correspondientes. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron: 1º ciclo de desnaturalización a 95°C por 15 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos combinados con ciclos de anillado (donde la temperatura fue ajustada a cada par de primers) por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos. Los genes en estudio fueron normalizados con la media geométrica de dos genes de referencia: β -actina, e hipoxantina fosforibosiltransferasa-1 (Hprt1) (Vandesompele et al., 2002). Los resultados fueron expresados usando el método recomendado de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

13. Análisis histológico

13.1- Obtención de los tacos

Como se menciona en la sección 3.3, al momento de la cirugía, una porción del hígado (de entre 5-7 mm) se disecó y colocó en una canasta dentro de un recipiente con formol bufferado 10% durante 10hs para fijar el tejido y preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las correspondientes en su estado vivo. Una vez fijado el tejido, se procedió con la inclusión en parafina. Para este proceso, se sucedieron las canastas por una serie de tres frascos con agua corriente, para lavar el remanente de formol. Seguido a esto, se procedió a deshidratar el tejido pasando las canastas por recipientes con concentraciones crecientes de etanol para que la parafina ocupe todo el tejido. Seguido al proceso de deshidratación, se realizó el proceso de diafanización, en el cual se transfirió el tejido a Xilol, un líquido que es tanto miscible en alcohol 100% como en parafina, y que además posee la capacidad para despigmentar o aclarar el tejido para que pueda ser posteriormente teñido. Finalmente, se transfirió el tejido a parafina previamente licuada en estufa a 60°C, haciendo incubaciones sucesivas en soluciones de parafina líquida, para favorecer una completa sustitución del xilol por la parafina. Finalizada la infiltración completa de la muestra, se introdujo la muestra en un molde de aluminio de 2,5 x 2,5 x 2,5 cm, se vertió parafina líquida y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

13.2- Tinción de los tacos

Secciones de aproximadamente 8 μ m de espesor y adheridas a un portaobjetos, fueron utilizadas para la tinción con Hematoxilina-Eosina. En primer lugar, se re-disolvió la parafina con xileno, y posteriormente, se siguió un camino opuesto al realizado para la inclusión, buscando

rehidratar progresivamente el preparado, para que luego puedan incorporarse a este los colorantes histológicos.

Una vez rehidratado el preparado, se procedió a teñir con hematoxilina, la cual tiñó los núcleos y algunos otros elementos de color morado rojizo, el cual luego de pasar por agua corriente, se vuelve de un color azul oscuro. Luego, se realizó la contratinción con una solución acuosa de eosina, la cual tiñe muchos elementos no nucleares en diferentes tonos de rosa. Tras la tinción con eosina, la preparación se pasó nuevamente por una serie de soluciones de etanol de concentración creciente para eliminar todos los restos de agua, y finalmente se aclaró en xileno. Pasado por el xileno, se aplicó medio de montaje, por encima el portaobjetos y se dejó evaporar el xileno de los preparados en campana.

13.3- Análisis histológicos H-E

Los preparados teñidos con hematoxilina-eosina se evaluaron mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio Motic BA210E (Motic® Group, China). Las microfotografías se tomaron con la cámara Moticam X3 Plus y el software Motic Images Plus 3.0. Las lesiones se evaluaron utilizando los criterios establecidos por Liang et al., (2014). De acuerdo con esto, los preparados fueron recorridos a un aumento de 400x para el análisis morfológico a ciegas, considerando: esteatosis macrovesicular cuando las LD desplazaron el núcleo hacia la periferia la célula, mientras que se consideró esteatosis microvesicular cuando el citoplasma de los hepatocitos estaba lleno de pequeñas LD y el núcleo permanecía ubicado en el centro de la célula. Siguiendo estos criterios, mediante el programa ImageJ (ImageJ v.1.53t; Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.) se cuantificaron, en primera instancia, el número total de hepatocitos en cada imagen y luego el número de hepatocitos afectados con micro- o macrovesículas lipídicas en dicha imagen. A partir de esa información, se calculó el porcentaje de micro- y macroesteatosis de cada imagen, respectivamente, como:

$$\% \text{Macroesteatosis} = \frac{\text{Número de hepatocitos con macrovesículas en la imagen}}{\text{Número total de hepatocitos en la imagen}}$$

$$\% \text{Microesteatosis} = \frac{\text{Número de hepatocitos con microvesículas en la imagen}}{\text{Número total de hepatocitos en la imagen}}$$

Los hepatocitos balonizados se caracterizan por poseer poblaciones de LD de gran tamaño, edema y rarefacción del citoplasma. Son células agrandadas, de apariencia clara, con material residual granular intracitoplasmático. Para cuantificar el porcentaje de hepatocitos balonizados se procedió en forma similar a la cuantificación del porcentaje de esteatosis:

$$\% \text{Hepatocitos balonizados} = \frac{\text{Número de hepatocitos balonizados en la imagen}}{\text{Número total de hepatocitos en la imagen}}$$

Finalmente, se cuantificó el número de agregados inflamatorios en dichas muestras. Según el criterio establecido por Liang et al., (2014), un agregado se define como un *cluster* de 5 o más células inflamatorias, y esto se evaluó contando el número de agregados inflamatorios por campo en el aumento de 100x.

13.4- Análisis histológico Sirius Red

Una parte de los cortes montados, se colorearon con la tinción de Sirius Red para evaluar el desarrollo de fibrosis en los hígados de los animales tratados con las diferentes dietas. Para esta tinción se procedió con un protocolo similar a la tinción de H-E del punto 13.2 de la metodología. En primera instancia, se procedió a desparafinizar y rehidratar el tejido para que pueda ser teñido con el colorante acuoso. Posteriormente se disolvieron 0.5g de Sirius red F3B en 500 ml de una solución saturada de ácido pícrico, y se dejaron los preparados 1 hora en esta solución. Seguidamente se hicieron 2 lavados con agua acidificada (5 ml de ácido acético glacial en 1 L de H₂O destilada), se deshidrató el preparado pasándolo por 3 soluciones de alcohol 100%, se limpió en xileno y posteriormente se agregó el medio de montaje y el portaobjetos para visualizar el preparado al microscopio.

Al microscopio óptico, en esta tinción las fibras de colágeno se visualizan de color rojo sobre un fondo amarillo pálido. A su vez, bajo la luz polarizada, con este tipo de tinción se pueden

diferenciar las fibras de colágeno de tipo I y tipo III por birrefringencia: el colágeno de tipo I aparece de color amarillo, mientras que el colágeno de tipo III aparece en verde. Los hígados normales contienen cantidades aproximadamente similares de colágeno tipo I y tipo III; pero en los hígados con cirrosis suele predominar el colágeno de tipo I.

Para la cuantificación del grado de fibrosis, se calculó la “collagen proportionate area” (CPA) de la siguiente manera:

$$\text{CPA} = \frac{\text{Área total del tejido teñida}}{\text{Área total del tejido}} * 100$$

Para la cuantificación del área de las microfotografías obtenidas, se utilizó el programa ImageJ previamente mencionado en la sección 13.3.

14. Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa Minitab® 17.1.0 (Minitab Inc.). Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM), y utilizando para el análisis estadístico un número de 6 ratas por grupo (n=6), procurando la máxima optimización de los animales. Los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia de 0,05 (se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0,05$). Para evaluar el efecto del consumo de una dieta rica en grasa, se realizó un test t de *Student* entre los grupos S7 y S30. Para analizar los efectos en las dietas HF, se realizó un ANOVA 2 x 3 de la siguiente manera: factor 1: 2 niveles, con o sin DD; factor 2: 3 niveles, S30, M30, L30. Para verificar los supuestos de la prueba ANOVA, primero realizamos una prueba de Ryan-Joiner para verificar el supuesto de normalidad, y luego una prueba de Levene's para verificar el supuesto de homogeneidad de la varianza. Con el ANOVA mencionado anteriormente, se analizaron las diferencias debidas a: el tipo de aceite dietario (Soja, Maíz o Lino), la suplementación o no con DD (mezcla TF+FE), y la interacción entre ambos factores. Se aplicó un análisis post-hoc de Tukey sobre todas las combinaciones de niveles de factores, cuando la interacción fue estadísticamente significativa, o sobre los niveles del factor con diferencias estadísticamente significativas cuando no hubo interacción.

Resultados

RESULTADOS

1. Parámetros nutricionales

1.1- Consumo de alimento e ingesta energética

Todos los animales correspondientes a los distintos lotes experimentales aceptaron las dietas suministradas, sin manifestar rechazo o resistencia a la ingesta de las mismas, lo cual se refleja a través de la ingesta energética diaria promedio (**Tabla 4**) y por el registro del aumento continuo de peso corporal desde el inicio hasta el final del período experimental (**Figura 11**). Como es de esperar, al incrementar la densidad energética de la dieta (S30 vs. S7), se observó una menor ingesta de alimento (g/día). Sin embargo, el grupo S30 presentó mayor ingesta energética que el grupo S7. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el promedio diario de la comida ingerida, ni en la ingesta energética entre los grupos alimentados con dietas ricas en grasa.

1.2- Ganancia de peso y composición corporal

Los animales del grupo S30 respecto al control experimental (S7) mostraron un mayor incremento de la ganancia de peso, el cual estuvo asociado a una mayor ingesta energética. Entre los grupos ricos en grasas, a pesar de que no se evidenciaron diferencias en la ingesta energética, se observó una menor ganancia de peso en los grupos L30 y L30DD, alcanzando diferencias estadísticas cuando se lo compara con el grupo M30 (**Tabla 4**).

Los posibles cambios en la composición corporal inducidos por las diferentes dietas se evaluaron mediante el contenido de lípidos, proteínas y agua en las carcasas correspondientes a los animales eviscerados de cada grupo experimental. Si bien los animales del grupo L30DD mostraron la menor acreción de lípidos en carcasas, la composición corporal no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Tabla 4: Consumo de alimentos, ingesta energética, ganancia de peso y composición corporal. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

S7	S30	M30	L30	S30DD	M30DD	L30DD
<i>Comida ingerida en base seca (g/día)</i>						
20,35 \pm 2,25	18,23 \pm 1,15*	17,29 \pm 1,08	17,13 \pm 0,93	17,04 \pm 0,88	17,49 \pm 1,04	17,87 \pm 0,98
<i>Ingesta energética (KJ/día)</i>						
321,20 \pm 7,39	368,87 \pm 13,44*	376,92 \pm 14,48	358,99 \pm 10,15	375,33 \pm 16,17	366,14 \pm 8,91	353,38 \pm 33,32
<i>Ganancia de peso (g)</i>						
251,79 \pm 4,79	267,50 \pm 5,46* ^{ab}	271,41 \pm 4,04 ^a	248,06 \pm 7,41 ^b	261,63 \pm 5,32 ^{ab}	265,00 \pm 5,18 ^{ab}	245,93 \pm 4,87 ^b
<i>Composición corporal (g/100g)</i>						
<i>Proteínas</i>						
19,37 \pm 0,88	21,12 \pm 0,38	20,59 \pm 0,62	21,32 \pm 0,22	20,14 \pm 0,08	20,78 \pm 0,46	21,08 \pm 0,22
<i>Lípidos</i>						
23,11 \pm 0,49	21,06 \pm 1,49	21,97 \pm 1,05	23,21 \pm 0,99	23,01 \pm 0,57	22,27 \pm 1,57	19,53 \pm 0,58
<i>Agua</i>						
56,48 \pm 0,59	56,67 \pm 1,42	57,36 \pm 0,52	55,67 \pm 0,79	54,84 \pm 0,66	56,51 \pm 1,28	56,91 \pm 0,90

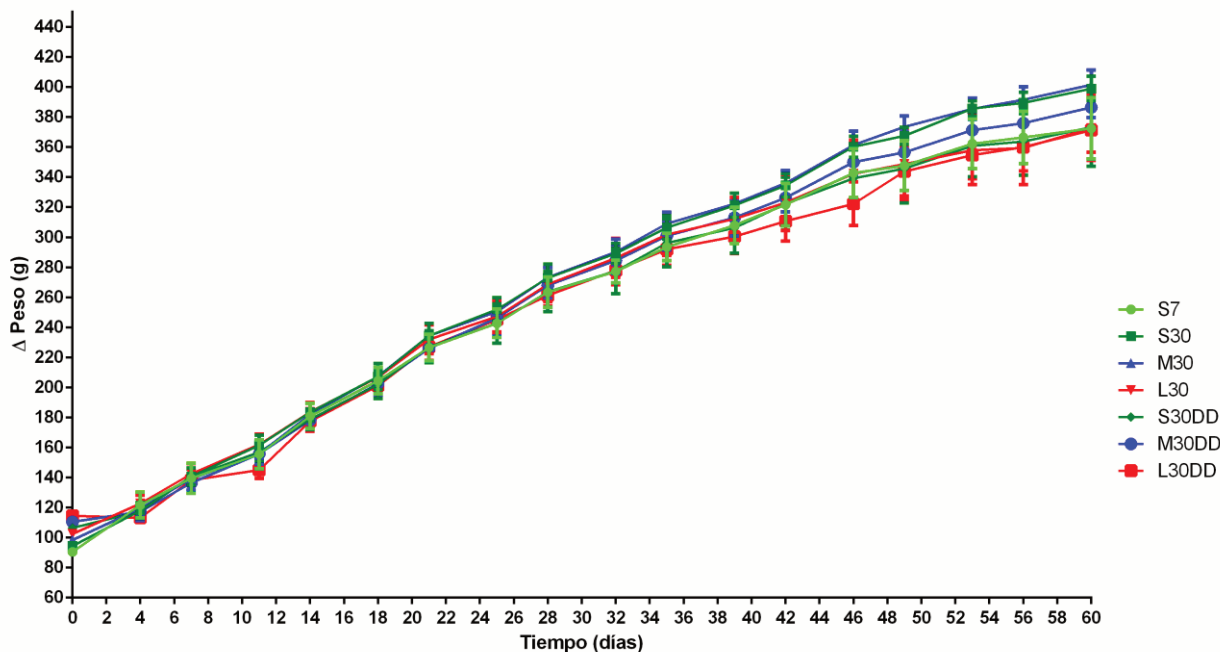


Figura 11: Evolución de la ganancia de peso diaria durante el tratamiento experimental. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD.

1.3- Peso de tejidos

Debido a la importancia del hígado y del tejido adiposo en la regulación metabólica, y dado que ambos tejidos pueden ser modificados de acuerdo a la grasa dietaria consumida, se presentan los pesos del hígado, tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo retroperitoneal (TAR) (**Tabla 5**). Asimismo, debido a la diferencia en el peso corporal de los diferentes grupos experimentales, se calculó el peso de los tejidos relativo al peso corporal de cada animal.

Al analizar los efectos debido a los mayores niveles de grasa (S30 vs S7), los animales alimentados con S30 presentaron una mayor acreción lipídica reflejada por un incremento en el peso del TAR. En cuanto al tejido hepático, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales.

Al analizar las dietas al 30% de grasa, en los grupos L30 y L30DD se observó un menor peso, tanto del TAR, como del TAE, respecto a los animales alimentados con las otras fuentes dietas ricas en grasas. Con relación al hígado, los grupos L30 y L30DD presentaron los pesos

absolutos más bajos, mientras que los grupos M30 y M30DD mostraron los valores más altos de peso relativo del hígado.

Tabla 5: Peso de tejido adiposo retroperitoneal, tejido adiposo epididimal y tejido hepático. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD; TAE: tejido adiposo epididimal; TAR: tejido adiposo retroperitoneal. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

S7	S30	M30	L30	S30DD	M30DD	L30DD
<i>Peso TAR (g)</i>						
12,85 \pm 0,36	14,07 \pm 0,42 ^{*a}	14,36 \pm 0,33 ^a	10,46 \pm 0,48 ^b	13,46 \pm 0,48 ^a	13,74 \pm 0,45 ^a	11,56 \pm 0,39 ^b
<i>Peso TAR relativo (g/100g)</i>						
3,54 \pm 0,05	3,69 \pm 0,09 ^a	3,70 \pm 0,08 ^a	3,10 \pm 0,12 ^b	3,62 \pm 0,08 ^a	3,65 \pm 0,09 ^a	3,36 \pm 0,07 ^b
<i>Peso TAE (g)</i>						
8,84 \pm 0,44	8,72 \pm 0,29 ^{ab}	8,54 \pm 0,27 ^a	7,59 \pm 0,24 ^b	8,16 \pm 0,36 ^{ab}	8,70 \pm 0,29 ^a	8,10 \pm 0,39 ^b
<i>Peso TAE relativo (g/100g)</i>						
2,56 \pm 0,07	2,38 \pm 0,08	2,33 \pm 0,08	2,18 \pm 0,05	2,31 \pm 0,08	2,37 \pm 0,07	2,42 \pm 0,07
<i>Peso hígado (g)</i>						
10,07 \pm 0,18	10,06 \pm 0,17 ^a	11,05 \pm 0,14 ^b	9,69 \pm 0,24 ^c	10,25 \pm 0,19 ^a	11,09 \pm 0,18 ^b	9,15 \pm 0,23 ^c
<i>Peso hígado relativo (g/100g)</i>						
2,69 \pm 0,04	2,67 \pm 0,04 ^a	2,91 \pm 0,05 ^b	2,69 \pm 0,05 ^a	2,69 \pm 0,03 ^a	2,93 \pm 0,04 ^b	2,62 \pm 0,04 ^a

2. Test de tolerancia oral a la glucosa

El control de los niveles de glucosa sérica en ayunas depende de la capacidad del organismo de mantener una secreción de insulina adecuada, de la sensibilidad tisular a la insulina y de la capacidad de los tejidos, principalmente tejido muscular e hígado para captar y controlar el metabolismo de la glucosa. Durante un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG), se evalúa la capacidad de utilización de la glucosa del organismo en respuesta a una sobrecarga de glucosa en ayunas, mediante la cuantificación de la glucosa sérica a distintos tiempos (Unwin et al., 2002).

La **Figura 12** muestra la evolución temporal de los niveles de glucosa durante el TTOG. Los resultados muestran mayores niveles de la glucemia basal en los animales alimentados con alto contenido de grasa dietaria (S30 vs S7) (**Figura 12a**). Los elevados niveles basales de glucemia observados en S30 fueron comparables en los animales del grupo S30DD, M30 y M30DD, mientras que los animales de los grupos L30 y L30DD mostraron valores de glucosa significativamente menores a éstos. Los máximos niveles de glucosa post-sobrecarga fueron alcanzados a los 60 minutos, a excepción del grupo L30 que mostró su mayor expresión a los 30 minutos. Específicamente, a los 60 minutos, no se observaron diferencias en las glucemias entre los grupos S30 y S7 (**Figura 12c**), no obstante, los animales de los grupos L30 y L30DD, presentaron valores de glucosa circulantes menores que los demás grupos al 30% de grasa. Similares resultados fueron observados a los 120 minutos post-sobrecarga de glucosa. Por último, al cabo de los 180 minutos (**Figura 12e**), los niveles de glucosa circulante continuaron en descenso a excepción de los grupos S30 y S30DD, que mostraron niveles más elevados que el resto de los grupos experimentales. Es importante destacar que la restauración a niveles basales de glucemia que habitualmente se presentan a los 120 - 180 minutos post sobrecarga de glucosa, no se observaron en los grupos S30 y S30DD.

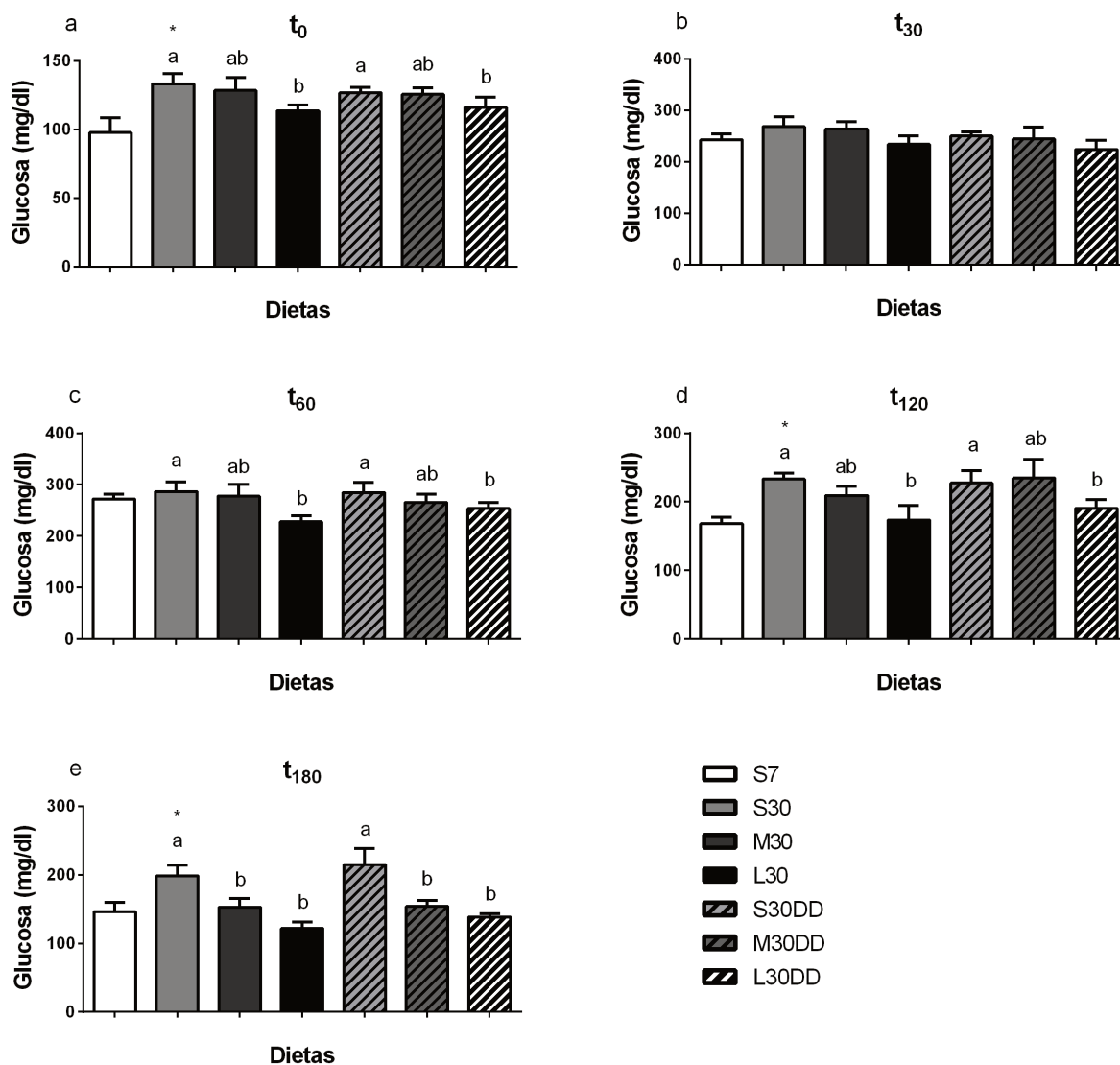


Figura 12: Concentración de glucosa sérica a los distintos tiempos del test de tolerancia oral a la glucosa. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

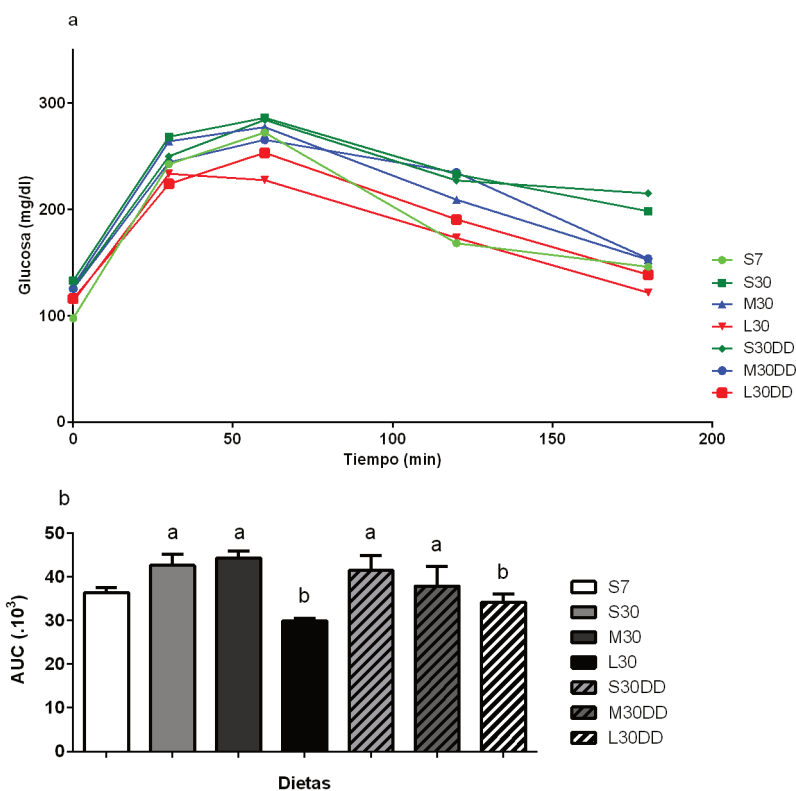


Figura 13: Curvas test de tolerancia oral a la glucosa (a) y gráfica de área bajo la curva (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

El análisis del área bajo la curva (AUC) del TTOG (**Figura 13b**) nos provee información cuantitativa de la respuesta del organismo frente a la sobrecarga de glucosa durante un tiempo determinado. A partir de los resultados obtenidos, podemos ver un ligero incremento en el AUC por los altos niveles de grasa dietaria (S30 vs S7), a pesar de que el mismo no alcanzó a ser estadísticamente significativo. Notoriamente, los grupos L30 y L30DD mostraron los valores más bajos de AUC, en comparación con las demás dietas ricas en grasas.

3. Parámetros lipídicos

3.1- Concentración de triacilglicéridos y colesterol en suero

Las concentraciones de TAG, como de Col séricos se muestran en las **Figura 14a y 14b**). Comparado con el grupo control S7, el consumo de la dieta S30 redujo los niveles de TAG y Col circulantes. En cuanto a los efectos de las dietas ricas en grasas, los mayores niveles de TAG y Col séricos fueron los del grupo M30; mientras que los más bajos fueron aquellos obtenidos en el grupo L30DD. Específicamente, el aceite de lino a altos niveles de grasa mostró una significativa reducción de los niveles de TAG alcanzando diferencias estadísticas en comparación con el grupo M30 en ausencia de DD y con el grupo S30DD. Mientras que los niveles de colesterol en ambos grupos tratados con aceite de lino, en ausencia y presencia de DD, mostraron diferencias significativas con los respectivos grupos alimentados tanto, con dietas ricas en aceite de soja, como de maíz.

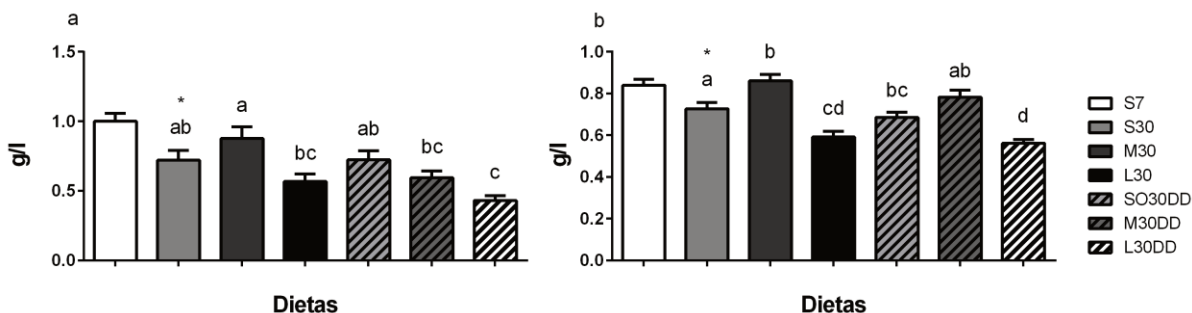


Figura 14: Concentración de triacilglicéridos (a) y colesterol en suero (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

3.2- Perfil de ácidos grasos en suero

El perfil de AG en suero está influenciado por las distintas actividades de biosíntesis y catabolismo de lípidos en los diferentes tejidos del organismo, como asimismo, por las condiciones ayuno/alimentado. En estado de ayuno, los AG presentes en el suero provienen mayoritariamente de la lipólisis de los TAG presentes en el TA; mientras que en estado postprandial, la composición de los AG séricos se encuentra fuertemente afectada por el perfil de AG dietarios. Los resultados presentados a continuación corresponden a animales en estado de ayuno.

Entre los cambios más importantes en el perfil de AG circulantes por el incremento de los niveles de grasa dietaria, se observó un incremento de los PUFA a expensas de un significativo aumento de los niveles de 18:2 n-6, 20:2 n-6 y 22:4 n-6. Este incremento se correlacionó principalmente con un descenso de 16:0, 16:1 n-9 y 18:1 n-9.

Los grupos L30 y L30DD mostraron los mayores niveles de ALA y EPA y 22:5, lo cual llevó a que sean los grupos con mayor contenido de PUFA n-3 circulantes, entre las dietas ricas en grasas. Contrariamente, en ambos grupos tratados con aceite de lino, se observó una notable reducción de LA, GLA, 20:2 n-6 y AA, lo cual se llevó a que sean el grupo con el menor contenido de PUFA n-6, entre los grupos ricos en grasas.

Tabla 6: Perfil de ácidos grasos circulantes (% del total de AG). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey. AP: ácido palmítico; AO: ácido oleico; LA: ácido linoleico; GLA: ácido γ -linolénico; ALA: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentanoico; DHA: ácido docosahexanoico; Σ SFA: sumatoria de AG saturados; Σ MUFA: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ PUFA n-6: sumatoria de AG poliinsaturados totales de la familia n-6; Σ PUFA n-3: sumatoria de AG poliinsaturados totales de la familia n-3 y Σ PUFA: sumatoria de AG poliinsaturados totales.

	S7	S30	M30	L30	S30DD	M30DD	L30DD
14:0	0,36 \pm 0,13	0,25 \pm 0,03	0,16 \pm 0,04	0,17 \pm 0,02	0,17 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,21 \pm 0,03
15:0	0,09 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02
16:0	21,23 \pm 0,67	15,66 \pm 0,19 ^a	18,08 \pm 0,30 ^b	13,53 \pm 0,29 ^c	15,22 \pm 0,26 ^a	17,97 \pm 0,66 ^b	13,38 \pm 0,22 ^c
17:0	0,17 \pm 0,04	0,21 \pm 0,01 ^a	0,22 \pm 0,06 ^a	0,13 \pm 0,04 ^b	0,24 \pm 0,04 ^a	0,24 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,01 ^b
18:0	15,56 \pm 2,49	17,01 \pm 0,25	18,49 \pm 1,42	17,42 \pm 0,93	20,08 \pm 2,73	16,79 \pm 3,01	17,60 \pm 1,02
20:0	0,16 \pm 0,08	0,19 \pm 0,02 ^a	0,12 \pm 0,02 ^b	0,09 \pm 0,03 ^b	0,15 \pm 0,06 ^a	0,12 \pm 0,02 ^b	0,09 \pm 0,01 ^b
9t-16:1	0,18 \pm 0,06	0,17 \pm 0,02	0,16 \pm 0,04	0,14 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01	0,16 \pm 0,05	0,16 \pm 0,03
9c-16:1	2,44 \pm 0,49	0,28 \pm 0,02 [*]	0,20 \pm 0,07	0,26 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03	0,24 \pm 0,08	0,46 \pm 0,05
9c-17:1	0,28 \pm 0,01	0,15 \pm 0,04 ^a	0,24 \pm 0,04 ^b	0,08 \pm 0,02 ^c	0,11 \pm 0,04 ^a	0,23 \pm 0,03 ^b	0,07 \pm 1,02 ^c
9c-18:1 (OA)	7,47 \pm 1,79	6,04 \pm 0,40 ^a	6,23 \pm 0,79 ^b	7,85 \pm 0,31 ^b	4,89 \pm 1,01 ^a	8,79 \pm 2,98 ^b	8,29 \pm 0,91 ^b
11c-18:1	1,96 \pm 0,17	0,94 \pm 0,12 ^a	0,86 \pm 0,11 ^a	0,59 \pm 0,07 ^b	0,78 \pm 0,11 ^a	0,82 \pm 0,04 ^a	0,63 \pm 0,05 ^b
5c-20:1	1,11 \pm 0,47	2,45 \pm 0,09 ^a	0,09 \pm 0,01 ^c	0,12 \pm 0,01 ^c	1,90 \pm 0,57 ^b	0,09 \pm 0,01 ^c	0,06 \pm 0,01 ^c
11c-20:1	0,23 \pm 0,12	0,29 \pm 0,16	0,27 \pm 0,05	0,22 \pm 0,04	0,23 \pm 0,09	0,20 \pm 0,05	0,21 \pm 0,04
9c, 12c-18:2 (LA)	20,48 \pm 2,38	27,72 \pm 0,37 ^a	22,72 \pm 3,06 ^{ab}	18,48 \pm 0,57 ^b	24,10 \pm 3,20 ^a	24,64 \pm 2,52 ^{ab}	20,03 \pm 0,49 ^b
11c, 14c-20:2	0,15 \pm 0,03	0,24 \pm 0,03 ^a	0,34 \pm 0,02 ^b	0,07 \pm 0,01 ^c	0,23 \pm 0,01 ^a	0,35 \pm 0,03 ^b	0,07 \pm 0,01 ^c
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,22 \pm 0,08	0,24 \pm 0,02 ^a	0,19 \pm 0,06 ^a	0,06 \pm 0,02 ^b	0,25 \pm 0,06 ^a	0,22 \pm 0,08 ^a	0,03 \pm 0,01 ^b
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	0,11 \pm 0,06	0,16 \pm 0,02 ^a	0,38 \pm 0,03 ^a	18,59 \pm 0,58 ^b	0,11 \pm 0,04 ^a	0,40 \pm 0,08 ^a	19,48 \pm 1,03 ^b
8c, 11c, 14c-20:3	0,30 \pm 0,06	0,29 \pm 0,01 ^a	0,26 \pm 0,02 ^a	0,56 \pm 0,04 ^b	0,30 \pm 0,02 ^a	0,31 \pm 0,06 ^a	0,51 \pm 0,08 ^b
5c, 8c, 11c, 14c-20:4 (AA)	25,15 \pm 2,02	21,71 \pm 0,11 ^a	28,08 \pm 1,99 ^a	11,49 \pm 0,85 ^b	24,52 \pm 3,11 ^a	26,99 \pm 1,84 ^a	10,53 \pm 0,84 ^b
7c, 10c, 13c, 16c-22:4	0,09 \pm 0,01	0,23 \pm 0,05 ^a	0,67 \pm 0,11 ^b	0,05 \pm 0,02 ^c	0,24 \pm 0,02 ^a	0,67 \pm 0,12 ^b	0,06 \pm 0,02 ^c
5c, 8c, 11c, 14c, 17c-20:5 (EPA)	0,39 \pm 0,12	0,47 \pm 0,03	ND	3,32 \pm 0,39	0,39 \pm 0,08	ND	3,52 \pm 0,34
7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:5	0,56 \pm 0,03	0,66 \pm 0,02 ^a	0,36 \pm 0,03 ^a	1,85 \pm 0,25 ^b	0,68 \pm 0,02 ^a	0,39 \pm 0,03 ^a	1,44 \pm 0,30 ^c
4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:6 (DHA)	4,31 \pm 0,92	4,02 \pm 0,14 ^{ab}	4,64 \pm 0,31 ^{ab}	4,32 \pm 0,43 ^{ab}	4,99 \pm 1,38 ^a	3,86 \pm 0,50 ^{ab}	3,19 \pm 0,15 ^b
Σ SFA	37,73 \pm 1,97	33,59 \pm 0,29	37,30 \pm 1,06	31,92 \pm 0,96	36,65 \pm 1,82	35,42 \pm 2,15	32,25 \pm 0,92
Σ MUFA	16,34 \pm 3,68	10,36 \pm 0,46	9,26 \pm 1,39	9,37 \pm 0,37	8,24 \pm 1,07	10,55 \pm 1,67	9,80 \pm 0,60
Σ PUFA n-6	43,27 \pm 5,60	50,69 \pm 0,86 ^a	49,33 \pm 5,53 ^a	30,66 \pm 1,03 ^b	49,39 \pm 5,05 ^a	50,95 \pm 4,41 ^a	31,16 \pm 0,97 ^b
Σ PUFA n-3	5,13 \pm 0,90	5,31 \pm 0,11 ^a	5,63 \pm 0,44 ^a	28,09 \pm 0,82 ^b	6,18 \pm 0,88 ^a	4,41 \pm 0,50 ^a	26,65 \pm 1,38 ^b
Σ PUFA totales	48,49 \pm 6,51	56,24 \pm 0,99 ^a	55,63 \pm 6,03 ^a	58,81 \pm 1,87 ^b	55,82 \pm 5,94 ^a	56,14 \pm 5,03 ^a	57,86 \pm 2,36 ^b

3.3- Contenido de triacilglicéridos y colesterol en hígado

La ingesta de dietas con alto contenido de grasa favorece el desarrollo de esteatosis hepática, la cual está caracterizada por una acumulación exacerbada de TAG en los hepatocitos. En nuestro modelo experimental, el contenido de TAG hepáticos (**Figura 15a**) incrementó significativamente en los animales que consumieron S30, en comparación a los animales que consumieron S7. A altos niveles de grasa, se observó una reducción significativa de los niveles de TAG hepáticos en ambos grupos alimentados con aceite de lino, respecto de las demás dietas ricas en grasas.

Al analizar los niveles de Col hepático (**Figura 15b**), no se observaron diferencias debidas a los niveles de grasa (S30 vs S7). Sin embargo, entre las dietas ricas en grasas se observó una reducción de los niveles de Col en los grupos L30, S30DD, M30DD y L30DD, respecto a S30 y M30.

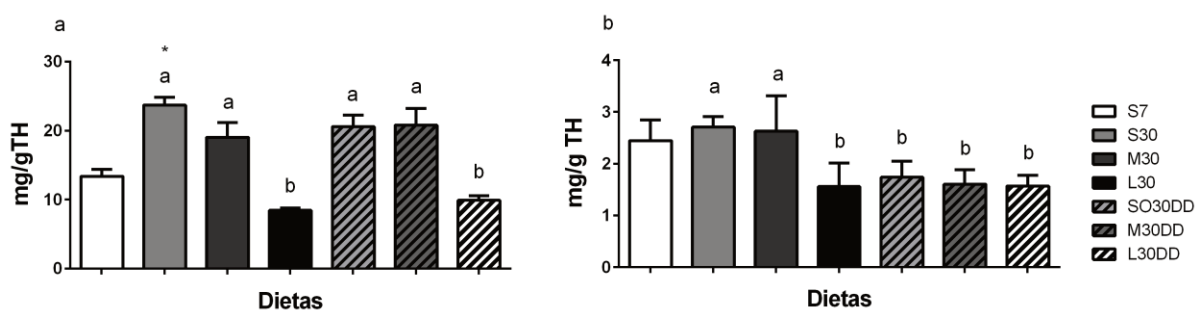


Figura 15: Concentración de triacilglicéridos (a) y colesterol (b) en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

A su vez, dentro del Col total hepático, se cuantificaron las fracciones de Col libre y esterificado. El incremento de grasa dietaria llevó a un incremento del Col libre en S30 vs S7; mientras que, a altos niveles de grasa, se observó un comportamiento similar al del Col total, con mayores niveles de Col libre en S30 y M30 respecto a los demás grupos ricos en grasas (**Figura 16a**). En cuanto al Col esterificado (**Figura 16b**), se encontraron respuestas diferentes, específicamente se observó una disminución del contenido del mismo en S30 vs S7, sin cambios estadísticamente significativos entre los grupos ricos en grasas.

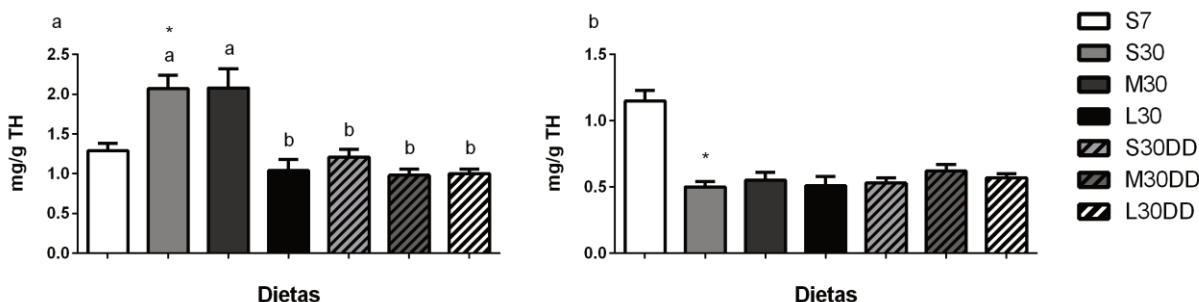


Figura 16: Concentración de colesterol libre (a) y colesterol esterificado (b) en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

En la **Figura 17** se muestran las gráficas de interacción para el análisis del efecto conjunto del tipo de grasa y la suplementación con DD, sobre el colesterol total (**Figura 17a**), colesterol libre (**Figura 17b**) y colesterol esterificado (**Figura 17c**). A partir del análisis de dichas gráficas, observamos la misma tendencia tanto en el colesterol total, como en el colesterol libre, donde la suplementación con DD tendió a disminuir el contenido hepático del mismo en S30DD y M30DD, con respecto a sus correspondientes dietas sin suplementación. Por el contrario, en el caso del colesterol esterificado, la suplementación con DD mostró una tendencia a incrementar el contenido de colesterol esterificado, con respecto a sus dietas sin suplementación.

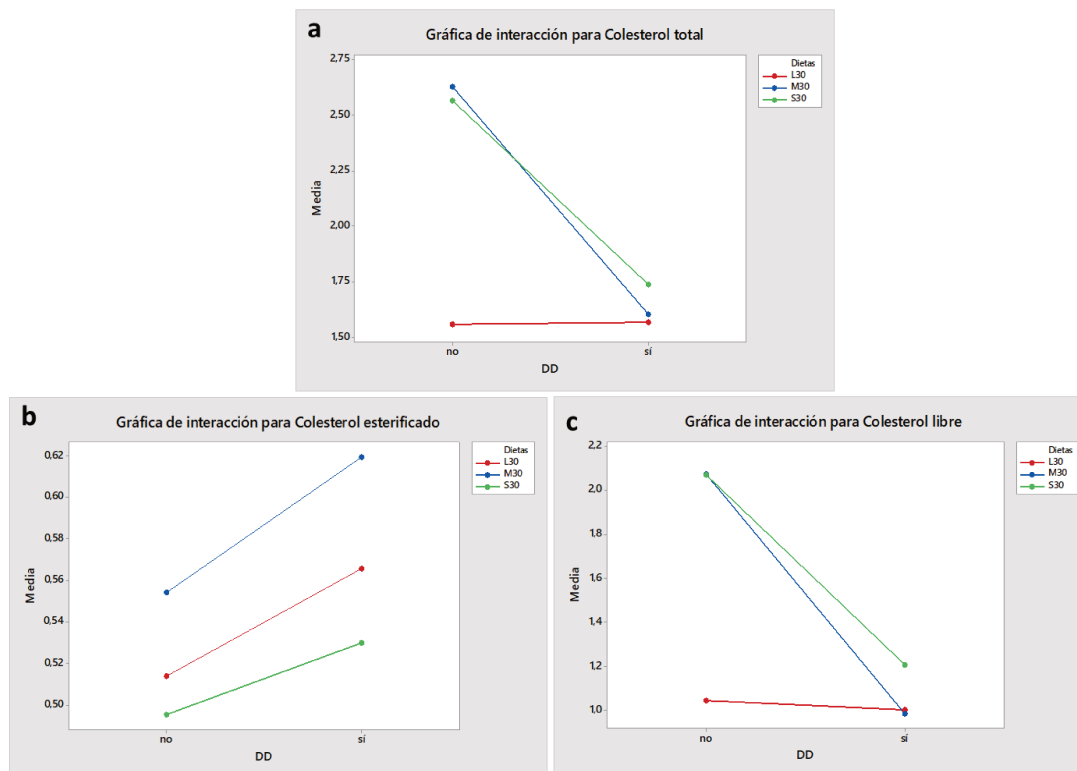


Figura 17: Gráficas de interacción para colesterol total (a), colesterol libre (b) y colesterol esterificado (c) en hígado.

3.4- Perfil de ácidos grasos en hígado

El hígado desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos dietarios; utilizándolos como fuente de energía, almacenándolos como TAG, o empaquetándolos en lipoproteínas para exportarlos hacia los tejidos periféricos (Liu et al., 2015). Por lo tanto, el análisis del perfil de AG hepáticos nos permitirá conocer, entre otros aspectos, el impacto de los AG dietarios en el órgano en estudio. Los resultados del perfil de AG en hígado se muestran en la **Tabla 7**.

El consumo de la dieta S30, comparado con la dieta control, condujo a una disminución significativa de los SFA y MUFA totales. Es importante remarcar que el tipo de AG disminuido por la dieta rica en grasa (S30) denota una inhibición de la biosíntesis de AG, como se refleja principalmente en los niveles de 14:0, 16:0, 9c-16:1, 9c-18:1 y 11c-18:1. Por el contrario, la dieta S30 indujo un incremento significativo en el contenido total de PUFA respecto a S7. Este aumento se debió substancialmente a un aumento los principales PUFA dietarios, LA y ALA.

Por otro lado, entre los grupos alimentados con 30% de grasas, se observaron los niveles más altos de SFA en L30 y L30DD, principalmente debido al ácido esteárico (18:0). El mayor

contenido de MUFA se observó en los grupos M30 y M30DD, debido principalmente a los altos niveles de AO. En cuanto al contenido de PUFA, los grupos L30 y el L30DD mostraron los mayores niveles de PUFA n-3 (ALA, EPA, 22:5 y DHA), y los niveles más bajos de PUFA n-6 (LA, AA, GLA).

Tabla 7: Perfil de ácidos grasos hepáticos (% del total de AG). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey. AP: ácido palmítico; AO: ácido oleico; LA: ácido linoleico; GLA: ácido γ -linolénico; ALA: ácido α -linolénico; DGLA: di-homo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; Σ SFA: sumatoria de AG saturados; Σ MUFA: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ PUFA n-6: sumatoria de AG poliinsaturados totales de la familia n-6; Σ PUFA n-3: sumatoria de AG poliinsaturados totales de la familia n-3 y Σ PUFA: sumatoria de AG poliinsaturados totales.

	S7	S30	M30	L30	S30DD	M30DD	L30DD
14:0	0,47 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01 ^{*a}	0,20 \pm 0,01 ^{ab}	0,17 \pm 0,02 ^b	0,20 \pm 0,02 ^a	0,19 \pm 0,01 ^{ab}	0,14 \pm 0,01 ^b
15:0	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01 ^{*a}	0,07 \pm 0,01 ^{ab}	0,06 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,01 ^{ab}	0,07 \pm 0,01 ^b
16:0	22,90 \pm 0,20	14,99 \pm 0,31 ^{*a}	16,19 \pm 0,22 ^b	13,93 \pm 0,77 ^a	14,86 \pm 0,35 ^a	15,97 \pm 0,19 ^b	14,15 \pm 0,10 ^a
17:0	0,16 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
18:0	12,02 \pm 0,85	11,53 \pm 0,11 ^a	9,22 \pm 0,47 ^b	18,23 \pm 0,41 ^c	10,36 \pm 0,13 ^a	7,38 \pm 0,53 ^b	16,42 \pm 0,37 ^c
20:0	0,10 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02 ^{*a}	0,11 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^b	0,27 \pm 0,01 ^a	0,11 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^b
9t-16:1	0,25 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01 ^a	0,35 \pm 0,01 ^b	0,25 \pm 0,02 ^a	0,30 \pm 0,03 ^a	0,39 \pm 0,01 ^b	0,29 \pm 0,01 ^a
9c-16:1	2,19 \pm 0,05	0,34 \pm 0,04 ^{*a}	0,24 \pm 0,03 ^b	0,24 \pm 0,03 ^b	0,33 \pm 0,04 ^a	0,23 \pm 0,02 ^b	0,25 \pm 0,02 ^b
9c-17:1	0,25 \pm 0,06	0,05 \pm 0,01 [*]	ND	ND	ND	ND	ND
9c-18:1 (OA)	13,23 \pm 0,50	9,39 \pm 0,09 ^{*a}	14,91 \pm 0,33 ^b	9,68 \pm 0,37 ^a	10,73 \pm 0,36 ^a	15,83 \pm 0,62 ^b	10,7 \pm 0,38 ^a
11c-18:1	2,54 \pm 0,06	1,04 \pm 0,02 ^{*a}	1,01 \pm 0,03 ^a	0,82 \pm 0,03 ^b	1,00 \pm 0,03 ^a	0,92 \pm 0,07 ^a	0,89 \pm 0,02 ^b
5c-20:1	1,31 \pm 0,14	0,14 \pm 0,01 [*]	0,45 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,53 \pm 0,05	ND
11c-20:1	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,06
9c, 12c-18:2 (LA)	22,59 \pm 1,17	36,06 \pm 0,19 ^{*a}	33,38 \pm 0,39 ^a	18,09 \pm 0,09 ^b	37,4 \pm 0,23 ^a	36,13 \pm 0,62 ^a	18,46 \pm 0,63 ^b
11c, 14c-20:2	0,17 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01 ^{*a}	0,09 \pm 0,01 ^c	0,10 \pm 0,01 ^c	0,46 \pm 0,03 ^a	0,57 \pm 0,03 ^b	0,47 \pm 0,03 ^a
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,10 \pm 0,01	0,68 \pm 0,04 ^{*a}	0,73 \pm 0,01 ^b	0,06 \pm 0,01 ^c	0,67 \pm 0,07 ^a	0,82 \pm 0,03 ^b	0,12 \pm 0,01 ^c
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	0,07 \pm 0,01	2,52 \pm 0,05 ^{*a}	0,23 \pm 0,01 ^b	14,12 \pm 1,69 ^c	2,41 \pm 0,06 ^a	0,26 \pm 0,01 ^b	14,64 \pm 0,42 ^c
8c, 11c, 14c-20:3 (DGLA)	0,27 \pm 0,03	0,51 \pm 0,03 [*]	0,50 \pm 0,03	0,54 \pm 0,05	0,57 \pm 0,02	0,66 \pm 0,03	0,44 \pm 0,10
5c, 8c, 11c, 14c-20:4 (AA)	14,99 \pm 1,05	14,67 \pm 0,25 ^a	15,92 \pm 0,36 ^a	11,22 \pm 0,28 ^b	12,85 \pm 0,25 ^a	13,88 \pm 0,60 ^a	10,03 \pm 0,84 ^b
7c, 10c, 13c, 16c-22:4	0,33 \pm 0,02	0,67 \pm 0,07 ^{*a}	1,20 \pm 0,06 ^b	0,03 \pm 0,01 ^c	0,48 \pm 0,06 ^a	0,99 \pm 0,03 ^b	0,04 \pm 0,01 ^c
5c, 8c, 11c, 14c, 17c-20:5 (EPA)	0,45 \pm 0,03	0,74 \pm 0,02 ^{*a}	0,09 \pm 0,01 ^b	3,67 \pm 0,25 ^c	0,75 \pm 0,01 ^a	0,16 \pm 0,01 ^b	4,03 \pm 0,46 ^c
7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:5	0,87 \pm 0,05	1,24 \pm 0,01 ^{*a}	0,41 \pm 0,03 ^b	2,46 \pm 0,19 ^c	1,01 \pm 0,05 ^a	0,51 \pm 0,03 ^b	2,73 \pm 0,21 ^c
4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:6 (DHA)	4,41 \pm 0,13	4,70 \pm 0,17 ^a	2,82 \pm 0,12 ^b	5,6 \pm 0,41 ^c	4,02 \pm 0,11 ^a	2,63 \pm 0,21 ^b	5,45 \pm 0,22 ^c
Σ SFA	35,74 \pm 1,10	27,24 \pm 0,47 ^{*a}	25,96 \pm 0,73 ^b	32,64 \pm 1,23 ^c	25,94 \pm 0,53 ^a	23,87 \pm 0,76 ^b	31,04 \pm 0,51 ^c
Σ MUFA	19,90 \pm 0,84	11,39 \pm 0,19 ^{*a}	17,13 \pm 0,44 ^b	11,17 \pm 0,47 ^a	12,67 \pm 0,48 ^a	18,05 \pm 0,78 ^b	12,3 \pm 0,49 ^a
Σ PUFA n-6	38,45 \pm 1,43	52,97 \pm 0,42 ^{*a}	51,83 \pm 0,12 ^a	30,04 \pm 0,23 ^b	52,44 \pm 0,45 ^a	52,55 \pm 0,41 ^a	29,56 \pm 0,28 ^b
Σ PUFA n-3	5,81 \pm 0,13	9,21 \pm 0,17 ^{*a}	3,55 \pm 0,13 ^b	25,92 \pm 0,94 ^c	8,19 \pm 0,12 ^a	3,56 \pm 0,24 ^b	26,85 \pm 0,30 ^c
Σ PUFA	44,25 \pm 1,55	62,17 \pm 0,51 ^{*a}	55,37 \pm 0,24 ^b	55,89 \pm 0,83 ^b	60,62 \pm 0,89 ^a	57,91 \pm 0,38 ^b	59,41 \pm 0,24 ^b

3.5- Flujo a través de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico en hígado

El perfil de AG hepáticos está influenciado por la ingesta de lípidos dietarios, por el metabolismo endógeno de los AG y por la interrelación entre ambos. Por ejemplo, las enzimas desaturasas están involucradas en la biosíntesis de novo que depende en gran medida de la cantidad de grasa dietaria y de la biosíntesis de LC-PUFA, que depende del tipo de PUFA dietario. En este último caso, una función clave de las enzimas desaturasas es la regulación del grado de insaturaciones de los lípidos en todo el cuerpo, lo cual es de suma importancia para la fluidez de las membranas celulares, afectando su permeabilidad y por ende la señalización celular a través de las mismas (Corpeleijn et al., 2006).

La relación producto/sustrato en una vía bioquímica, nos da una idea del flujo a través de la enzima que cataliza ese paso metabólico. El cálculo de las relaciones ácido palmitoleico/ácido palmítico, ácido oleico/ácido esteárico o ácido *cis*-vaccénico/ácido esteárico, nos permiten calcular el flujo a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa o esteroil-CoA desaturasa (SCD1). Esta enzima es clave en la biosíntesis de ácidos grasos catalizando la conversión de SFA, como el ácido esteárico (18:0) y el ácido palmítico (16:0) en MUFA, como el AO (9*c*-18:1) y ácido palmitoleico (9*c*-16:1). La **Figura 18** muestra los cálculos de las relaciones producto/sustrato, para estimar el flujo de la SCD1 en hígado.

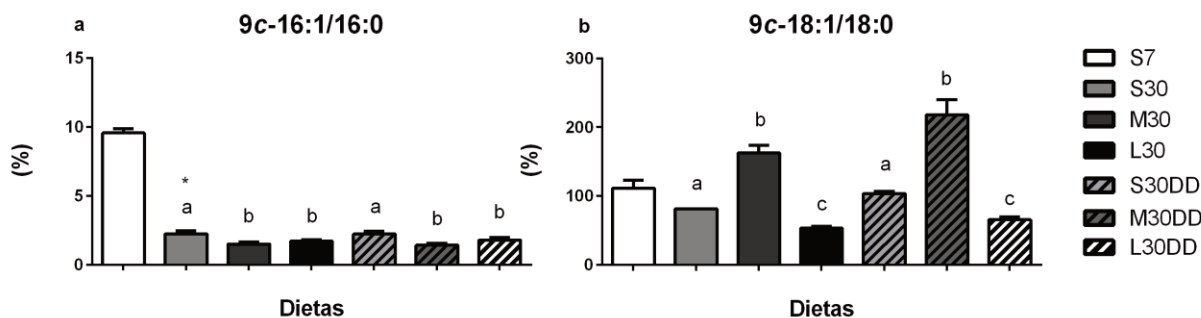


Figura 18: Flujo a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa en hígado, expresada como la relación porcentual: ácido palmitoleico/ácido palmítico (a) y ácido oleico/ácido esteárico (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

Debido a los mayores niveles de grasa dietaria (S30 vs S7), se observó una reducción en el flujo a través de la SCD1 en las 2 relaciones calculadas, siendo estadísticamente significativa en 1 de ellas (**Figura 18a**). Al analizar los efectos de las dietas ricas en grasas, los mayores valores de flujo a través de la enzima se encontraron: en el caso de (**a**), en los grupos conteniendo aceite de soja; y en la relación (**b**), en los grupos conteniendo aceite de maíz. En los dos casos, los grupos con los menores valores de flujo a través de SCD1, fueron aquellos tratados con aceite de lino.

Dado que la enzima clave de la biosíntesis de AA es la $\Delta 6$ -desaturasa, se muestra el flujo a través de dicha enzima mediante la relación porcentual GLA/LA (**Figura 19a**). Este parámetro mostró un incremento estadísticamente significativo debido al nivel de grasa (S30 vs S7). A altos niveles de grasa, se observó que, los menores niveles de flujo a través de dicha enzima fueron obtenidos en los grupos L30 y L30DD; mientras que los grupos M30 y M30DD mostraron los niveles más altos de la misma.

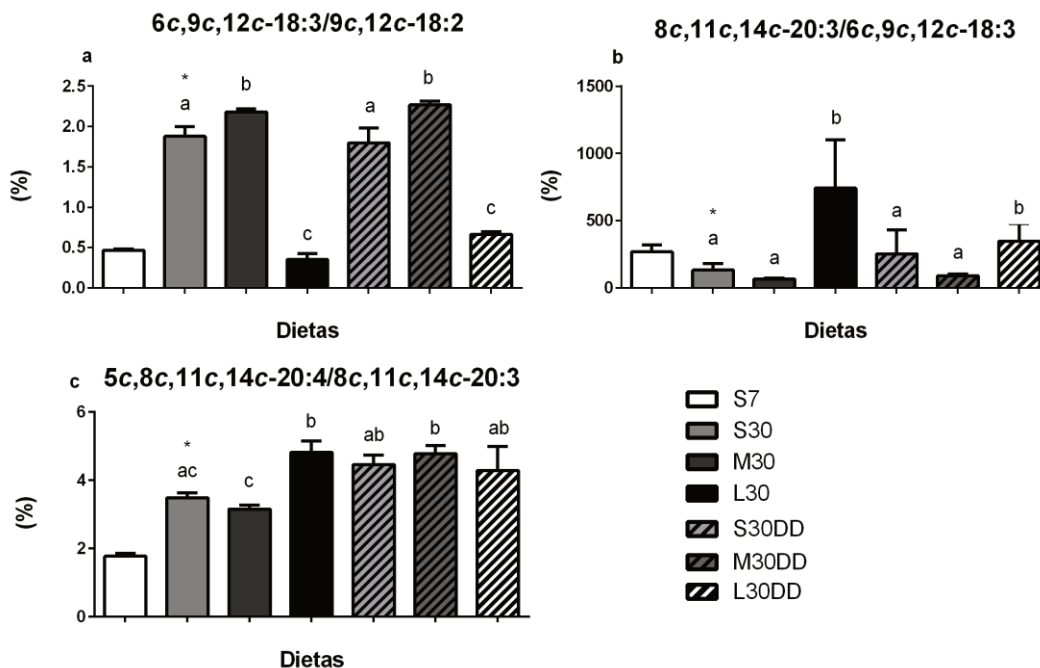


Figura 19: Relaciones de los pasos intermedios de la biosíntesis de n-6 en hígado: flujo a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa (a), flujo a través de la enzima elongasa 5 (b), flujo a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa (c). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

Por otro lado, la relación porcentual DGLA/GLA, que nos indica el paso siguiente (elongación) en la biosíntesis de PUFA (**Figura 19b**) se vió reducida en el grupo S30 vs S7; mientras que, a altos niveles de grasa, los niveles más altos de esta relación fueron observados en los grupos L30 y L30DD. El flujo de sustrato a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa, representado por la relación AA/DGLA, muestra un incremento en S30 al comparar con S7 (**Figura 19c**). Este incremento se acentúa en los grupos L30 y M30DD, comparando con S30 y M30.

La relación producto/sustrato, calculada utilizando el producto final de la vía en relación al sustrato inicial, nos permite estimar la eficiencia de la vía completa. Para estimar la biosíntesis total de PUFA n-6, es decir, la formación de AA a partir de AL, calculamos la relación AA/LA. La biosíntesis total de PUFA de la serie n-6 (**Figura 20**), mostró una disminución significativa en el

grupo S30 vs S7. No obstante, a altos niveles de grasa, los grupos L30 y L30DD incrementaron dicha relación.

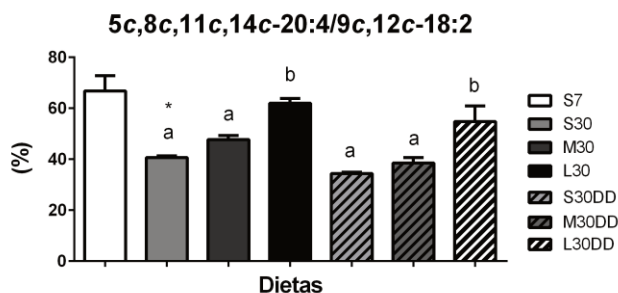


Figura 20: Biosíntesis total de PUFA n-6 expresada como relación porcentual ácido araquidónico/ácido linoleico en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

De manera similar a lo calculado para la biosíntesis de PUFA n-6, se puede calcular a partir de la relación de metabolitos intermedios de la vía n-3, el flujo a través de algunos de los pasos de dicha vía metabólica. El flujo a través de la enzima elongasa 2 (ELOVL2), expresado por la relación $7c,10c,13c,16c,19c-22:5/EPA$ (**Figura 21a**), no mostró cambios debido al incremento de grasa dietaria, mientras que mostró un incremento significativo en los grupos M30 y M30DD, y una disminución en los grupos L30 y L30DD, versus los respectivos grupos ricos en grasas. Se observó que la biosíntesis de EPA, expresada por la relación EPA/ALA (**Figura 21b**), mostró una reducción debido al incremento en los niveles de grasa (S30 vs S7). Respecto a las dietas ricas en grasas, pese a que todas las relaciones fueron relativamente bajas, se observó un incremento estadísticamente significativo en el grupo M30DD. Por último, la biosíntesis total de PUFA n-3, expresada por la relación DHA/ALA (**Figura 21c**), mostró una reducción debido a los mayores niveles de grasa dietaria (S30 vs S7); mientras que, entre los grupos al 30% de grasa, los grupos M30 y M30DD mostraron los valores más altos de dicha conversión.

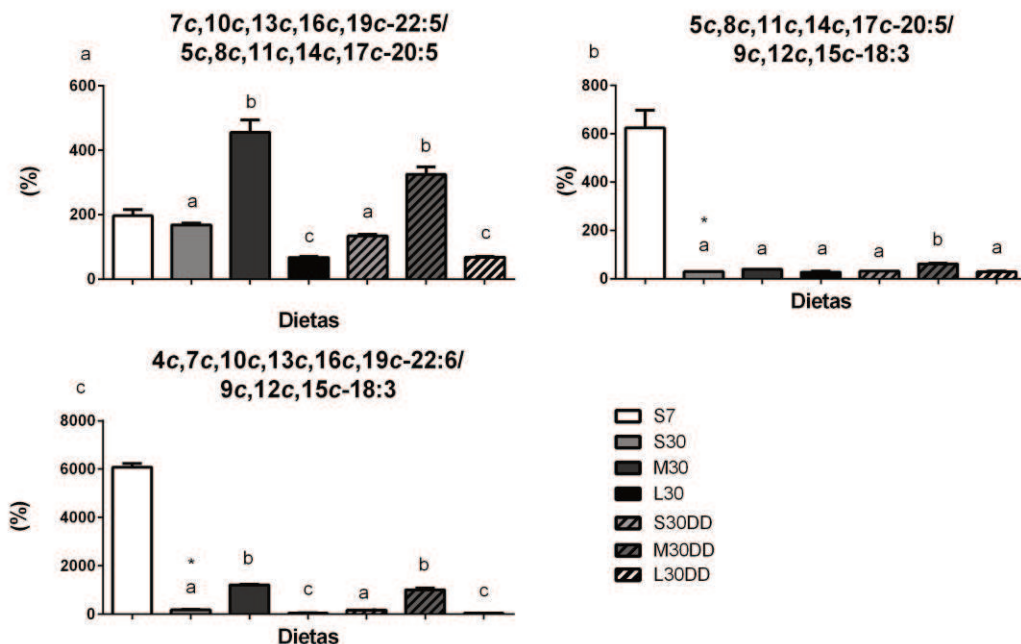


Figura 21: Relaciones de los pasos intermediarios de la biosíntesis de n-3 en hígado: flujo a través de la enzima elongasa 2 (a), biosíntesis de ácido eicosapentanoico (b), biosíntesis de ácido docosahexanoico (c). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

Debido a los escasos niveles de algunos de los metabolitos intermediarios, no fue factible estimar los efectos en los flujos parciales de pasos específicos a través de las diferentes enzimas participantes en la biosíntesis de DHA.

3.6- Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

El principal compartimento de almacenamiento de ácidos grasos en el ser humano es el tejido adiposo (TA), el cual ha despertado un interés creciente en los últimos años a medida que nuevos estudios identificaron funciones claves del mismo en el metabolismo. Además, la composición de AG del TA y suero pueden utilizarse como biomarcadores de la ingesta de AG (Hodson et al., 2008).

En la **Tabla 8** se muestra el perfil de AG en TA de los animales experimentales. El consumo de mayores niveles de grasa dietaria (S30 vs S7), llevó a una disminución en los niveles

de SFA y MUFA totales, junto con un incremento de los niveles de PUFA totales. En el caso de los SFA, se debió principalmente a la reducción en los niveles de los AG 14:0 y 16:0; mientras que, en los MUFA, se relacionó principalmente con los menores niveles de 9c-16:1, 9c-18:1(AO) y 11c-18:1. El incremento en los niveles totales de PUFA en S30 vs S7, se relacionó principalmente con el aumento de LA y ALA.

Respecto a los grupos alimentados con 30% de grasas, en los animales alimentados con aceite de soja, se observaron los mayores niveles de SFA. En los grupos tratados con aceite de maíz, se encontraron los mayores niveles de MUFA, debido principalmente a los mayores niveles de AO en ambos grupos. Por último, en cuanto al contenido de PUFA, los grupos tratados con aceite de lino mostraron los mayores niveles de PUFA totales, lo cual se relacionó con los mayores niveles de PUFA n-3 (principalmente ALA y EPA) en dichos grupos. A su vez, L30 y L30DD fueron los grupos con los menores niveles de PUFA n-6 en comparación con las demás dietas ricas en grasas.

Tabla 8: Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal (% del total de AG). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey. AP: ácido palmitoleico; AO: ácido oleico; LA: ácido linoleico; GLA: ácido γ -linolénico; ALA: ácido α -linolénico; DGLA: di-homo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentanoico; DHA: ácido docosahexanoico; Σ SFA: sumatoria de AG saturados; Σ MUFA: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ PUFA n-6: sumatoria de AG poliinsaturados totales de la familia n-6; Σ PUFA n-3: sumatoria de AG poliinsaturados totales de la familia n-3 y Σ PUFA: sumatoria de AG poliinsaturados totales.

	S7	S30	M30	L30	S30DD	M30DD	L30DD
14:0	1,22 \pm 0,05	0,61 \pm 0,06 ^{*ab}	0,52 \pm 0,03 ^a	0,62 \pm 0,07 ^b	0,61 \pm 0,05 ^{ab}	0,44 \pm 0,04 ^a	0,64 \pm 0,03 ^b
16:0	27,68 \pm 1,37	15,94 \pm 0,69 ^{*a}	15,33 \pm 0,29 ^{ab}	14,14 \pm 0,80 ^b	15,97 \pm 0,59 ^a	14,55 \pm 0,67 ^{ab}	13,79 \pm 0,47 ^b
18:0	3,42 \pm 0,17	3,31 \pm 0,47 ^a	2,11 \pm 0,05 ^b	3,62 \pm 0,16 ^c	3,20 \pm 0,14 ^a	2,02 \pm 0,09 ^b	3,59 \pm 0,14 ^c
20:0	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,05 ^a	0,06 \pm 0,01 ^{ab}	0,03 \pm 0,01 ^b	0,07 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^{ab}	0,05 \pm 0,01 ^b
7c-16:1	0,22 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,19 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,32 \pm 0,10	0,20 \pm 0,02
9c-16:1	5,95 \pm 0,18	1,49 \pm 0,24 ^{*a}	1,20 \pm 0,16 ^b	1,71 \pm 0,25 ^a	1,54 \pm 0,18 ^a	0,69 \pm 0,19 ^b	1,60 \pm 0,06 ^a
9c-18:1 (OA)	28,03 \pm 0,64	24,44 \pm 0,39 ^{*a}	29,64 \pm 0,11 ^b	24,71 \pm 0,15 ^a	24,38 \pm 0,15 ^a	29,78 \pm 0,47 ^b	24,41 \pm 0,13 ^a
11c-18:1	3,14 \pm 0,12	1,65 \pm 0,04 ^{*a}	0,97 \pm 0,02 ^b	1,03 \pm 0,05 ^c	1,45 \pm 0,05 ^a	0,82 \pm 0,11 ^b	1,11 \pm 0,02 ^c
5c-20:1	0,07 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01 ^{*a}	0,17 \pm 0,02 ^b	0,05 \pm 0,01 ^c	0,10 \pm 0,02 ^a	0,16 \pm 0,02 ^b	0,04 \pm 0,01 ^c
11c-20:1	0,08 \pm 0,02	0,22 \pm 0,01 ^{*a}	0,25 \pm 0,01 ^b	0,05 \pm 0,01 ^c	0,19 \pm 0,01 ^a	0,22 \pm 0,01 ^b	0,04 \pm 0,01 ^c
9c, 12c-18:2 (LA)	25,53 \pm 1,95	46,15 \pm 1,44 ^{*a}	46,42 \pm 0,28 ^a	16,87 \pm 0,34 ^b	46,49 \pm 0,82 ^a	47,01 \pm 1,60 ^a	17,63 \pm 0,41 ^b
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,045 \pm 0,01	0,17 \pm 0,06 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b	0,08 \pm 0,01 ^b	0,17 \pm 0,02 ^a	0,07 \pm 0,01 ^b	0,06 \pm 0,01 ^b
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	2,09 \pm 0,19	3,78 \pm 0,19 ^{*a}	0,95 \pm 0,02 ^b	35,64 \pm 0,93 ^c	4,12 \pm 0,22 ^a	1,13 \pm 0,15 ^b	35,44 \pm 0,43 ^c
11c, 14c-20:2	0,11 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02 ^a	0,20 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^b	0,15 \pm 0,02 ^a	0,16 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b
8c, 11c, 14c-20:3 (DGLA)	0,13 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01 ^{*a}	0,88 \pm 0,01 ^b	0,20 \pm 0,01 ^c	0,03 \pm 0,01 ^a	0,02 \pm 0,01 ^a	0,20 \pm 0,01 ^c
11c, 14c, 17c-20:3	0,09 \pm 0,02	0,61 \pm 0,05 ^{*a}	0,07 \pm 0,01 ^b	0,15 \pm 0,02 ^b	0,59 \pm 0,07 ^a	0,80 \pm 0,02 ^c	0,16 \pm 0,01 ^b
5c, 8c, 11c, 14c-20:4 (AA)	0,38 \pm 0,06	0,07 \pm 0,03 ^{*a}	0,19 \pm 0,01 ^b	0,06 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,16 \pm 0,02 ^b	0,09 \pm 0,02 ^a
5c, 8c, 11c, 14c, 17c-20:5 (EPA)	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,22 \pm 0,01 ^b	0,07 \pm 0,04 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,23 \pm 0,01 ^b
7c, 10c, 13c, 16c-22:4	0,25 \pm 0,07	0,08 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02	0,10 \pm 0,05	0,07 \pm 0,04	0,04 \pm 0,01
7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:5	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02 ^{ab}	0,03 \pm 0,01 ^b	0,21 \pm 0,02 ^c	0,09 \pm 0,01 ^a	0,11 \pm 0,02 ^a	0,20 \pm 0,01 ^c
4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:6 (DHA)	0,09 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,08 \pm 0,02 ^a	0,12 \pm 0,02 ^b	0,11 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^b
Σ SFA	32,42 \pm 1,57	19,96 \pm 1,16 ^{*a}	18,01 \pm 0,32 ^b	18,41 \pm 0,74 ^{ab}	19,86 \pm 0,65 ^a	17,06 \pm 0,77 ^b	18,07 \pm 0,62 ^{ab}
Σ MUFA	37,49 \pm 0,77	28,10 \pm 0,52 ^{*a}	32,45 \pm 0,24 ^b	27,74 \pm 0,38 ^a	27,80 \pm 0,26 ^a	31,99 \pm 0,37 ^b	27,42 \pm 0,13 ^a
Σ PUFA n-6	27,45 \pm 1,21	47,28 \pm 1,11 ^{*a}	47,89 \pm 0,28 ^a	17,55 \pm 0,39 ^b	47,02 \pm 0,78 ^a	47,49 \pm 1,55 ^a	18,38 \pm 0,37 ^b
Σ PUFA n-3	2,634 \pm 0,08	4,66 \pm 0,27 ^{*a}	1,64 \pm 0,45 ^b	36,30 \pm 0,93 ^c	5,31 \pm 0,28 ^a	3,45 \pm 1,18 ^b	36,12 \pm 0,46 ^c
Σ PUFA totales	30,09 \pm 1,26	51,94 \pm 1,34 ^{*ab}	49,53 \pm 0,47 ^a	53,85 \pm 1,11 ^b	52,33 \pm 0,73 ^{ab}	50,94 \pm 0,42 ^a	54,50 \pm 0,59 ^b

3.7- Actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio

La lipoproteína lipasa o LPL es una enzima situada en la superficie apical de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La misma hidroliza los TAG presentes en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) generando AG libres y glicerol, los cuales son finalmente incorporados en músculo y TA (Stein & Stein, 2003). Una de las funciones más importantes del tejido adiposo blanco es la de remover los TAG circulantes y depositarlos para reserva y disponer de los mismos cuando el organismo lo requiere. El almacenamiento de TAG es consecuencia, principalmente, de los lípidos que puede captar de la circulación y, en menor medida, de los que sintetiza a partir de precursores energéticos. Por otro lado, el músculo esquelético, que constituyen aproximadamente el 45% del peso corporal de la rata, utiliza cantidades considerables de lípidos como combustible. Los AG plasmáticos movilizados a partir del TA, o derivados de la hidrólisis de los TAG plasmáticos en los capilares en los que está presente la LPL, se oxidan fácilmente en el músculo (Tan et al., 1977).

Altos niveles de grasa dietaria (S30 vs S7) incrementaron la actividad de la enzima LPL en TAE (**Figura 22a**). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas debido al tipo de grasa dietaria, o al agregado de DD. Por otro lado, en músculo gastrocnemio (**Figura 22b**), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la enzima LPL entre ninguno de los grupos experimentales.

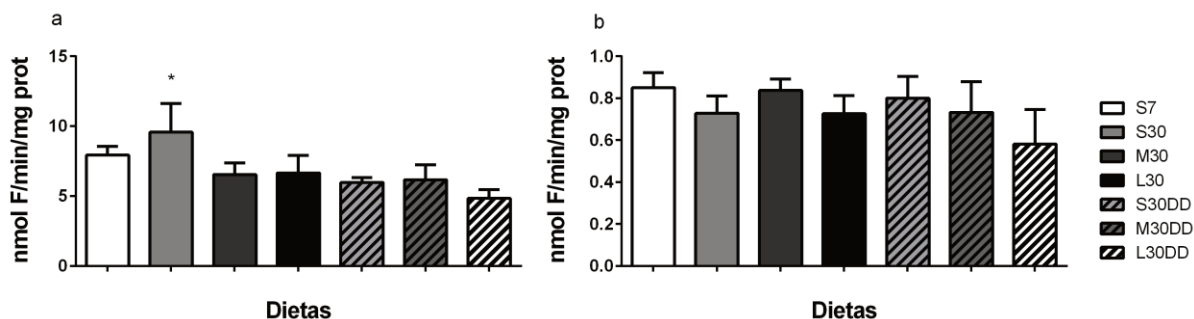


Figura 22: Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (a) y músculo gastrocnemio (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de

Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

4. Parámetros asociados a la regulación de los triacilglicéridos hepáticos

Los niveles de TAG en el hígado dependen de la incorporación de TAG de la dieta, de los lípidos provenientes de tejidos extrahepáticos, de la síntesis endógena (lipogénesis), catabolismo (β -oxidación), y de la capacidad de exportación a la circulación como TAG-pre- β -lipoproteínas.

4.1- Lipogénesis en hígado

4.1.1- Actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa

En la síntesis *de novo* de AG en hígado están implicadas diversas enzimas, entre ellas resulta clave destacar la ACC la cual es determinante en los niveles y disponibilidad de AG para su posterior esterificación, depósito, utilización o secreción al torrente sanguíneo.

La actividad de la enzima ACC (**Figura 23**) presentó un descenso significativo en animales alimentados con dietas ricas en grasa (S30 vs S7). Entre los grupos que consumieron 30% de grasa, el grupo M30 presentó una reducción significativa de la actividad de la enzima respecto a los demás grupos. Por el contrario, los animales alimentados con dieta L30DD mostraron un incremento de la actividad de dicha enzima.

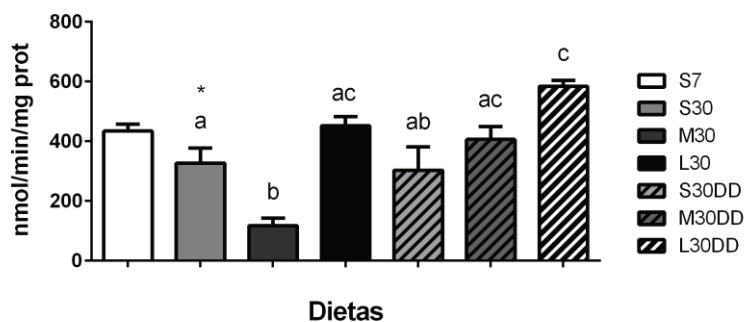


Figura 23: Actividad de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

4.1.2- Expresión de enzimas y reguladores de la síntesis de lípidos en hígado

Se evaluó la expresión génica de algunas enzimas y factores de transcripción claves responsables de la síntesis de AG: *Fas*, *Scd1* y *Srebp1c*.

En cuanto a las diferencias debidas a los niveles de grasa dietarios, sólo en *Scd1* (Figura 24c) se observaron diferencias significativas, mostrando un descenso en el grupo S30 vs S7. Del análisis de los grupos ricos en grasas, se observó que el grupo L30DD, tanto en *Fas* (Figura 24b) como en *Scd1*, mostró los valores más altos. Mientras que en el caso del *Srebp-1c* (Figura 24a), los grupos tratados con aceite de lino mostraron los mayores valores, seguidos de los grupos tratados con aceite de maíz.

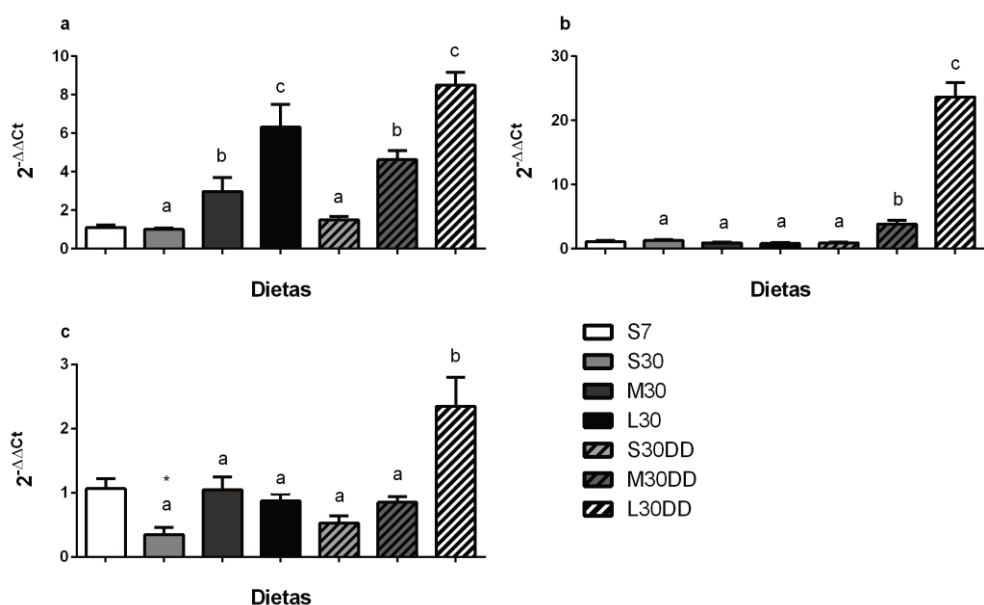


Figura 24: Niveles de ARNm de proteína de unión a elementos reguladores de esteroides-1c (a), sintasa de ácidos grasos (b) y estearoil-CoA desaturasa (c) en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

4.2- Secreción hepática *in vivo* de TAG-pre- β -lipoproteínas

Para evaluar la VSTG por parte del hígado, determinamos la velocidad de secreción de TAG hepáticos hacia el torrente sanguíneo mediante un test *in vivo*, y también cuantificamos los niveles de expresión de la proteína microsomal de transferencia de triacilglicéridos (*Mttp*), la cual cumple una doble función: por un lado, transporta los TAG hacia la proteína apoB durante la formación de las VLDL, y, por otro lado, cumple una función estructural en la formación y secreción de las VLDL.

Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas debido al incremento de los niveles de grasa dietaria (S30 vs S7), entre las dietas al 30% de grasa, se observó un incremento en los niveles de ARNm de *Mttp* (**Figura 25a**) en los grupos M30DD y L30DD, respecto a los demás grupos ricos en grasas.

En cuanto a la evaluación de la VSTG *in vivo* (**Figura 25b**), no se observaron diferencias estadísticamente significativas debido a ninguna de las variables experimentales en estudio.

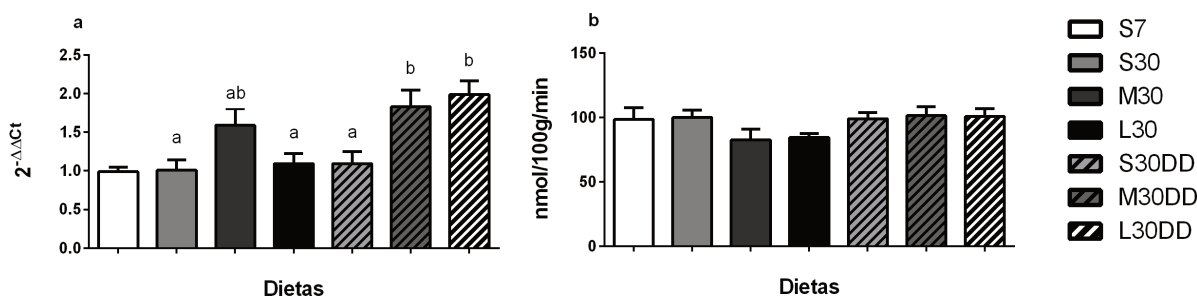


Figura 25: Niveles de ARNm de la proteína microsomal de transferencia de triacilglicéridos en hígado (a) y velocidad de secreción hepática de triacilglicéridos (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

4.3- Oxidación de ácidos grasos

4.3.1- Actividad de la enzima CPT-1a

La enzima carnitina palmitoiltransferasa-1a (CPT-1a), cataliza la entrada de AG al interior de la mitocondria, y es la principal reguladora de la β -oxidación de AG. Los AG de cadena media y larga (con longitud de cadena entre C12 a C18), necesitan utilizar el sistema CPT para poder ingresar a la matriz de la mitocondria e ingresar a la vía de la β -oxidación. La enzima CPT1 ubicada en la membrana externa de la mitocondria, cataliza la transferencia reversible de grupos acil-CoA a L-carnitina para formar ésteres de acilcarnitina. La acilcarnitina recién formada se trasloca a la matriz de la mitocondria a cambio de carnitina libre (Schlaepfer & Joshi, 2020).

Si bien no se observaron diferencias por el nivel de grasa dietaria, en los grupos ricos en grasa se observó un incremento estadísticamente significativo de la actividad enzimática CPT-1a (**Figura 26**) en los grupos L30 y L30DD respecto a los grupos S30 y S30DD.

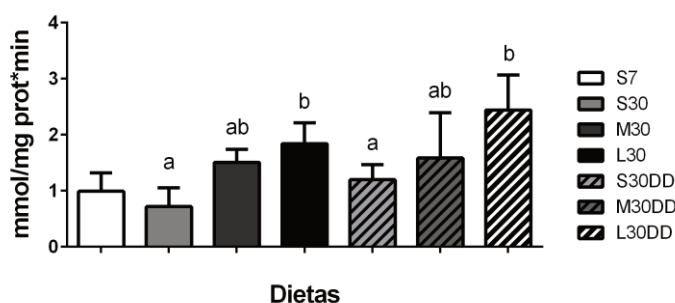


Figura 26: Actividad de la enzima carnitina palmitoiltransferasa-1a en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

4.3.2- Expresión de enzimas y reguladores de la oxidación de lípidos en hígado

El receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) funciona como factor de transcripción, promoviendo la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de AG, a través del aumento de la expresión de CPT-1a.

Tanto en los niveles de mRNA del *Ppara* como de la enzima *Cpt-1a* no se observaron diferencias por el nivel de grasa dietaria (S30 vs S7). En los grupos tratados con dietas ricas en

grasas, se observó un incremento significativo en los niveles de ARNm del *Ppara* (**Figura 27a**) en todos los grupos suplementados con DD, respecto de aquellos no suplementados; siendo el grupo L30DD aquel con los mayores niveles (6,4 veces mayor vs S30). Mostrando una tendencia similar, los niveles de ARNm de *Cpt-1a* (**Figura 27b**) mostraron un incremento en los grupos suplementados con DD respecto a los demás grupos ricos en grasas, siendo este incremento estadísticamente significativo sólo en el grupo L30DD.

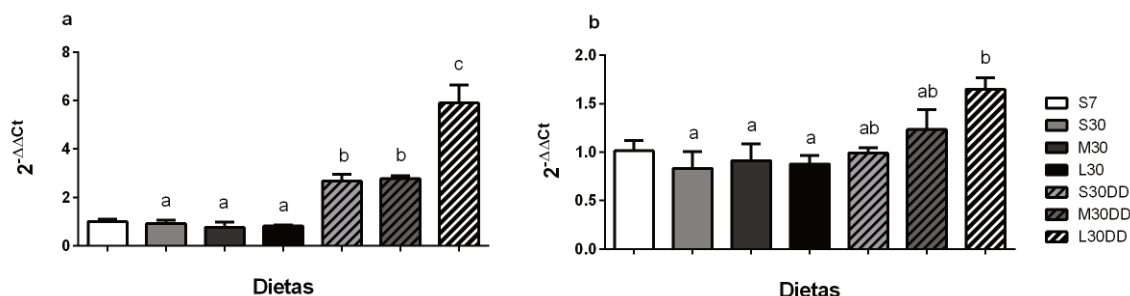


Figura 27: Niveles de ARNm del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (a), y de la enzima carnitina palmitoiltransferasa-1a (b) en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

Cuando los AG citosólicos se acumulan debido al deterioro de la capacidad oxidativa, o debido a una sobrecarga de las mitocondrias, se activan vías alternativas en los peroxisomas (β -oxidación peroxisomal) y en los microsomas (ω -oxidación). En la β -oxidación peroxisomal, la principal enzima responsable es la acil-CoA oxidasa (ACOX); mientras que en la ω -oxidación u oxidación microsomal, participa principalmente la familia Cyp4 del citocromo P450. Particularmente, la subfamilia Cyp4a metaboliza los AG de cadena media (C10-C16).

En el caso de la *Acox* (**Figura 28a**), se observó un incremento en los niveles de ARNm debido al incremento de grasa dietaria (S30 vs S7). A altos niveles de grasa, los grupos S30, S30DD y L30DD, mostraron los mayores niveles de transcripto, con respecto a las demás dietas ricas en grasas.

Respecto al *Cyp4a* (**Figura 28b**), a pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas debido al nivel de grasa dietaria; se observó un incremento en los

niveles de ARNm en ambos grupos tratados con aceite de lino (L30 y L30DD), con respecto a los grupos tratados con aceite de soja (S30 y S30DD).

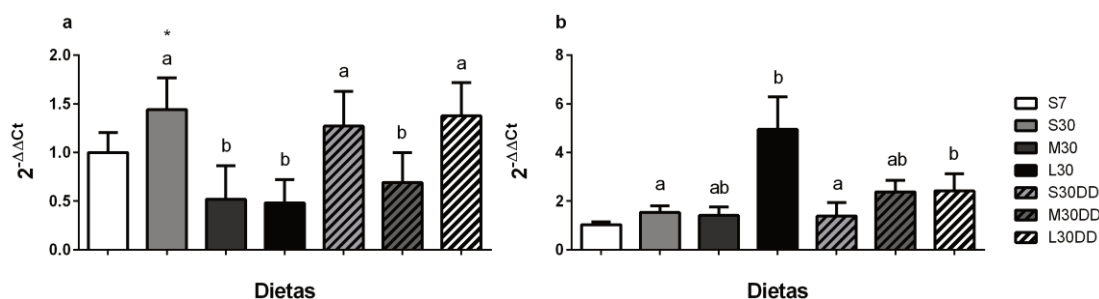


Figura 28: Niveles de ARNm de acil-CoA-oxidasa (a) y citocromo P₄₅₀ subfamilia 4a (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

4.4- Proteínas transportadoras de ácidos grasos en hígado

La transferencia de AG a través de la membrana plasmática de los hepatocitos, está mediada por proteínas de membrana como las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) y la translocasa de AG (CD36). Dentro de la familia de las FATP, dos de ellas se expresan a altos niveles en el hígado: FATP2 y FATP5.

Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de *Fatp2* y *Fatp5*, entre S30 y S7 (**Figura 29 a y b**). Respecto a *Fatp5*, ambos grupos tratados con aceite de lino fueron aquellos con los menores niveles de transcripción de dicha proteína, en comparación con las demás dietas ricas en aceite de maíz. Por otro lado, hubo un incremento estadísticamente significativo de los niveles de ARNm de la translocasa *Cd36* (**Figura 29c**), por el consumo de una dieta con altos niveles de grasa (S30 vs S7). Con respecto a los demás grupos experimentales, se observó que los animales alimentados con L30 y L30DD mostraron niveles significativamente más altos de ARNm respecto a los demás grupos.

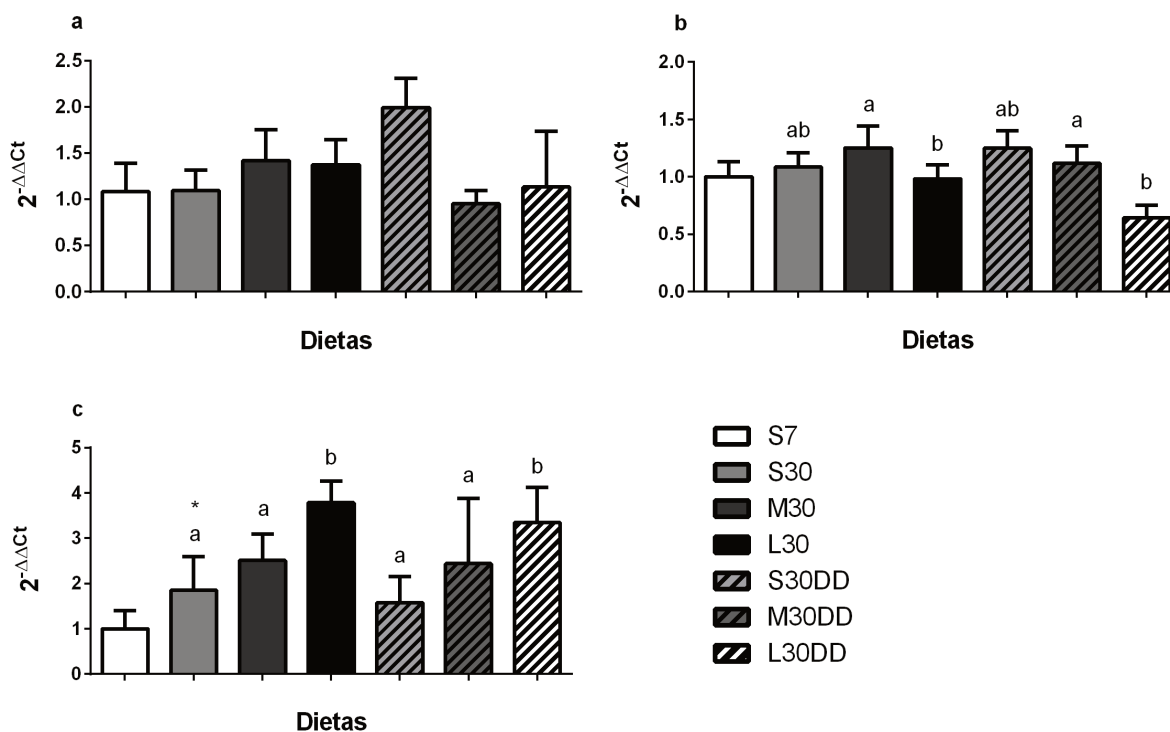


Figura 29: Niveles de ARNm de las proteínas transportadoras de ácidos grasos de cadena larga 2 (a), 5 (b) y translocasa de ácidos grasos (c). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

5. Marcadores de daño hepático

5.1- Transaminasas hepáticas

Tanto la aspartato aminotransferasa (AST), como la alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas que están normalmente presentes en el hígado y ayudan a metabolizar los aminoácidos, para que las células hepáticas obtengan energía. Ambas enzimas están normalmente en la sangre en niveles muy bajos, pero cuando el hígado está dañado, se liberan AST y ALT al torrente sanguíneo, aumentando sus niveles (Botros & Sikaris, 2013).

Con respecto a los resultados obtenidos, el incremento de los niveles de grasa dietaria no indujo diferencias significativas en los niveles de AST y ALT (**Figura 30**). Al analizar los grupos ricos en grasas, por un lado, los grupos M30 y S30DD mostraron un incremento significativo en

los niveles de AST, con respecto a los grupos S30 y L30DD. Por otro lado, los grupos M30 y M30DD mostraron los mayores niveles de ALT, con respecto a las demás dietas ricas en grasas.

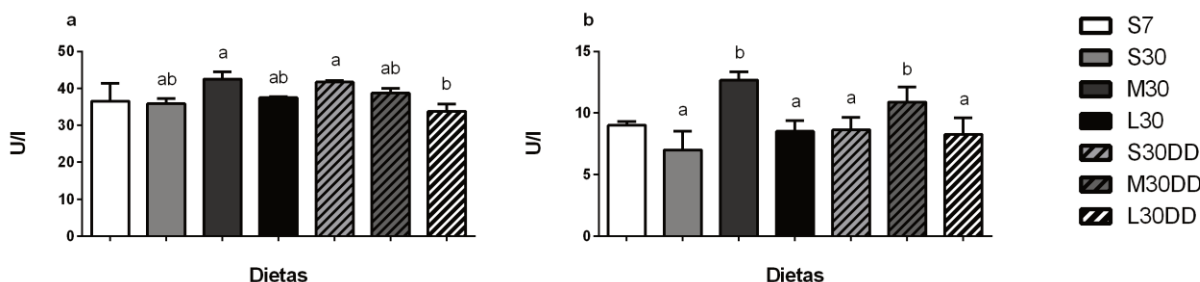


Figura 30: Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (a), alanina aminotransferasa (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

5.2- Estado de lipoperoxidación hepático

Las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se forman como subproducto de la peroxidación lipídica. Debido a que los peróxidos lipídicos son compuestos inestables, tienden a degradarse rápidamente en una variedad de subproductos, dentro de los cuales, el malondialdehído (MDA) es uno de los productos secundarios más conocidos de la peroxidación de lípidos y el cual se cuantifica mediante la técnica de TBARS.

Del análisis de TBARS (**Figura 31**) se pudo observar que todos los grupos ricos en grasas, suplementados con DD mostraron menores niveles de MDA, con respecto a los grupos no suplementados.

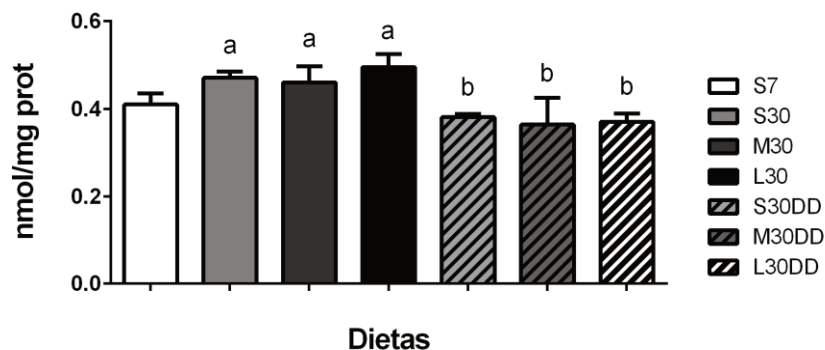


Figura 31: Niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

6. Histología

Como se mencionó en la introducción, el análisis histológico sigue siendo el *gold standard* para el diagnóstico del NAFLD. Los preparados hepáticos teñidos con Hematoxilina-Eosina, fueron analizados bajo el microscopio óptico en búsqueda de los elementos característicos del NAFLD: esteatosis (ya sea micro- o macrovesicular), hepatocitos balonzados y/o agregados inflamatorios.

En la **Figura 32** se muestran microfotografías representativas de los siete grupos dietarios. En las microfotografías con una amplificación de 100x, en los grupos M30 y M30DD, los parches de esteatosis micro/macrovesicular se pudieron localizar fácilmente alrededor de la región periportal (TP). En las microfotografías de 400x de las venas centrales (VC), no se observó ningún parche de esteatosis micro/macrovesicular. Por el contrario, en las microfotografías de 400x de la región portal, en los grupos S30, M30, S30DD y M30DD, detectamos grandes parches de esteatosis microvesicular, algunas macrovesículas y la presencia de hepatocitos balonzados. Los resultados histológicos de los grupos L30 y L30DD fueron similares a los del grupo S7 (grupo control bajo en grasas), diferenciándose de los otros grupos ricos en grasas, mostrando apenas unos pocos hepatocitos con microesteatosis.

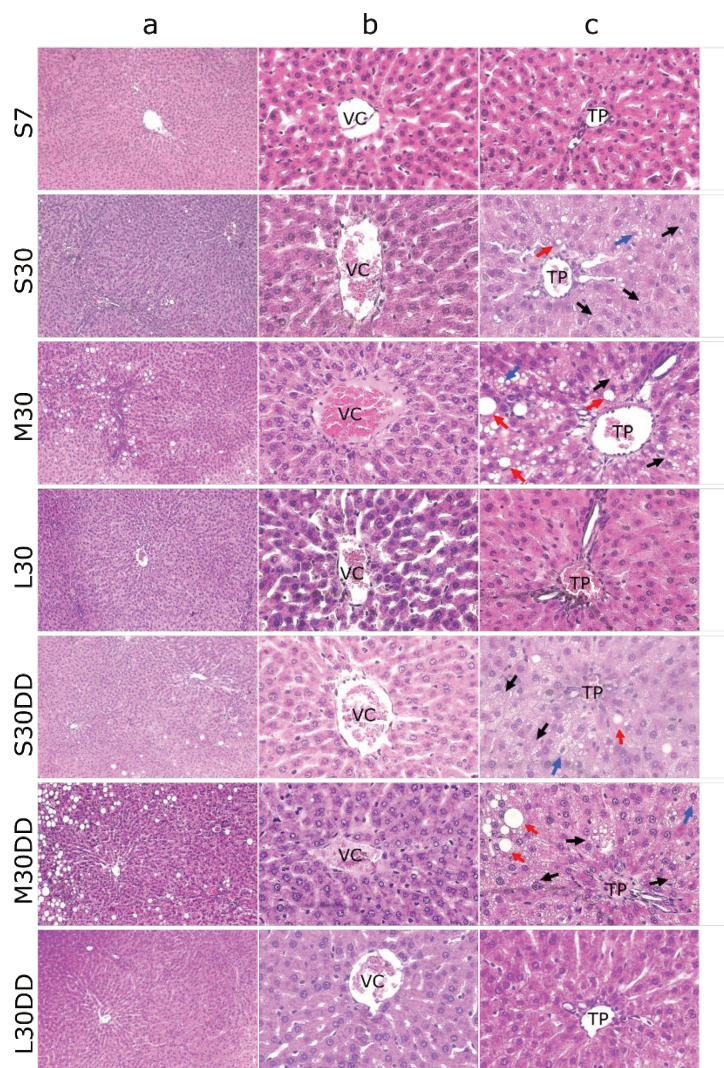


Figura 32: Microfotografías de los cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina. Columna (a), microfotografías del acino hepático con amplificación de 100x; columna (b), microfotografías de las venas centrales (VC) con una amplificación de 400x; columna (c), microfotografías de las tríadas portales (TP) con amplificación de 400x. Flechas negras, focos de microesteatosis; flechas rojas, macroesteatosis; flechas azules, hepatocitos balonizados.

En cuanto al análisis semicuantitativo de los cortes histológicos (**Figura 33**), el grupo S30 presentó un mayor grado de microesteatosis (18,5%) y macroesteatosis (0,5%), en comparación con S7. En cuanto a los grupos ricos en grasas, en M30 se observó el mayor porcentaje, tanto de micro- como de macroesteatosis (28,4% y 4%, respectivamente), en comparación con los grupos S30 y L30. El grupo L30 mostró un grado muy bajo de microesteatosis (1,1%), sin macroesteatosis, en comparación con los grupos M30 y S30. La adición de DD a las dietas no indujo diferencias estadísticamente significativas en dichos parámetros.

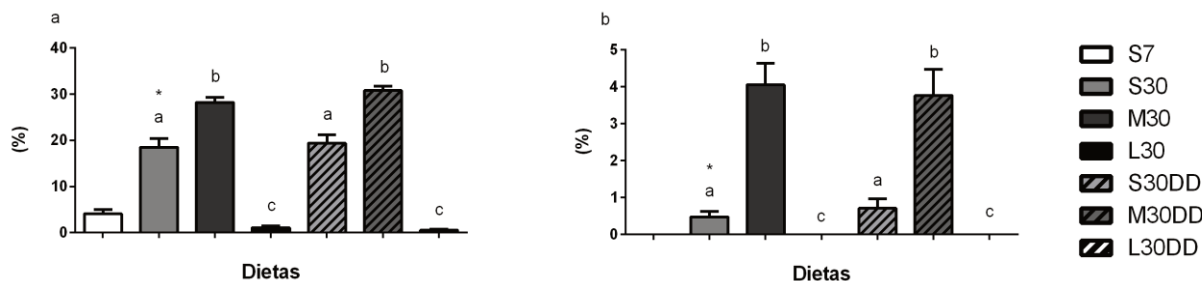


Figura 33: Análisis semicuantitativo de microesteatosis (a) y macroesteatosis (b). Ambos tipos de esteatosis se evaluaron con un aumento de 400x y el porcentaje se calculó como el número de células con LD/número de células totales por foco. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

Se cuantificó también, el número de hepatocitos balonizados (**Figura 34a**). El mismo mostró un incremento en S30 vs S7 debido al incremento de los niveles de grasa dietaria. En cuanto a los grupos ricos en grasas, se encontró una reducción significativa del número de hepatocitos balonizados en ambos grupos tratados con aceite de lino.

El número de agregados de células inflamatorias (**Figura 34b**), como un posible marcador del estado inflamatorio hepático, no mostró cambios debidos al incremento de grasa dietaria (S30 vs S7), pero sí respecto del tipo de grasa. A través de este análisis, se observó que los animales tratados con dietas conteniendo aceite de maíz, mostraron los mayores valores de agregados de células inflamatorias; mientras que aquellos tratados con aceite de lino, mostraron los valores más bajos.

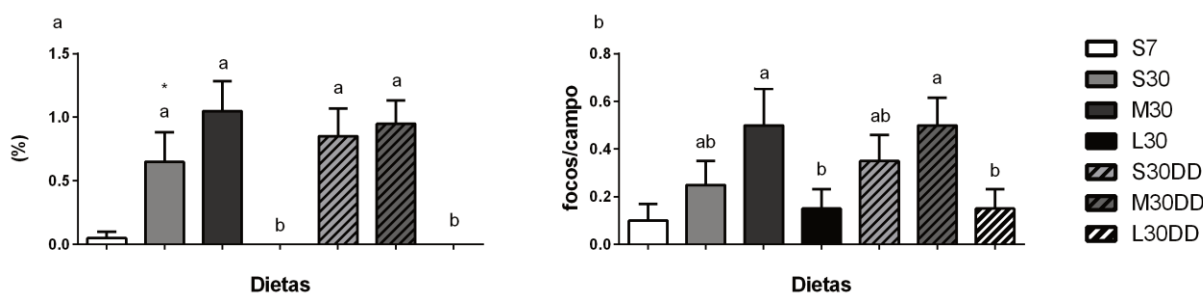


Figura 34: Cuantificación de hepatocitos balonizados (a) y agregados inflamatorios (b). El número de hepatocitos balonizados se midió con un aumento de 400x y el grado se calculó como el número de hepatocitos balonizados/número de células totales por foco. Los agregados inflamatorios se midieron con un aumento de 100x y se expresaron como número de agregados por campo. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

El último elemento histológico relacionado al NAFLD/NASH, es el desarrollo o no de fibrosis hepática. El mismo fue cuantificado a partir del CPA (%), como se describió en la sección de Metodología, tanto a nivel de vena central (VC) (**Figura 35a**), como de la triada portal (TP) (**Figura 35b**). Si bien los niveles fueron extremadamente bajos en todos los grupos en ambas regiones del parénquima hepático, se observó a nivel de VC que el grupo M30 fue aquel con el mayor valor de CPA entre los grupos dietarios. Del análisis a nivel de TP, los grupos M30 y M30DD fueron los que mostraron los mayores depósitos de colágeno, seguidos por S30 y S30DD.

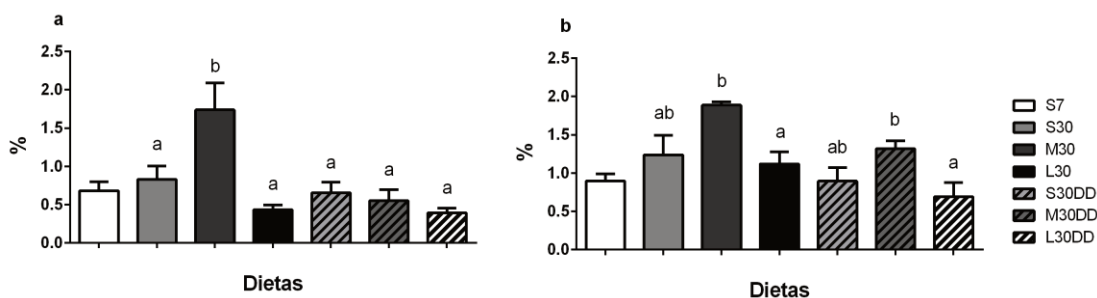


Figura 35: Cuantificación del contenido de colágeno en la región de la vena central (a) y en la región portal (b). Resultados expresados como el promedio \pm SEM. S7: dieta control conteniendo 7% de aceite de soja; S30: dieta conteniendo 30% de aceite de soja; M30: dieta conteniendo 27% de aceite de maíz+ 3% de aceite de soja; L30: dieta conteniendo 27% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja; S30DD: dieta conteniendo 29% de aceite de soja+ 1% de DD; M30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de maíz + 3% de aceite de soja + 1% de DD; L30DD: dieta conteniendo 26% de aceite de lino+ 3% de aceite de soja + 1% de DD. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante ANOVA 2x3 seguido de test de Tukey.

En la **Figura 36** se muestra el resultado del análisis de interacción entre los tipos de aceite dietarios y la suplementación con DD, en la región de la TP. A partir de esto, observamos una tendencia en los grupos suplementados con DD a disminuir el contenido de colágeno depositado en dicha región, con respecto a sus correspondientes grupos sin suplementación.

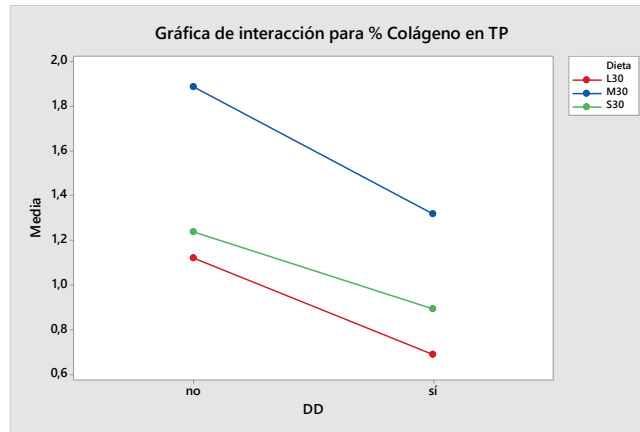


Figura 36: Gráfica de interacción del efecto de los DD sobre el porcentaje de CPA en la región de la triada portal.

Discusión

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar algunos de los potenciales efectos benéficos que podría tener tanto el aceite de lino virgen, como la suplementación de aceites comestibles disponibles comercialmente con una mezcla de TF y FE, sobre el desarrollo de hígado graso y otras alteraciones metabólicas inducidas por dietas con altos niveles de grasa, en un modelo animal. Se estudiaron los efectos del aceite de lino virgen, caracterizado principalmente por un alto contenido de ALA, γ -TF y β -sitosterol. Por otro lado, se evaluó el efecto de la fortificación de aceites comerciales de alto consumo en nuestra población (como el aceite de soja y maíz), con una mezcla de TF y FE, obtenidos a partir de DD de aceite de soja, como fuente de γ -TF, β -sitosterol, stigmasterol y campesterol, principalmente.

Entre los principales hallazgos, destacamos que la alimentación con una dieta conteniendo altos niveles de aceite de lino virgen, ya sea suplementado o no con DD, logró atenuar la esteatosis hepática inducida por elevados niveles de grasa dietaria. Por consiguiente, la tesis se focalizó en el estudio de los mecanismos regulatorios involucrados en el metabolismo de los TAG hepáticos, estudiando la actividad y/o expresión de enzimas, factores de transcripción, proteínas transportadoras, y otros agentes involucrados en esta vía metabólica. A su vez, se llevaron a cabo evaluaciones histológicas y del estado oxidativo hepático, los cuales se encuentran directamente relacionados con el desarrollo del NAFLD. Por último, se analizaron otros factores relacionados a la regulación periférica de los TAG (suero y TAE), que tienen injerencia sobre los TAG hepáticos.

1. Modelo experimental

En este trabajo de Tesis se recurrió a un modelo experimental de ratas macho de la cepa Wistar, que en diversos aspectos reproduce las alteraciones metabólicas observadas en humanos. Los modelos animales, si bien poseen ciertas limitaciones, son recursos invaluable para la investigación biomédica, incluyendo la investigación sobre alteraciones nutricionales (Bagnol et al., 2012; Warden & Fisler, 2008). El primer estudio nutricional hecho en ratas de experimentación fue el publicado por Savory (1863), titulado *Experiments on food; its destination and uses* (Savory, 1863). En este trabajo, el autor justificó el uso de ratas como modelo experimental para estudios nutricionales, basándose en dos aspectos: primero, las ratas al ser animales omnívoros aceptan casi cualquier dieta; segundo, debido a su pequeño tamaño son sencillas de manipular. Sumado a esto, en el simposio de la revista *Journal of Nutrition* (2008) sobre investigación nutricional en modelos animales, las ratas fueron reconocidas como un

recurso o herramienta clave para el descubrimiento de 6 de las 9 enfermedades conocidas por deficiencia de vitaminas (Baker, 2008).

Como se ha mencionado previamente en la introducción, un modelo animal "ideal" debería reflejar el espectro humano completo de la enfermedad hepática, desde el punto de vista clínico, bioquímico e histológico. Referido a esto, las ratas de la cepa Wistar han demostrado replicar prácticamente todos los elementos característicos de la patología del NAFLD y del síndrome metabólico asociado, observados en pacientes humanos (Wardani et al., 2019). La elección del uso de animales macho se sustentó en la necesidad de minimizar los cambios asociados con el ciclo estral fisiológico de las hembras y de esta manera reducir el número de variables introducidas en el diseño experimental (Andersen et al., 1997; Gallo et al., 1987). El tratamiento dietario se realizó en animales en crecimiento, a los fines de evaluar cambios nutricionales que podrían afectar el desarrollo de estos, como así también, para investigar el efecto sobre potenciales alteraciones lipídicas en una etapa con elevada tasa de recambio metabólico, en la cual los AG son altamente incorporados y metabolizados en los tejidos.

El presente estudio permitió observar los efectos de distintas fuentes de lípidos dietarios, en dietas conteniendo niveles elevados de grasa (30% p/p), suplementadas o no con DD. A su vez, se empleó un control con niveles recomendados de lípidos (7% p/p) según el Comité *ad hoc* del *American Institute of Nutrition* para roedores en crecimiento AIN-93G (Reeves et al., 1993), y un control secundario conteniendo 30% de aceite de soja. Los elevados niveles de grasa dietaria tuvieron como fundamento estimular la acreción de lípidos, principalmente en el tejido clave en la regulación del metabolismo de TAG, el hígado.

Con respecto a las fuentes de grasa dietaria utilizadas para la elaboración de las dietas, se eligieron aceites que contienen diferentes proporciones de PUFA de las familias n-6 y n-3: aceite de soja, aceite de maíz y aceite de lino. En primer lugar, tenemos al aceite de soja, el cual es el aceite con la proporción n-6/n-3 recomendada actualmente (8/1). En segundo lugar, tenemos al aceite de lino, el cual constituye una de las fuentes vegetales más ricas en PUFA n-3 (con una relación n-6/n-3 de 1/3), dada por su alto contenido de PUFA n-3 (principalmente ALA). Por último, tenemos el aceite de maíz, que presenta una proporción n-6/n-3 muy elevada (20/1), procurando mimetizar los desequilibrios característicos de la dieta occidental. Estudios previos realizados por otros autores, han demostrado que las distintas relaciones n-6/n-3, características de cada dieta, tienen un impacto importante sobre las distintas funciones metabólicas (De Lorgeril et al., 1994) (Patterson et al., 2012).

En el caso particular del aceite de lino, a diferencia de los otros dos aceites comerciales utilizados, el mismo fue obtenido en nuestro laboratorio a partir de semillas de lino de la variedad *Caburé*, mediante un proceso de prensado en frío. Esta particularidad hace que el aceite de lino virgen posea un elevado contenido de TF (principalmente γ -TF) y FE (principalmente β -sitosterol), entre otros compuestos, a diferencia de los aceites comerciales, donde una parte de estos compuestos son removidos durante el refinamiento de los mismos.

Adicionalmente, los aceites dietarios a altos niveles de grasa, se han incorporado a las dietas experimentales solos o suplementados con DD. Como se mencionó previamente, los DD son un sub-producto de la industria aceitera que, entre otros compuestos, poseen un alto contenido de compuestos bioactivos, como TF y FE. Las dietas HF fueron suplementadas con un extracto purificado de DD de aceite de soja, compuesto por una mezcla rica en TF (principalmente γ -TF), y FE (principalmente β -sitosterol, stigmasterol y campesterol). Esta suplementación persigue una doble finalidad: por un lado, gracias al poder antioxidante de estos compuestos, los mismos ejercen una función protectora sobre los PUFA presentes en los aceites; por otro lado, estos compuestos considerados bioactivos poseen funciones benéficas sobre la salud humana, como antioxidantes, antiinflamatorios, hipolipemiantes, entre otras (Gutte et al., 2015).

Al menos para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en demostrar que una dieta HF conteniendo 30% p/p de aceite de lino virgen, suplementada o no con DD, previene la esteatosis hepática inducida por una dieta HF en un modelo animal con esteatosis moderada. La suplementación con DD permite conferir a los aceites comestibles un valor agregado, al mismo tiempo que se revaloriza un sub-producto de la industria aceitera. Por su parte, el aceite de lino virgen parecería tener grandes beneficios para la salud humana en comparación con el resto de los aceites vegetales comestibles. Estos beneficios se atribuyen, no sólo a su elevado contenido de ALA, sino también su contenido de compuestos biológicamente activos (Gutte et al., 2015).

Los resultados de este estudio podrían aportar al avance del conocimiento sobre las propiedades bioactivas de los componentes presentes en el aceite de lino, así como de algunos de los compuestos bioactivos obtenidos a partir de DD de la industria aceitera. Además, podrían contribuir a una mayor comprensión de los mecanismos bioquímicos asociados con la NAFLD, así como de algunos de los indicadores bioquímicos utilizados para detectarla y darle seguimiento.

1.1- Dietas *high-fat* y ganancia de peso

El uso de dietas ricas en grasas (con un contenido $\geq 30\%$ de su contenido energético como grasa) han demostrado inducir obesidad no sólo en humanos, sino también en modelos animales de ratas y ratones (Boozer et al., 1995; Bourgeois et al., 1983; Ghibaudi et al., 2002; M. Takahashi et al., 1999). Tanto en ratas (Boozer et al., 1995; Ghibaudi et al., 2002) como en ratones (Bourgeois et al., 1983; M. Takahashi et al., 1999) se ha encontrado una correlación positiva entre el nivel de grasa dietaria y el incremento de peso corporal y/o del contenido del TA. Generalmente, se utilizan dietas altas en grasas en el rango del 30 al 78% de la ingesta total de energía, ya sea agregando un tipo de grasa particular en la formulación de la dieta (conocidas como dietas *high fat*), o utilizando una variedad de alimentos de supermercado ricos en grasas y azúcares (lo que se conoce como dieta de cafetería) (Buettner et al., 2007). Se ha demostrado que el uso de dietas altas en carbohidratos y bajas en grasas, no son tan eficaces como las dietas altas en grasas y bajas en carbohidratos, para inducir obesidad (Ghibaudi et al., 2002; Harrold et al., 2000). Sin embargo, es importante aclarar que algunos estudios han informado que no todos los tipos de grasa son obesogénicas, y que el perfil de AG dietarios es una variable más importante que la cantidad de energía proveniente de las grasas (Bell et al., 1997; Bourgeois et al., 1983).

Respecto a lo observado en el presente trabajo de tesis, los animales tratados mostraron una buena aceptación de las dietas durante todo el período experimental, exhibiendo un buen estado de salud, sin ningún tipo de manifestación de deterioro aparente debido a los tratamientos recibidos. Los animales alimentados con una dieta rica en grasas (S30 vs S7) mostraron un incremento en la ganancia de peso, la cual se correlacionó positivamente con un incremento en la ingesta energética. Sin embargo, este incremento de peso no fue suficiente para generar obesidad (aumento de peso $\geq 15\%$ del peso del grupo alimentado con dieta control según Svensson et al., (1996)), y esto concuerda con lo reportado por otros autores que también utilizaron dietas ricas en grasas (Andreoli et al., 2009; Bernal et al., 2006; Hashimoto et al., 2013). Otras posibles variables que pudieron estar relacionadas al impedimento del desarrollo franco de obesidad en los animales tratados con dietas ricas en grasas, son: la edad de los animales utilizados (Tschop & Heiman, 2001), el tiempo de tratamiento (Bagnol et al., 2012), la palatabilidad del alimento (Leigh et al., 2018) y el tipo de AG dietarios (Bray et al., 2002; Buettner et al., 2007; Hariri et al., 2010). El incremento de peso en los animales tratados con S30 vs S7, se correlacionó con el incremento en el peso total del TAR. Esto soporta las hipótesis de otros

autores (Boozer et al., 1995; Ghibaudi et al., 2002), donde los animales tratados con dietas HF mostraron un incremento del TA debido a la ingesta de mayores niveles de grasa.

En cuanto a las dietas conteniendo 30% (p/p) de grasa, los grupos L30 y L30DD, lograron prevenir el incremento de peso corporal observado en S30, M30, S30DD y M30DD. Estas diferencias observadas en la ganancia de peso de los animales tratados con dietas ricas en grasas, podrían relacionarse con la composición de AG de cada dieta. Si bien los tres tipos de aceites vegetales empleados en las dietas, son ricos en PUFA, el perfil de AG de cada uno de ellos es diferente. Massiera et al., (2003) demostraron que los PUFA de la serie n-6 son más adipogénicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que sus homólogos n-3. En relación a esto, los grupos L30 y L30DD mostraron los menores niveles tanto de peso del TAR, como de TAE, respecto a las demás dietas ricas en grasas.

Dado que los grupos con mayor contenido dietario de PUFA n-3: L30 y L30DD, lograron prevenir el aumento de peso corporal y del TA, observado en las demás dietas ricas en grasas, este efecto podría estar relacionado con los efectos hipolipemiantes de los PUFA n-3 (Moussavi et al., 2008a; Patterson et al., 2012). Cabe destacar que, a pesar de las diferencias observadas en la ganancia de peso de los grupos HF, ninguno de ellos alcanzó a desarrollar obesidad. Resultados similares fueron encontrados en ratas y ratones tratados con distintos tipos de dietas ricas en grasas (Akieda-Asai et al., 2013; Harrold et al., 2000).

Otra variable de nuestras dietas experimentales fue la relación PUFA n-6/PUFA n-3 de los aceites utilizados. Aunque tanto el LA como el ALA se consideran AG esenciales, muchos trastornos metabólicos son consecuencias adversas del exceso de PUFA n-6 y de la ingesta desequilibrada de PUFA n-6/n-3 (Lands, 2012). La elevada relación PUFA n-6/n-3 característica de la dieta occidental, puede generar un estado pro-inflamatorio en el organismo, favoreciendo el desarrollo de ECNT, especialmente aquellas asociadas al síndrome metabólico (Gormaz et al., 2010). Por el contrario, una relación n-6/n-3 baja se ha relacionado con múltiples efectos benéficos para la salud. De Lorgeril et al., (1994) demostraron que al reemplazar aceite de maíz (alto en LA) con aceite de oliva (bajo en LA) para alcanzar una proporción 4:1 de LA/ALA, disminuía un 70% la mortalidad total de los pacientes. Sumado a esto, ECNT como la diabetes, obesidad, artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, están asociadas con una mayor producción de PGE2, LTB4, TXA2, IL-1 β , IL-6 y TNF- α , la cual está directamente relacionada con el aumento en la ingesta de PUFA n-6 y la disminución de los PUFA n-3 dietarios (Patterson et al., 2012). Las relaciones PUFA n-6/PUFA n-3 de los aceites experimentales fueron, Maíz>Soja>Lino (alrededor de 20:1; 8:1 y 1:3, respectivamente). Este último resultado, también

es útil para analizar el hecho de que si bien, no hubo diferencias en la ingesta energética entre las dietas ricas en grasas, los animales alimentados con la menor relación n-6/n-3 (L30 y L30DD) mostraron los menores valores de ganancia de peso.

Respecto a la suplementación con TF y FE, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la ganancia de peso. Por un lado, existen estudios que asocian a los FE con una reducción de la ganancia de peso (Feng et al., 2018). En este sentido, Feng et al., (2018), demostraron que la suplementación de dietas HF, tanto con β -sitosterol como con stigmasterol, lograron una reducción de la ganancia de peso en ratones macho de la cepa C57BL/6J. Por otro lado, Gutierrez et al., (2012) en un estudio utilizando ratas Wistar alimentadas con dietas HF suplementadas con TF no obtuvieron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los grupos. Sumado a esto, en un estudio llevado a cabo por Kim et al., (2013) donde tratan ratones machos de la cepa C57BL/6J con una dieta HF, con y sin TF, observaron la misma ganancia de peso en ambos grupos, lo cual implicaría que el agregado de TF dietarios no influye directamente en este parámetro.

1.2- Perfil de AG suero y TAE

A diferencia de lo que ocurre en condiciones alimentadas, donde el perfil de AG dietarios tiene una alta implicancia en el contenido resultante de los mismos a nivel de circulación, los AG séricos de animales ayunados, reflejan principalmente la contribución de los AG provenientes de los lípidos secretados como VLDL-TAG por el hígado y los resultantes de la metabolización de lípidos (Legrand et al., 2010).

El incremento de los niveles de grasa dietaria (S30 vs S7), llevó a un incremento del contenido total de PUFA circulantes, sin cambios significativos en los niveles de SFA y MUFA. En general, se han encontrado correlaciones positivas entre los PUFA dietarios y la cantidad relativa de PUFA en sangre; aunque estas asociaciones tienden a ser más variables para determinados PUFA, como el AA, que para otros como el LA y EPA, donde es mucho más robusta. En cambio, para los SFA y MUFA, las correlaciones entre la ingesta dietética y el contenido en plasma, plaquetas y eritrocitos son inconsistentes y generalmente más débiles (Khor et al., 2019). En relación a esto, el incremento de los PUFA circulantes en S30, vino dado por un aumento de los PUFA de la familia n-6, principalmente de LA. Si bien ambas dietas poseen el mismo tipo de lípidos dietarios y, por lo tanto, el mismo perfil de AG; al haber un mayor contenido total de LA en la dieta S30, esto pudo llevar a una mayor captación del mismo, la cual se vio finalmente reflejado en los mayores niveles de LA circulante.

En el caso de las dietas ricas en grasas, observamos que los grupos tratados con aceite de lino fueron aquellos con el mayor contenido de PUFA totales circulantes. Más precisamente, ambos fueron los grupos con el menor contenido de PUFA n-6, y el mayor contenido de PUFA n-3, teniendo como AG mayoritario al ALA. Nuestros datos coinciden con aquellos reportados por Babu et al., (1997), los cuales trataron ratas hembras Sprague-Dawley con una dieta HF conteniendo 6,2 y 10% de aceite de lino, y encontraron que el perfil de AG en suero reflejaba la composición de los principales AG dietarios, como así también las proporciones entre ellos, en cada dieta. Por otro lado, los grupos tratados con aceite de soja mostraron los mayores valores de LA, el principal PUFA n-6 presente en las dietas experimentales.

Estudios de nuestro grupo (Andreoli et al., 2009; Fariña et al., 2015; Masson et al., 2015; Sain et al., 2015; Scalerandi, 2013), y de otros autores (Legrand et al., 2010), han demostrado que la composición de AG del TAE es la que mejor refleja la constitución de los lípidos consumidos. Sin embargo, la síntesis endógena, el transporte y los procesos de conversión de los AG (elongación y desaturación), así como el nivel de grasa dietaria, son factores importantes que contribuyen a la composición del TAE (Hodson et al., 2008). Los animales tratados con S30 vs S7 mostraron menores niveles relativos de SFA y MUFA, junto con un incremento relativo de los PUFA totales, tanto n-6, como n-3. Este incremento en los niveles de PUFA totales en el TAE de S30 vs S7, coincide con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Gerstner, 2020).

El TAE posee una alta capacidad de incorporar AG de circulación y de sintetizar AG de hasta 18 átomos de carbono (oleico), sin embargo, tiene una baja capacidad de derivar AG a la biosíntesis de LC-PUFA. Esto pudo observarse dado que, pese al elevado nivel de precursores de LC-PUFA (LA y ALA) incorporados en el TAE, los niveles de AG de > 18 C fueron bajos en todos los grupos tratados con dietas HF.

En el caso del perfil de TAE de las dietas HF, destacamos que los grupos tratados con aceite de maíz mostraron los menores niveles de PUFA, y los mayores niveles de MUFA totales, principalmente debido a su alto contenido de OA. Este resultado, coincide con el perfil de AG del aceite de maíz utilizado para dichas dietas, el cual es el aceite dietario con el mayor contenido de OA. A su vez, coincide con lo observado por Radcliffe et al., (2004), los cuales trataron ratas macho Sprague-Dawley con dos dietas experimentales: una conteniendo aceite de maíz, y otra conteniendo aceite de semilla de algodón. Estos, encontraron que, el mayor contenido de OA del aceite de maíz respecto del aceite de semilla de algodón, se vio reflejado en el perfil de AG, tanto de circulación, como en TA (Radcliffe et al., 2004). Por otro lado, los grupos tratados con aceite

de lino mostraron los menores valores de PUFA n-6, junto con los mayores niveles de PUFA n-3. Es posible que el incremento de ALA en TAE de animales de los grupos L30 y L30DD, pueda estar asociado a una elevada captación de dicho AG desde circulación, por la LPL del TAE. Sumado a esto, si bien las dietas experimentales no son ricas en LC-PUFA, se observó un incremento en los niveles de EPA y 22:5 n-3, en los grupos tratados con aceite de lino, con respecto a las demás dietas ricas en grasas. Esto muestra no sólo una mayor captación de ALA en el TAE, sino también de los LC-PUFA n-3 generados a partir del mismo en el hígado, que son luego excretados como parte de las VLDL-TAG. A pesar de las diferencias observadas en el contenido de PUFA n-6 y n-3 en los grupos tratados con aceite de lino, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de PUFA totales, entre los grupos ricos en grasas.

Más allá de las diferencias encontradas en AG puntuales, producto de la captación y metabolización de estos en los distintos tejidos, los perfiles de AG en circulación y TAE, reflejan a grandes rasgos el perfil de los principales AG de cada dieta experimental.

1.3- Utilización de la glucosa

El diagnóstico de MAFLD contempla la presencia de NAFLD (detectada mediante biomarcadores séricos, diagnóstico por imágenes o histología), y al menos uno de los siguientes criterios: (a) sobrepeso/obesidad, (b) diabetes tipo 2 y (c) desregulación metabólica. Este último punto, implica al menos 2 de los siguientes factores: aumento de circunferencia de cintura, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol HDL en suero, hipertensión, hiperglucemia en ayunas, resistencia a la insulina e inflamación subclínica crónica (Mantovani, 2021).

El concepto de MAFLD tratado en la introducción, contempla la presencia de NAFLD en simultáneo con alteraciones características de la diabetes de tipo II, como la hiperglucemia en ayunas y la resistencia a la insulina. Esto se debe a que la NAFLD es una comorbilidad frecuente en la patología de la diabetes tipo II. Se estima que alrededor del 70% de los pacientes obesos con diabetes, padecen NAFLD y hasta un 30-40% tienen NASH (Cusi, 2016). Más precisamente, la resistencia a la insulina, es uno de los principales mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo y la progresión de la NAFLD, ya que las altas concentraciones de insulina estimulan la adipogénesis y la lipotoxicidad (Gaggini et al., 2013).

Los animales tratados con dietas HF, son uno de los modelos más utilizados para el estudio de la diabetes de tipo II (Winzell & Ahren, 2004). Después de unas semanas, la dieta HF suele generar un aumento del peso corporal y del TA, lo que conlleva al desarrollo de insulino-

resistencia periférica y una alteración de la tolerancia a la glucosa. Si bien estos modelos animales no siempre llegan a desarrollar una diabetes de tipo II, sí muestran una intolerancia a la glucosa, generando hiperglucemia e hiperinsulinemia (Winzell & Ahren, 2004).

A partir del TTOG realizado en el presente trabajo, observamos, en primer lugar, un incremento en los valores basales de glucosa en S30 vs S7. Aproximadamente a los 60 minutos de la experiencia, donde se alcanza el pico de glucosa sérica, no se encontraron diferencias entre S30 vs S7. Finalmente, a los 120 minutos, el grupo S7 logró normalizar los niveles séricos de glucosa, mientras el grupo S30 no logró hacerlo en los 180 minutos que dura la experiencia. Estos datos, en su conjunto, muestran una menor capacidad de utilización de glucosa en respuesta a la carga de glucosa en el grupo S30, la cual se observó mediante un incremento en el AUC en S30 vs S7, pese a que el mismo no llegó a ser estadísticamente significativo ($p=0,067$). Este resultado podría estar relacionado con el incremento de los TAG a nivel hepático. Es conocido que elevados niveles de TAG tisulares, contribuyen a una alterada respuesta a la insulina y consecuentemente, al desarrollo de insulino-resistencia (Matsuzaka & Shimano, 2011; Randle et al., 1963). Los animales que consumieron S30 mostraron un incremento de los TAG hepáticos, junto con una disminución de los TAG plasmáticos. El mecanismo mediante el cual el hígado tiende a normalizar el contenido de TAG, es conocido como Ciclo de Randle o ciclo glucosa-AG, el cual implica la inhibición de la vía glucolítica, para favorecer el uso de los AG componentes de los TAG como fuente de energía, cuando el contenido de AG plasmáticos es alto en proporción al de glucosa (Randle et al., 1963).

Si bien las dietas HF suelen generar un cuadro de insulino-resistencia periférica e intolerancia a la glucosa (Winzell & Ahren, 2004), además de la cantidad de grasa dietaria, este efecto depende del tipo de AG dietarios (Storlien et al., 1996). Del análisis de los grupos HF, encontramos que los grupos L30 y L30DD mostraron los menores valores de glucosa basal, los menores valores de glucosa a los 60 min (donde se observó el pico máximo de glucosa post-carga), y los menores niveles séricos de glucosa a los 180 min, alcanzando niveles similares a los del grupo control S7. Estos valores, llevaron a que ambos grupos tratados con aceite de lino, sean aquellos con la menor AUC, entre los grupos ricos en grasas. Gonçalves et al., (2018), trataron ratones de la cepa C57/BL6 durante 8 semanas, con dos dietas HF: una control (HFC) y otra adicionada con 10% de ALA como aceite de lino (HF+ALA). Los autores reportaron que los animales tratados con la dieta HFC, mostraron una reducida tolerancia a la glucosa (mayor AUC), en comparación con el grupo HF+ALA. Sumado a esto, los animales tratados con la dieta HF+ALA lograron reducir los niveles séricos de glucosa basal y de TAG hepáticos, respecto al

grupo HFC. Estos autores concluyen que la suplementación con ALA mejora la tolerancia a la glucosa y previene la esteatosis hepática, en un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por una dieta HF. En concordancia con lo encontrado por dichos autores, los grupos L30 y L30DD caracterizados por un alto contenido de ALA (~53%), a pesar de ser ambos grupos ricos en grasas, lograron prevenir la intolerancia a la glucosa observada en los demás grupos tratados con dietas HF.

Como se mencionó previamente, la diabetes de tipo II se caracteriza por la resistencia periférica a la insulina. Si bien esto comprende varios tejidos, el principal tejido involucrado en la captación de glucosa estimulada por insulina es el músculo esquelético (DeFronzo et al., 1985). En el músculo esquelético, esta captación de glucosa depende de una compleja vía de señalización que culmina con la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 a la superficie celular (Houseknecht & Kahn, 1997). Numerosos estudios demuestran que la producción de ROS y RNS, alteran la captación y almacenamiento de glucosa, mediante perturbaciones en los distintos puntos de control de dicha vía de señalización (Dokken et al., 2008; Hansen et al., 1999; JeBailey et al., 2007). Por este motivo, es lógico pensar que moléculas con capacidad antioxidante como los TF y FE, puedan tener efectos positivos sobre la tolerancia a la glucosa, mediante la atenuación del estrés oxidativo. Sin embargo, en el presente trabajo la suplementación con DD, con alto contenido de γ -TF y β -sitosterol, no ha generado cambios en la captación *in vivo* de glucosa. La falta de efectos de la suplementación con DD sobre la tolerancia a la glucosa, pudo estar relacionada a la dosis, o al tiempo de tratamiento utilizados en el presente trabajo.

2. Análisis histológico

2.1- TAG y esteatosis hepática

La NAFLD, como se mencionó previamente, se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática. A su vez, la esteatosis hepática se define como una acumulación anormal de macro- y/o microvesículas lipídicas ricas en TAG dentro de los hepatocitos (Nassir et al., 2015). Esta acumulación de lípidos hepáticos, puede deberse a distintas condiciones de estrés, dentro de las cuales tenemos la ingesta de una dieta rica en grasas o HF (Fabbrini et al., 2009). El consumo de una dieta HF, produce una alta afluencia de TAG provenientes de los quilomicrones remanentes al hígado. De esta manera, el tratamiento sostenido con una dieta HF, tendrá como resultado una acumulación de TAG hepáticos, llevando así al desarrollo de esteatosis (Nakamura & Terauchi, 2013).

En el presente trabajo, el tratamiento con una dieta HF (S30), produjo un incremento del contenido de TAG hepáticos, junto con una reducción de los TAG séricos, respecto al grupo control (S7). Estos resultados se encuentran en concordancia con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo, donde el tratamiento de ratas macho Wistar durante 60 días con una dieta HF conteniendo 30% de aceite de soja, llevó a un incremento de los TAG hepáticos, respecto al grupo control (Gerstner et al., 2021; Sain et al., 2023). Sin embargo, la acumulación de TAG hepáticos en S30 vs S7, no se vio reflejada en un incremento del peso del hígado en dicho grupo.

A su vez, este incremento en el contenido de TAG hepáticos en S30 vs S7, pudo observarse en el análisis de las microfotografías de cortes histológicos, donde el grupo S30 mostró un incremento significativo en el contenido de macro- y microvesículas, con respecto al grupo control. Estos resultados corroboran lo reportado por múltiples autores, donde al tratar modelos animales con distintos tipos de dietas HF, a distintos tiempos de tratamiento, lograron inducir esteatosis hepática (ya sea macro- y/o microvesicular) (Dossi et al., 2017; Omagari et al., 2008; Tapia et al., 2018; J. Xu et al., 2017).

En cuanto a las dietas ricas en grasas, los grupos S30, M30, S30DD y M30DD mostraron una acumulación de TAG hepáticos, la cual no se observó en los grupos L30 y L30DD. Referido a esto, Rasmy, (2007) trataron ratas macho de la cepa Wistar durante 60 días con dietas HF conteniendo AG saturados, con y sin suplementación con aceite de lino. Estos autores observaron que la suplementación con aceite de lino logró reducir un 40% el contenido de TAG hepáticos, en comparación con el control HF. Estos resultados, junto con el de otros autores (Hodson et al., 2020; Poudyal et al., 2011), soportan la hipótesis de que una dieta enriquecida en AG de la familia n-3, tiene un efecto positivo, evitando la acumulación de TAG hepáticos a pesar de la ingesta de elevados niveles de grasa.

A pesar de que los grupos S30, M30, S30DD y M30DD mostraron un incremento de los TAG hepáticos, sólo los grupos tratados con aceite de maíz (M30 y M30DD), mostraron un incremento tanto del peso total, como relativo del hígado. Otros autores han sugerido que una dieta HF conteniendo aceite de maíz podría conducir al desarrollo de hepatomegalia (caracterizada por un agrandamiento del hígado por encima de su tamaño normal), uno de los factores de riesgo relacionados con la patología del NAFLD. Zou et al., (2006) observaron un aumento en el índice hepático (peso del hígado/peso corporal) en ratas Sprague-Dawley tratadas por vía oral con una emulsión HF conteniendo aceite de maíz, en comparación con el grupo control. Por el contrario, ambos grupos tratados con aceite de lino mostraron prevenir el

incremento de peso del hígado, observado en los grupos M30 y M30DD. De acuerdo con esto, (Vijaimohan et al., 2006) trataron ratas Wistar macho durante 60 días con una dieta HF suplementada con aceite de lino (1 g/kg peso), lo que resultó en una reducción del peso corporal y del índice hepático, en comparación con la dieta HF.

El incremento del contenido de TAG hepáticos en los grupos S30, M30, S30DD y M30DD, se vio acompañado del desarrollo de esteatosis macro- y microvesicular, la cual fue mucho más pronunciada en los grupos M30 y M30DD. A diferencia del resto de las dietas HF, los grupos L30 y L30DD mostraron una microesteatosis muy leve y no se encontraron macrovesículas lipídicas. Este efecto preventivo sobre la esteatosis hepática inducido por las dietas L30 y L30DD, fue confirmado por el menor contenido de TAG hepáticos, junto con el menor peso del tejido hepático, en comparación con las demás dietas HF. Según esto, Xu et al., (2017) demostraron que ratas alimentadas con una dieta HF compuesta de manteca de cerdo durante 10 semanas, desarrollaron una extensa microesteatosis y una macroesteatosis dispersa. Sin embargo, cuando las ratas recibieron una dieta HF que contenía aceite de lino, las LD se redujeron. Además, Jordão Candido et al., (2020), demostraron que el tratamiento de ratas Wistar durante 60 días con una dieta que contenía aceite de lino, logró prevenir la esteatosis hepática inducida por una dieta HF, conteniendo grasa animal o aceite de sésamo. Ambos autores asociaron estos efectos benéficos sobre la prevención de la esteatosis hepática, al alto contenido de ALA de ambos aceites vegetales.

Además del contenido neto de PUFA n-3, la relación de PUFA n-6/n-3 es otra variable de fundamental importancia en la composición de los lípidos dietarios. A pesar de que tanto el LA como el ALA son AG esenciales, muchos trastornos metabólicos son consecuencias adversas del consumo desbalanceado de PUFA n-6/n-3 (Lands, 2012). La elevada relación de PUFA n-6/n-3 característica de la dieta occidental, puede desarrollar un estado pro-inflamatorio en el organismo, favoreciendo el desarrollo de alteraciones como el síndrome metabólico o la NAFLD (Gormaz et al., 2010). Yang et al., (2022), demostraron que relaciones PUFA n-6/n-3 de 20:1 y 5:1 generan un grado de esteatosis mucho mayor que el grupo tratado con una relación 1:1. A partir de esto, postularon que el tratamiento de ratas con dietas HF, conteniendo aceites con bajas relaciones PUFA n-6/n-3, podrían tener efectos preventivos sobre el desarrollo de la NAFLD. En el presente estudio, las relaciones PUFA n-6/n-3 de los aceites utilizados en las dietas experimentales, fue: maíz>soja>lino (aproximadamente 20:1; 8:1 y 1:3, respectivamente). Estas relaciones se vieron luego reflejadas en las relaciones PUFA n-6/n-3 del hígado de los animales tratados (maíz 17:1; soja 12:1 y lino 3:2, aproximadamente). Basado en esto, podemos

atribuir los efectos histológicos positivos observados en L30 y L30DD, al alto contenido dietario de ALA, junto con la baja relación PUFA n-6/n-3, presentes en el aceite de lino.

Aunque existen transiciones y asociaciones entre ambas formas, es importante distinguir la esteatosis microvesicular de la macrovesicular. La esteatosis macrovesicular es la forma más común, en la cual el hepatocito contiene una única LD (principalmente formada por TAG) que ocupa mayoritariamente el citoplasma del hepatocito, desplazando el núcleo hacia la periferia de la célula. En ausencia de otras lesiones hepáticas, la macroesteatosis es una afección relativamente benigna, al menos a corto plazo (Fromenty et al., 1997). En la esteatosis microvesicular, por el contrario, los hepatocitos se encuentran llenos de pequeñas LD, manteniendo el núcleo en el centro de la célula. Incluso en ausencia de necrosis, la esteatosis microvesicular se considera una condición mucho más seria que la macroesteatosis, dado que los depósitos extensos de microesteatosis son el sello morfológico de una enfermedad metabólica, que puede causar una grave crisis energética (Fromenty et al., 1997).

La cuantificación del grado de microesteatosis hepática de nuestros grupos experimentales dio: ~ 28 % para los grupos tratados con aceite de maíz; ~ 18 % para ambos grupos tratados con aceite de soja, y por último un ~ 1 % para los grupos tratados con aceite de lino. De acuerdo con el *NAFLD scoring system* (NAS) propuesto por Liang et al., (2014), existen 4 niveles en el *Score* de microesteatosis, basados en el porcentaje total del área afectada por microesteatosis: Score 0, $\geq 5\%$; Score 1, 5–33%; Score 2, 34–66%; Score 3, 66%. A partir de este análisis, encontramos que los grupos con el grado más severo de esteatosis microvesicular, fueron aquellos tratados con aceite de maíz, el cual, a su vez es el grupo dietario con la mayor relación PUFA n-6/n-3. Por el contrario, los grupos tratados con aceite de lino, mostraron un grado de microesteatosis casi inexistente, incluso menor que aquel encontrado en el grupo control a bajos niveles de grasa (S7).

Otro factor importante a considerar sobre el análisis de los cortes histológicos, es en qué región del acino hepático se observó mayoritariamente el desarrollo de esteatosis. El acino hepático está delimitado en tres zonas discretas: la zona 1 es la región periportal; la zona 2 es la región mediolobular; y la zona 3 es la región pericentral (LeCluyse et al., 2012). Según Schwimmer et al., (2005), la región más común para el desarrollo de esteatosis hepática es la zona 3, como resultado de la baja tensión de oxígeno y la baja disponibilidad de nutrientes. Además, como se mencionó en la introducción, Katz, (1992) reportó que los hepatocitos de las diferentes zonas del acino, exhiben diferentes capacidades metabólicas y estructurales. En particular, mientras la zona 3 está más relacionada con la lipogénesis *de novo*, la zona 1 es

responsable de la β -oxidación lipídica. Sin embargo, en el presente estudio, la esteatosis observada en las ratas alimentadas con dietas HF se ubicó principalmente en la zona 1, prácticamente sin macro- o microesteatosis en la zona 3. En este sentido, Altunkaynak, (2005) reportó que el tratamiento de ratas Sprague-Dawley con una dieta HF, con un 30% de calorías procedentes de grasa animal, condujo al desarrollo de esteatosis en la zona 1. Nuestros resultados amplían la hipótesis de Altunkaynak (2005), quien sugiere que la macro- y microesteatosis comienzan en la zona 1, dado que el área portal es el principal sitio de entrada de la grasa dietaria al hígado.

Teniendo en cuenta los resultados discutidos en esta sección, podemos inferir entonces que la microesteatosis observada en las dietas HF: S30, M30, S30DD y M30DD, podría estar relacionada con una β -oxidación depletada, lo que conllevó a una acumulación de TAG hepáticos. Por el contrario, los resultados observados en L30 y L30DD sugieren que los altos niveles de ALA, junto con la baja relación PUFA n-6/n-3 de estas dietas, indujeron una mayor β -oxidación, previniendo el desarrollo de esteatosis en zona 1.

En cuanto al efecto de la suplementación con DD sobre el desarrollo de la esteatosis hepática, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso del hígado, el contenido de TAG y el contenido de LD, debido al agregado de dichos compuestos. En el trabajo de Larakia et al., (1993), trataron ratas Wistar macho con 9 dietas experimentales, conteniendo distintas dosis de FE, y observaron una reducción del peso del hígado recién en el grupo de animales que ingirieron una dosis de 96 mg FE/día. En nuestro trabajo, la cantidad consumida de FE por animal/día estuvo alrededor de los 50 mg/día por lo que es posible que la dosis empleada no sea suficiente para inducir cambios en este parámetro. Respecto a los TF, parecerían no tener un efecto directo sobre la ganancia de peso y el peso del tejido hepático (Choi et al., 2020; Kim et al., 2013; Şekeroğlu et al., 2018).

No obstante, la suplementación con DD mostró un efecto sobre el contenido de colesterol hepático. Como se menciona en la introducción, estudios nutricionales realizados en modelos animales indican que la acumulación hepática de colesterol, juega un papel crítico en la progresión desde la esteatosis simple a NASH (Fernández et al., 2008). Específicamente, la acumulación hepática de colesterol libre es una característica conservada en la NAFLD, que, a su vez, se correlaciona con la severidad histológica del cuadro (Caballero et al., 2009; Min et al., 2012). Biopsias hepáticas de pacientes con NAFLD, han mostrado una acumulación de colesterol libre, sin un aumento del colesterol esterificado (Puri et al., 2007).

En el presente trabajo, observamos una disminución de los niveles de colesterol hepático total en los grupos L30, S30DD, M30DD y L30DD, con respecto a S30 y M30. Este mismo comportamiento se observó en la fracción de colesterol hepático libre; sin cambios en el colesterol esterificado. En relación a esto, si bien la suplementación con DD consiste en una mezcla de TF como FE, estos últimos son los compuestos bioactivos más reconocidos por sus propiedades hipocolesterolémicas (Brufau et al., 2008; Cedó et al., 2019; Larakia et al., 1993). Se ha reportado que los FE reducen los niveles plasmáticos de colesterol y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), y pueden tener aplicación clínica para la prevención de la NAFLD y enfermedades cardiovasculares.

Su función más estudiada es la reducción de la absorción intestinal de colesterol. Esto se debe a que los FE, al tener una estructura química similar al colesterol, en el intestino, compiten con este último por su absorción (Larakia et al., 1993). Si bien, nuestras dietas experimentales no poseen colesterol, el efecto hipocolesterolémico de los FE a nivel hepático, debió estar dado por otro mecanismo independiente de la absorción intestinal del mismo. Fernandez et al., (2002) demostraron que tanto el estigmasterol, como el β -sitosterol, inhiben la biosíntesis de colesterol mediante la inhibición de la HMG-CoA reductasa, en líneas celulares humanas Caco-2 y HL-60. Batta et al., (2006) estudiaron el efecto de la alimentación con estigmasterol al 0,5% en 12 ratas Kyoto y 12 ratas Wistar. Después de 6 semanas de tratamiento, cuantificaron las actividades de las enzimas hepáticas en todas las ratas, y encontraron que la actividad de la HMG-CoA reductasa, se redujo 4 veces en las ratas WKY y casi 1,8 veces en las ratas Wistar. Dado que los principales FE en nuestro suplemento DD son el β -sitosterol (~62% de la composición total de FE) y el stigmasterol (~16% de la composición total de FE), algunos de los mecanismos propuestos por estos autores podrían ser los responsables de la reducción de los niveles de colesterol hepático, en los grupos S30DD y M30DD, respecto de sus correspondientes grupos sin suplementar. Por otro lado, Cedó et al., (2019), propusieron un mecanismo que involucra la captación hepática de colesterol. Los autores reportaron que los FE inhiben la unión e internalización de las LDL mediada por los receptores LDLR, reduciendo así la entrada de colesterol libre al hígado.

Los FE pueden administrarse en conjunto con otras sustancias biológicamente activas, para potenciar su efecto hipocolesterolémico sobre la NAFLD. Song et al., (2020) probaron que el tratamiento con una combinación de FE y LC-PUFA n-3 (DHA y EPA), mostró un efecto terapéutico superior al tratamiento con FE aislados, lo que puede atribuirse al efecto sinérgico de los FE y los PUFA n-3. En base a esto, la falta de diferencias estadísticamente significativas entre

los grupos L30 y L30DD, podrían deberse a 2 factores: por un lado, al ser este un aceite virgen, es el aceite con el mayor contenido basal de FE, entre los aceites utilizados para las dietas ricas en grasas; por otro lado, es el aceite con el mayor contenido de PUFA n-3, los cuales podrían estar ejerciendo un efecto sinérgico con los FE (tanto adicionados, como nativos del aceite), sobre la reducción del contenido hepático de colesterol. Por estos motivos, la falta de un efecto aditivo de los DD en los animales alimentados con aceite de lino, podrían deberse a que la composición basal del aceite de lino virgen es suficiente para lograr los efectos hipocolesterolémicos a nivel hepático; y que, la dosis de FE adicionada como parte del suplemento DD, no es suficiente para lograr un efecto preventivo aún mayor.

2.2- Análisis de la progresión del NAFLD

Si bien la NAFLD se caracteriza por la presencia de esteatosis; esta patología comprende un amplio espectro de desórdenes hepáticos que van desde la presencia de una simple esteatosis, hasta la esteatohepatitis (NASH). La NASH está definida como la presencia de esteatosis hepática e inflamación, junto con daño hepatocelular bajo la forma de hepatocitos balonizados (Chalasani et al., 2012).

En primer lugar, el aumento de grasa dietaria llevó a la aparición de hepatocitos balonizados en S30 vs S7. Al analizar los grupos tratados con dietas HF, observamos que, a pesar de que el porcentaje de hepatocitos balonizados en S30, M30, S30DD y M30DD fue bajo, los grupos L30 y L30DD no presentaron hepatocitos balonizados. En relación a esto, Ichimura et al., (2014) trataron ratas macho Wistar por 9 semanas con una dieta HF conteniendo 30% de aceite de palma, y lograron inducir un fenotipo de NAFLD con la presencia de esteatosis y hepatocitos balonizados. Si bien, el modelo utilizando fue similar al nuestro (ratas Wistar, alimentadas 9 semanas con 30% de grasa), la principal diferencia es el aceite vegetal utilizado. El aceite de palma es rico en SFA y MUFA, y su proporción PUFA n-6/n-3 (~70/1) es mucho mayor a la de nuestros aceites dietarios. A pesar de que los valores de hepatocitos balonizados en nuestra experiencia fueron bajos, la detección de los mismos resulta de suma importancia para identificar el grado de progresión de la NAFLD. Esta premisa se basa en un estudio clínico-patológico realizado por Matteoni et al., (1999), en el cual sugiere que los hepatocitos balonizados son una característica clave que distingue a un cuadro de NASH progresivo, de las formas menos progresivas de NAFLD.

Otro parámetro importante en la progresión desde la esteatosis simple, al desarrollo de esteatohepatitis o NASH, es la aparición de agregados inflamatorios. La inflamación intralobulillar

presente en el NASH suele ser leve y consiste en un infiltrado mixto de células inflamatorias (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células de Kupffer) (Takahashi & Fukusato, 2014). En el presente trabajo, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de agregados inflamatorios en S30 vs S7. Por el contrario, a altos niveles de grasa dietaria, se observó un incremento estadísticamente significativo en ambos grupos tratados con aceite de maíz, respecto de aquellos tratados con aceite de lino. Este último resultado, podría estar también relacionado con el desarrollo de un estado pro-inflamatorio inducido por la ingesta de aceites con una alta relación de PUFA n-6/n-3 (Gormaz et al., 2010).

En lo que respecta a los DD, estudios mecanísticos han demostrado que el γ -TF tiene efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de la producción de prostaglandinas, mediadas por la ciclooxigenasa-2. Específicamente, Jiang et al., (2000) han demostrado que el γ -TF y su metabolito, γ -CEHC, inhiben la formación de PGD2 y PGE2 mediada por ciclooxigenasa-2 en macrófagos estimulados por LPS y células A549 activadas por IL-1 β . En base a esto, se podía esperar un menor número de agregados inflamatorios en los grupos suplementados con DD, con respecto de sus correspondientes sin suplementación. Sin embargo, dado los bajos niveles de inflamación observados en todos los grupos ricos en grasas, la falta de diferencias por la suplementación con DD, podría deberse a que no se desarrolló una inflamación hepática significativa por el tratamiento con las dietas ricas en grasas.

El último parámetro histológico analizado en los hígados de los animales tratados, fue el porcentaje de fibrosis, evaluado como CPA (*collagen proportionante área*). Como se explicó previamente, la fibrogénesis hepática es un proceso de reparación tisular, como respuesta a un daño hepatocelular mantenido. En este proceso, se produce un depósito de proteínas de la matriz extracelular (mayormente colágeno de tipo I), en forma desorganizada en el lóbulo hepático, dando lugar a lo que se conoce como fibrosis (Odena & Bataller, 2012). Si bien la fibrosis no es un requisito para el diagnóstico de NASH, la misma suele estar presente en pacientes con dicha patología.

La fibrosis en el NASH suele ser perisinusoidal/pericelular y generalmente comienza en la zona 3 (región VC) (Takahashi & Fukusato, 2014). En el análisis de la CPA, tanto en la región VC como de la TP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas debido al incremento de los niveles de grasa dietaria. Respecto a las dietas HF, se observó, un incremento en los niveles de CPA en la región VC en el grupo M30 y en la región TP en los grupos M30 y M30DD. Es importante aclarar que, a pesar de las diferencias observadas entre los grupos

experimentales, los niveles de colágeno cuantificados en todos los grupos tratados han sido bajos.

Según estudios realizados por otros autores, tanto el α -TF, como el γ -TF, han demostrado su potencial sobre la prevención de la fibrosis hepática, a partir de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Fibrozu, 2005; Lee & Lim, 2019). Relacionado a esto, si bien como se menciona previamente, los niveles de fibrosis obtenidos fueron en general bajos, se observó una tendencia de los DD a reducir el contenido de colágeno depositado alrededor de la región de la TP.

Como se mencionó anteriormente, las dietas HF son comúnmente utilizadas para generar modelos de NASH en animales de experimentación. Sin embargo, los roedores alimentados con dichas dietas, rara vez progresan a fibrosis hepática, mientras que la esteatosis e inflamación se desarrollan generalmente luego de unas pocas semanas de tratamiento (Larter & Yeh, 2008; Lieber et al., 2004). Por lo general, para lograr inducir fibrosis en ratas tratadas con dietas HF, los tratamientos tienden a ser bastante largos. Xu et al., (2010) trataron ratas Sprague-Dawley durante 4 - 48 semanas con una dieta HF conteniendo un 30% de grasa animal y observaron que recién a las 16 semanas de tratamiento, los animales comenzaron a mostrar fibrosis perisinusoidal leve. Omagari et al., (2008) trataron ratas Sprague-Dawley por 43 semanas con una dieta HF conteniendo un 45% de grasa (mezcla de aceite de soja y grasa animal), reportando fibrosis perisinusoidal en zona 3, en sólo 2 de 7 ratas. A pesar de estos hallazgos, el tratamiento prolongado de modelos animales con dietas HF, no garantiza el desarrollo de esteatohepatitis. En un estudio realizado por Hui et al., (2003), donde trataron ratas Wistar con dietas HF ricas en SFA durante 14 semanas, no lograron inducir anomalías en la histología hepática.

Basado en los resultados reportados por estos autores, podemos relacionar los bajos niveles de fibrosis obtenidos en nuestros grupos HF, al relativamente escaso tiempo de tratamiento dietario de nuestro modelo experimental (8 semanas). De todas maneras, cabe destacar el hecho de que aun siendo un tratamiento dietario reducido, hemos logrado ciertas diferencias en los niveles de CPA entre los grupos HF, junto con una leve inflamación. Además, la mayoría de los modelos dietarios utilizados para inducir estas alteraciones, lo hacen con dietas conteniendo altos niveles de grasa animal, o dietas con alto contenido de SFA. Por nuestra parte, hemos logrado mediante una dieta rica en PUFA, con una elevada relación PUFA n-6/n-3, inducir un modelo de esteatosis hepática, caracterizado principalmente por una amplia microesteatosis, una macroesteatosis e inflamación leve, y la presencia de hepatocitos balonzados (**Figura 37**).

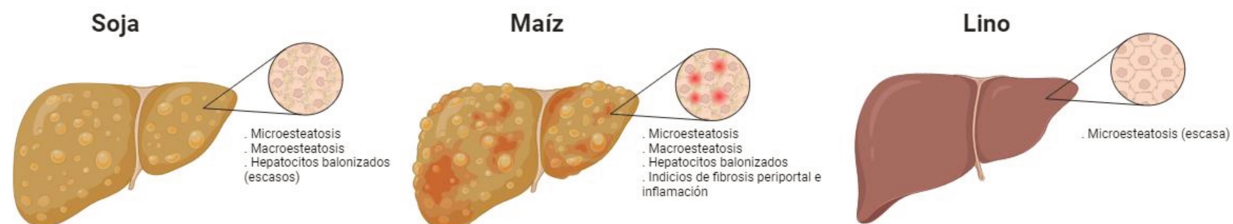


Figura 37: Resumen de los principales efectos observados a nivel histológico por los distintos tipos de grasas.

2.3- Estrés oxidativo

Como se mencionó previamente, para desarrollar NASH a partir de esteatosis simple, se precisa de otros componentes o “golpes” adicionales a la acumulación de TAG, como la inflamación y/o el estrés oxidativo. Una producción desequilibrada de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas del oxígeno (ROS), y de las moléculas antioxidantes del organismo, produce estrés oxidativo (Yang et al., 2019). Las ROS y RNS se generan dentro de las células mediante procesos metabólicos como la supervivencia celular, la respuesta al estrés y la inflamación (He & Zuo, 2015). Éstas reaccionan con otras macromoléculas como proteínas, lípidos y ADN, produciendo daños en las mismas que eventualmente conducen a una función defectuosa de las organelas celulares. Además, las ROS y RNS inducen la peroxidación lipídica, que implica la degradación oxidativa de los lípidos, generalmente ubicados en las membranas celulares (Kelley et al., 2014). La cuantificación de los productos de degradación secundarios de este proceso, puede indicar el grado de peroxidación lipídica *in vivo*. Para ello, se han identificado varios biomarcadores, y entre ellos tenemos el malondialdehído (MDA), un producto final de la peroxidación lipídica de los PUFA. Se han utilizado varios métodos analíticos para medir el MDA en muestras biológicas, pero el más común es el método de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (o de su acrónimo en inglés, TBARS) (Tsikas et al., 2016).

En la cuantificación de las TBARS a nivel hepático, no se encontraron diferencias significativas debido al incremento de grasa dietaria (S30 vs S7). Entre los grupos ricos en grasas, se observó una disminución de los niveles de TBARS en los grupos suplementados con DD, respecto a sus correspondientes grupos sin suplementar. Contrario a lo observado en el análisis histológico, las diferencias entre los grupos ricos en grasas en este caso, no estuvieron dadas por las distintas relaciones de n-6/n-3, sino al contenido de TF y FE. Por parte de los FE, Yoshida & Niki, (2003) probaron que los principales FE: β -sitosterol, campesterol y stigmasterol, poseen una actividad antioxidante moderada. Sin embargo, los componentes más estudiados

por sus propiedades antioxidantes, son los TF. Debido a su estructura química, los TF tienen un alto poder antioxidante, actuando como donantes de electrones para neutralizar radicales libres producidos en la lipoperoxidación (Jiang et al., 2022). Particularmente, el γ -TF posee la posición 5 del anillo cromanol no sustituida y, por lo tanto, es capaz de atrapar electrófilos como las RNS, para formar 5-nitro- γ -TF (5-N γ T). Por el contrario, el α -TF tiene un anillo aromático completamente sustituido, y, por lo tanto, no puede formar un aducto nitrado. En consecuencia, se ha demostrado que el γ -TF es mejor que el α -TF para neutralizar RNS (Jiang et al., 2022). Más importante aún, el γ -TF, pero no el α -TF, logró atenuar la producción de peroxinitrito (ONOO⁻), que causa la inactivación de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, en mitocondrias del cerebro de ratas (Williamson et al., 2002). Dado que el contenido de TF de nuestro suplemento DD, es principalmente rico en γ -TF (~43%), podemos sugerir este efecto benéfico sobre los niveles de TBARS de los grupos suplementados con DD mayormente a la presencia de γ -TF.

2.4- Transaminasas circulantes

A pesar de ser el método de referencia para el diagnóstico de NAFLD, las complicaciones asociadas a la biopsia hepática, han llevado al estudio de múltiples biomarcadores no-invasivos para el análisis del NAFLD. Dentro de estos, tenemos los niveles de transaminasas circulantes (AST y ALT)(Graffigna et al., 2017).

Los niveles de AST y ALT no mostraron diferencias estadísticamente significativas debido al incremento de grasa dietaria (S30 vs S7). Estos resultados van en contraposición con lo reportado por otros trabajos, donde el tratamiento con dietas HF induce un incremento de las transaminasas hepáticas. Efati et al., (2016) trataron ratas macho de la cepa Wistar con una dieta HF (conteniendo 20% de grasa animal) durante 10 semanas, y encontraron un incremento tanto en los niveles de AST (~ 60%) como de ALT (~53%) circulantes, en el grupo HF vs el grupo control. De forma similar, Yoshitsugu et al., (2019) trataron ratas macho Wistar con una dieta HF (compuesta por 23% grasa animal + 7% aceite de soja) durante 21 semanas, tomando muestras de suero a distintos tiempos de tratamiento. Estos autores reportaron un incremento de los valores de AST y ALT a partir de las 5 semanas de tratamiento, en el grupo HF vs control.

En cuanto a los grupos ricos en grasas, en el caso de la AST no hubo un efecto claro ni por el tipo de lípidos dietarios, ni por la suplementación o no con DD. Sin embargo, los grupos con los valores más altos de la misma fueron M30 y S30DD; mientras que el único grupo

significativamente menor a los demás fue L30DD. Respecto a ALT, los grupos con los mayores niveles de dicha enzima, fueron aquellos tratados con aceite de maíz.

De acuerdo con nuestros resultados, Valenzuela et al., (2012), trataron ratones macho de la cepa C57BL/6J con una dieta HF control, y una suplementada con PUFA n-3 (EPA y DHA), y no observaron diferencias significativas entre estas dietas HF y el grupo control. Sin embargo, un estudio realizado en humanos tratados con PUFA n-3, mostraron una reducción significativa de ambas transaminasas séricas, en comparación con los controles. Esta diversidad en los resultados encontrados sobre los PUFA n-3 sobre los niveles de AST y ALT circulantes, indican que los n-3 tendrían un efecto positivo o nulo (dependiendo del organismo y el tratamiento), pero no un efecto deletéreo.

Por otro lado, en lo que respecta a los efectos de los PUFA n-6, Iwasaki et al., (2010) encontraron que el tratamiento de ratas macho Wistar con una mezcla rica en PUFA n-6, llevó a un incremento de las concentraciones de AST y ALT respecto del grupo rico en PUFA n-3. Sumado a esto, Jeyapal et al., (2018) trataron ratas Sprague-Dawley con una dieta conteniendo un 20% de grasa, a distintas relaciones n-6/n-3 (200, 2 y 5). Dichos autores reportaron un aumento de 3.2 veces en el valor de ALT y 2.8 veces en el de AST, en el grupo HF rico en PUFA n-6, respecto del control. La sustitución de PUFA n-6 con PUFA n-3, logró normalizar los niveles de ambas transaminasas circulantes. Por lo tanto, a partir de estos resultados, podemos concluir que los menores niveles de ambas transaminasas (principalmente ALT), en ambos grupos tratados con aceite de lino, podrían deberse a que este grupo es aquel con la menor relación PUFA n-6/n-3, entre las dietas experimentales. Si bien el aceite de soja es rico en PUFA n-6, la relación n-6/n-3 del mismo podría no ser suficiente para alcanzar efectos observables en este biomarcador.

En cuanto a la relación entre las transaminasas y la suplementación con TF y FE, Yachi et al., (2010) no observaron diferencias en los niveles de AST y ALT, tanto por la suplementación con α -TF, como con γ -TF, respecto al grupo control. Por otro lado, Song et al., (2017) trataron ratas Sprague-Dawley por 12 semanas con dietas HF conteniendo distintas dosis de FE, tomando muestras de sangre a distintos tiempos del tratamiento. Estos autores, encontraron una reducción en los niveles de ALT recién a las 12 semanas de tratamiento en el grupo suplementado con la mayor dosis de FE, sin ver cambios en los niveles de AST. Estos mismos autores, en un estudio posterior, trataron ratas macho Sprague-Dawley con una dieta HF (conteniendo 20% de grasa animal) y otra dieta HF+FE (0.05g FE/100 g peso del animal). A partir de dicho tratamiento, si bien no encontraron diferencias significativas en los niveles de AST y

ALT, sí vieron una reducción en la relación entre ambas transaminasas, en el grupo con HF+FE, respecto del grupo HF (Song, et al., 2020). En nuestro trabajo, no hemos observado diferencias significativas por la suplementación con DD, por lo que podemos concluir que los FE a nuestra dosis y tiempo de tratamiento, no lograron inducir diferencias significativas.

3. Regulación de lípidos hepáticos

El hígado podría compararse con un biorreactor metabólico capaz de transformar lípidos, glucosa y diversas proteínas, en sustratos energéticos listos para usar. Aunque estas tareas también pueden ser realizadas por otros tejidos, el hepatocito aporta la contribución más importante a la síntesis, absorción y exportación de lípidos en el organismo. Este recambio continuo de grasas tiene una regulación compleja, cuya alteración a menudo se asocia con patologías metabólicas como la obesidad, NAFLD, diabetes mellitus, aterosclerosis y ECV (Ponziani et al., 2015).

3.1- Perfil de AG hepáticos

Al igual que lo mencionado en la sección 1.2 sobre el perfil de AG en suero y TAE, el perfil de AG hepático se va a ver principalmente influenciado por el perfil de los AG dietarios, su contenido de SFA, MUFA y PUFA; que por la presencia de los compuestos bioactivos presentes en los DD.

El aceite de soja, recomendado por el AIN, cumple con los requisitos de cantidad y equilibrio de AG esenciales, LA y ALA (Reeves et al., 1993). Específicamente contiene un 86% de AG insaturados, siendo 52% de LA y 6% de ALA, con una relación n-6/n-3 de ~ 7 (FAO, 2012). En el hígado de los animales alimentados con S30, se observó una reducción del contenido de SFA y MUFA, junto con un incremento en los PUFA totales (tanto en n-6 como n-3), comparado con S7. En el caso de los SFA, la reducción se debió principalmente a la disminución de 16:0; y en los MUFA, a la disminución de 9c-16:1 y 9c-18:1. En cuanto al incremento de los PUFA totales, se debió principalmente al incremento de LA y ALA. A pesar de que ambas dietas están constituidas por la misma fuente de lípidos (aceite de soja), las diferencias en el perfil de AG hepáticos entre ambas, puede explicarse por la regulación de las desaturasas hepáticas. Ntambi, (1999) demostró que la enzima SCD1, responsable de la conversión del 16:0 a 9c-16:1, 18:0 a 9c-18:1 y 18:0 a 11c-18:1, es regulada por los niveles de PUFA dietarios. Específicamente, tanto los PUFA n-6 como n-3, funcionan como inhibidores de la expresión de dicha enzima. En un estudio realizado por Hofacer et al., (2012), donde trataron ratas macho con una dieta deficiente en ALA, observaron un incremento en los niveles de ARNm de *Scd1*, junto con un aumento en

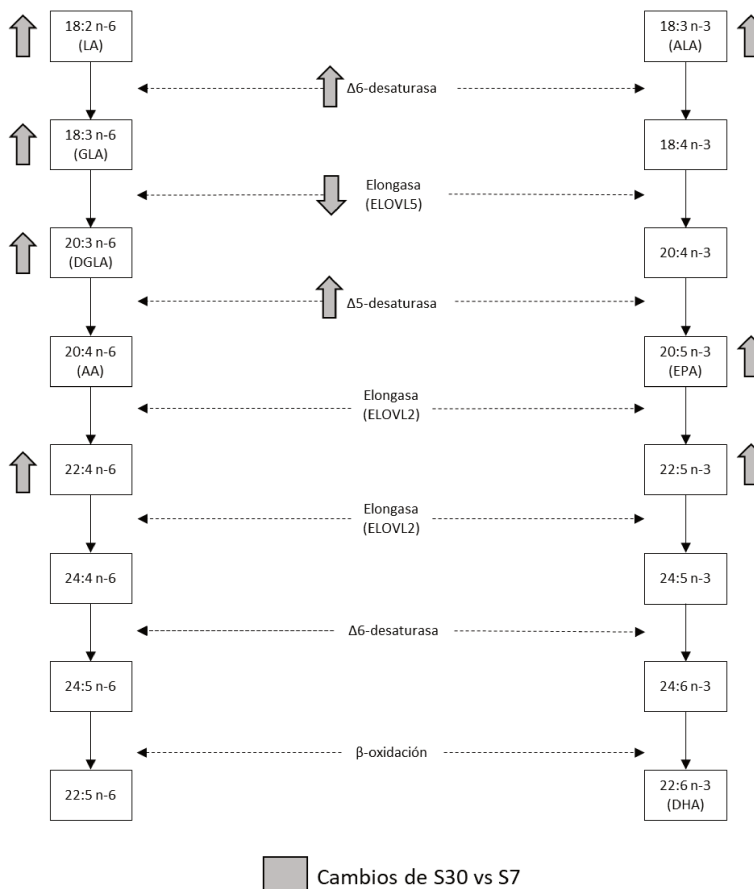
las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0. En concordancia con lo obtenido por dichos autores, en los animales tratados con S30 se observó una reducción en las relaciones a través de SCD1, así como también en los niveles de ARNm de dicha enzima, en comparación con el grupo S7. Esto podría explicar porque ambas dietas experimentales muestran distintos perfiles de AG hepáticos, pese a que han sido tratadas con el mismo aceite dietario.

Una de las grandes diferencias obtenidas entre los AG hepáticos y dietarios, es que, si bien los tres aceites experimentales son ricos en PUFA n-6 y n-3, no lo son en sus correspondientes LC-PUFA que aparecen luego en el perfil de AG hepáticos. Esto se debe a la capacidad de sintetizar en forma endógena los LC-PUFA de las familias n-6 y n-3, a partir de sus precursores esenciales LA y ALA, respectivamente (Guillou et al., 2010). Esta vía metabólica ocurre principalmente en el hígado e involucra una serie de enzimas desaturasas y elongasas, las cuales son compartidas por las vías de las familias n-3, n-6 y n-9. (Gibson et al., 2011; Hofacer et al., 2012).

Analizando en primer lugar, la biosíntesis de LC-PUFA n-6, observamos que el incremento de grasa dietaria (S30 vs S7), llevó a una reducción del flujo a través de la elongasa 5, junto con un incremento en el flujo a través de las desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ (**Figura 38**). El incremento a través de ambas desaturasas, podría estar relacionado con un mayor ingreso de sustrato a dicha vía (al incrementar los niveles de soja dietaria, incrementa la cantidad de LA), aumentando así el flujo a través de toda la vía. En el caso de la elongasa 5, la disminución del flujo a través de la misma, pudo deberse a que, si bien tanto el GLA como DGLA incrementaron debido a los mayores niveles de grasa dietaria, el incremento del GLA fue mucho mayor, reduciendo el valor del cociente entre ambos AG. En cuanto a la vía de biosíntesis de LC-PUFA n-3, al igual que lo observado en la vía de LC-PUFA n-6, se observó una reducción del flujo total a través de la vía en S30 vs S7. Esto, como se mencionó anteriormente, puede deberse a que el

incremento en los niveles de PUFA en S30, llevó a una reducción de la expresión de elongasas y desaturasas, lo que se vio reflejado en una menor síntesis de LC-PUFA n-3 en S30 vs S7.

Figura 38: Efectos sobre la biosíntesis de LC-PUFA en S30 vs S7. Se muestran los cambios en los



porcentajes relativos de cada AG debido al incremento de los niveles de grasa (S30 vs S7). LA: ácido linoleico; GLA: ácido γ-linolénico; DGLA: di-homo-γ-linolénico; ALA: ácido α-linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentanoico; DHA: ácido docosahexanoico.

Al analizar los tres aceites utilizados para confeccionar las dietas ricas en grasas, se observó que el aceite de maíz fue aquel con el mayor contenido de MUFA (~65%), teniendo como AG mayoritario el OA (~30%), con una relación PUFA n-6/n-3 de aproximadamente 20/1. El aceite de lino fue el aceite con mayor contenido de PUFA (~69%), teniendo como AG mayoritario el ALA (~54%) y una relación PUFA n-6/n-3 de aproximadamente 1/3. Por último, el aceite de soja fue el aceite con el mayor contenido LA (~52%), con una relación PUFA n-6/n-3 intermedia entre el aceite de lino y el aceite de maíz (~8/1). En relación a esto, es conocido que el hígado desempeña un papel importante en la remoción de los quilomicrones remanentes, y por ende, la composición de los AG hepáticos se ve altamente influenciada por los AG dietarios (Beare & Kates, 1964). Del análisis de los AG hepáticos, se observó que los grupos tratados con

aceite de soja mostraron los mayores niveles de PUFA totales, principalmente debido a los elevados niveles de LA (~36%) y AA (~15%). En forma similar, los grupos tratados con aceite de maíz fueron los grupos con menor contenido de SFA, mayor contenido de MUFA, y tuvieron como PUFA mayoritarios al LA (~35%) y AA (~15%). Por último, los grupos tratados con aceite de lino fueron los grupos con mayor contenido de SFA (principalmente debido al 18:0), y mayor contenido de PUFA n-3, debido al elevado nivel de ALA (~14%), EPA (~4%) y DHA (~5%).

Guillou et al., (2010), propusieron la existencia de una regulación compleja entre el SREBP-1c, los niveles de PUFA dietarios y la expresión de las enzimas elongasas y desaturasas. Altas concentraciones de LC-PUFA n-6 o n-3, suprimen la expresión de *Srebp1c*, quien a su vez es el encargado de inducir la expresión de elongasas y desaturasas. Por el contrario, como respuesta a bajos niveles de LC-PUFA, la expresión normal del *Srebp1c* induce la expresión de las elongasas y desaturasas, aumentando la síntesis de LC-PUFA n-6 y n-3 a partir de sus precursores. A altos niveles de grasa, el flujo a través de los distintos pasos de biosíntesis de LC-PUFA n-6, no dio una tendencia clara, ya sea por el tipo de aceite dietario, o por la suplementación o no con DD. Sin embargo, podemos destacar que el flujo a través de la $\Delta 6$ -desaturasa quien cataliza la desaturación inicial, y a su vez constituye el paso limitante de dicha vía, se vio disminuida en los grupos L30 y L30DD (**Figura 39**). Esto concuerda con lo reportado por Hofacer et al., (2012), quienes encontraron que existe una relación inversa entre los niveles hepáticos de mRNA de la $\Delta 6$ -desaturasa y los niveles de n-3 dietarios. Sin embargo, esta tendencia fue revertida en el paso siguiente, a través de la enzima elongasa 5, llevando finalmente a un aumento de la biosíntesis total de LC-PUFA n-6 en aquellos grupos con el menor contenido de LA (L30 y L30DD). Este cambio en la biosíntesis de LC-PUFA n-6 puede deberse a que, como los grupos tratados con aceite de soja y maíz tienen altos niveles de LA en relación a sus productos posteriores, la relación producto/sustrato termina siendo baja. Respecto a la biosíntesis de LC-PUFA n-3, los grupos con el menor contenido de PUFA n-3 dietarios (M30 y M30DD), fueron aquellos con los mayores niveles de flujo a través de dicha vía. Por el contrario, los grupos L30 y L30DD, que fueron aquellos con los mayores niveles de ALA (precursor para la síntesis de LC-PUFA n-3), mostraron los menores niveles de biosíntesis de LC-PUFA n-3.

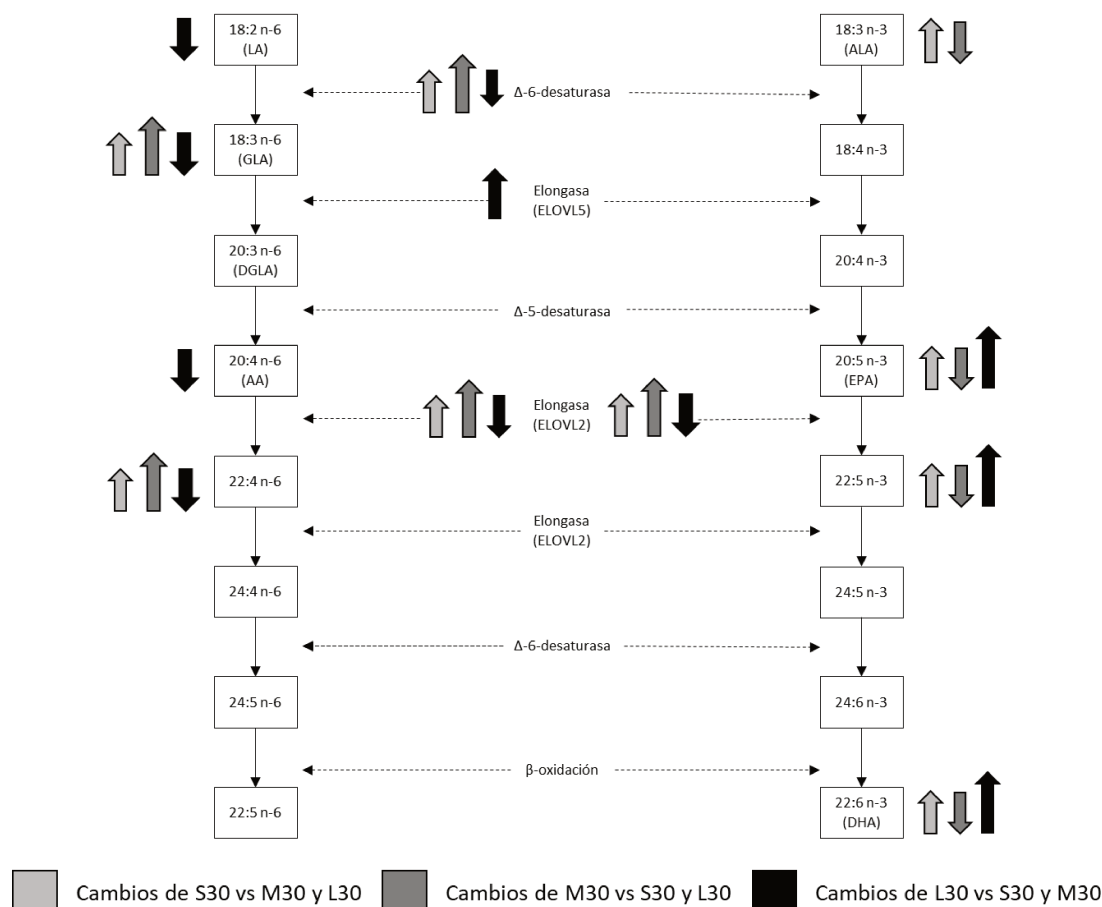


Figura 39: Efectos sobre la biosíntesis de LC-PUFA entre las dietas ricas en grasas. Se muestran los cambios en los porcentajes relativos de cada AG debido a las distintas dietas ricas en grasas. LA: ácido linoleico; GLA: ácido γ -linolénico; DGLA: di-homo- γ -linolénico; ALA: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentanoico; DHA: ácido docosahexanoico.

3.2- Regulación de triacilglicéridos hepáticos

Uno de los principales resultados del presente trabajo de tesis, es que las dietas conteniendo aceite de lino (L30 y L30DD), lograron prevenir la acumulación de TAG característica de la esteatosis hepática. Por el contrario, las demás dietas ricas en grasas mostraron un incremento de los TAG hepáticos, que llevó al desarrollo de esteatosis macro- y microvesicular.

La enfermedad del hígado graso se caracteriza por una acumulación de TAG hepáticos, comúnmente conocida como “esteatosis”. La misma, puede deberse a múltiples factores: 1) Un incremento en la captación de AG circulantes, ya sea por un aumento de la lipólisis del TA, o por un aumento en la ingesta de grasas dietarias; 2) Una disfunción mitocondrial, asociada con una

β -oxidación deficiente; 3) Un aumento de la lipogénesis *de novo*; 4) Una reducción en la secreción de VLDL-TAG (**Figura 40**).

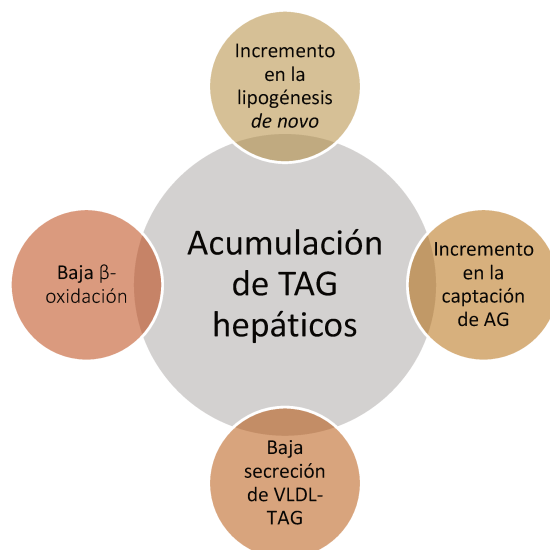


Figura 40: Principales mecanismos involucrados en la regulación de los TAG hepáticos. Adaptado de: Koo, S. H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and molecular hepatology*, 19(3), 210.

3.2.1- Captación de AG

El consumo de la dieta S30, llevó a una acumulación de los TAG hepáticos comparado a S7. Este incremento podría asociarse con la elevada oferta de lípidos dietarios de la dieta HF. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por múltiples autores, donde el tratamiento de animales de experimentación, con distintas dietas HF, produce un incremento de los TAG hepáticos, respecto al grupo control (Andreoli et al., 2009; C. Gerstner et al., 2021; Meli et al., 2013; Yasari et al., 2010; X. Zhang et al., 2018).

Los lípidos que ingresan al hígado, provienen principalmente de dos fuentes: en estado de ayuno, los AG derivan predominantemente de la lipólisis del TA, llegando al hígado desde el torrente sanguíneo como AG libres (Barrows & Parks, 2006; Donnelly et al., 2005; Hodson et al., 2007, 2010). En el período post-pandrial, los AG dietarios llegan al hígado formando parte de los quilomicrones remanentes (Hodson et al., 2007; Miles et al., 2004). Los AG dietarios, después de su hidrólisis en la luz intestinal, son absorbidos y re-esterificados nuevamente a TAG, los cuales son empaquetados para dar lugar a los quilomicrones. Los quilomicrones son lipoproteínas con un alto contenido de TAG, cuya función es aportar AG dietarios a los tejidos que más los necesitan para su uso (tejido muscular) o almacenamiento (TA). Para el catabolismo de los quilomicrones se necesita de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), la cual se encuentra

anclada en los capilares de los tejidos antes mencionados, y cataliza la hidrólisis de los TAG de los quilomicrones liberando AG. En el presente trabajo, observamos un incremento en la actividad de la enzima LPL en TAE en S30 vs S7, sin cambios en músculo gastrocnemio. A pesar del incremento en la actividad de LPL en TAE, el mismo no fue suficiente para producir un aumento del peso de dicho TA, ya sea total o relativo (discutido en la sección 1.2 de la discusión).

Dado los bajos niveles de actividad de ambas LPL periféricas (TAE y músculo gastrocnemio) en todos los grupos experimentales, es posible que la mayor parte de los AG dietarios hayan sido captados por el hígado, formando parte de los quilomicrones remanentes. En la bibliografía, los datos sobre la contribución de los AG dietarios a los TAG intrahepáticos, son algo variables, oscilando entre el 12-39%, dependiendo de la cantidad de grasa consumida (Barrows & Parks, 2006; Donnelly et al., 2005; Hodson et al., 2007, 2010). En función de esto, los mayores niveles de TAG hepáticos en S30 vs S7, podrían deberse a los mayores niveles de grasa dietaria, junto con una baja remoción periférica de TAG. A su vez, como se mencionó al comienzo de esta sección, los AG que llegan al hígado también pueden provenir de la lipólisis del TA. Estos AG son captados por una serie de proteínas transportadoras, que a nivel hepático son: FATP2, FATP5 y CD36/FAT. FATP2 y FATP5 poseen distintos patrones de expresión a nivel hepático: FATP5 se expresa en la membrana celular de los hepatocitos, mientras que FATP2 puede expresarse tanto en los peroxisomas, como en los canalículos biliares, cumpliendo distintas funciones en ambos sitios. Más allá de sus diferencias, la supresión de ambos genes se ha relacionado con una mejora en los parámetros metabólicos asociados al NAFLD (Falcon et al., 2010). En nuestro caso, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ARNm de ambas proteínas en S30 vs. S7. En contraposición con nuestros resultados, otros autores encontraron que el tratamiento de modelos animales con dietas HF, produjo un incremento en los niveles de ARNm de *Fatp2* y *Fatp5* (M. Zhang et al., 2023). Teniendo en cuenta que los transportadores FATP2 y FATP5 son los responsables de la captación de los NEFA provenientes de la lipólisis del TA; la falta de incremento en la expresión de estos transportadores en S30 vs S7, sugiere que la acumulación de lípidos hepáticos en S30 viene dada por una alta captación de AG provenientes de la dieta, y no del TA.

Por otro lado, tenemos al CD36, el cual mostró un incremento en S30 vs S7. El CD36 ha sido reconocido como un receptor multifuncional, que regula el metabolismo de AG, y su función está asociada a su localización sub-celular: mientras que el CD36 de membrana celular está asociado a la captación de NEFA circulantes y guarda una correlación positiva con el desarrollo de NAFLD, el CD36 mitocondrial está involucrado en la regulación de la β -oxidación. Este último

actúa como un puente entre el transporte de PUFA hacia la Acil-CoA sintasa, promoviendo la β -oxidación mitocondrial en los hepatocitos, aliviando así la acreción de lípidos característica del NAFLD (Zeng et al., 2022). De acuerdo con esto, debido al método de extracción de ARN utilizado en el presente trabajo, no estamos en condiciones de discriminar si el *Cd36* cuantificado es mayoritariamente mitocondrial o de membrana. Respecto al incremento en los niveles de ARNm de *Cd36* en S30 vs S7, Koonen et al., (2007) también encontraron un incremento en los niveles de ARNm de *Cd36* en el grupo HF vs control, y lo relacionaron con el incremento de los TAG hepáticos. Por lo tanto, además de la alta afluencia de AG dietarios, una mayor captación de AG circulantes por parte del CD36 de membrana celular, también podría estar influyendo en el incremento de los TAG hepáticos en S30 vs S7.

En cuanto a las dietas ricas en grasas, los grupos S30, M30, S30DD y M30DD presentaron mayores niveles de TAG hepáticos, en comparación con L30 y L30DD. Los mismos no estuvieron relacionados con cambios en la actividad LPL en TAE o músculo gastrocnemio, ni con los niveles de ARNm de *Fatp2*. Sin embargo, los grupos L30 y L30DD mostraron una reducción en los niveles de ARNm de *Fatp5*, lo cual podría contribuir a los mecanismos que llevaron a un menor contenido de TAG hepáticos en dichos grupos. En concordancia con nuestros resultados, Wang et al., (2016) encontraron que el tratamiento de ratones de la cepa C57BL/6 con aceite de lino, logró reducir los niveles de expresión de la proteína FATP5, en comparación con el grupo alimentado con aceite de maíz.

Respecto al *Cd36*, se observó un incremento en los niveles de ARNm en ambos grupos tratados con aceite de lino, respecto a las demás dietas ricas en grasas. Sin embargo, estos dos grupos fueron aquellos con los menores valores de TAG hepáticos. Basándonos en la doble funcionalidad del receptor CD36 y en los valores de TAG hepáticos de ambos grupos tratados con aceite de lino, podemos hipotetizar que el incremento de los niveles de ARNm de dicho transportador, podría estar relacionado a un incremento del *Cd36* mitocondrial, promoviendo un mayor *delivery* de AG para su oxidación.

En cuanto al posible mecanismo detrás de este incremento, Rideout et al., (2010) no observaron cambios en los niveles de *Cd36* en ratones C57BL/6J tratados con una dieta enriquecida en FE. Sumado a esto, está demostrado que el α -TF disminuye la expresión del *Cd36* (Catalgol & Ozer, 2012). Por lo tanto, el incremento en los niveles de *Cd36* en L30 y L30DD, podrían ser un efecto del alto contenido de PUFA n-3 presentes en el aceite de lino, lo cual como se mencionó anteriormente, se relaciona con una mayor oxidación de AG.

3.2.2- Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* es una vía metabólica integrada que comprende la glucólisis (conversión de glucosa en acetil-CoA) y biosíntesis de AG. Esta vía, incluye una serie de enzimas involucradas en la vía de la glucólisis, junto con la síntesis, desaturación y elongación de AG; entre las cuales se encuentran: la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la ácido graso sintasa (FAS) y la estearoil-CoA desaturasa (SCD) (Koo, 2013). Según diversos autores, existe una contribución importante de la lipogénesis *de novo* en la acumulación de TAG hepáticos propia de la NAFLD (Diraison et al., 2003; Donnelly et al., 2005). Sin embargo, como es conocido, la elevada oferta de lípidos dietarios se asocia a una marcada inhibición de la lipogénesis *de novo* (Crescenzo et al., 2008; Ferramosca & Zara, 2014). De acuerdo con esto, se observó una reducción en la actividad de la enzima clave de la lipogénesis ACC, junto con una disminución de los niveles de expresión de *Scd1*, en S30 vs S7.

Como se mencionó anteriormente, los grupos L30 y L30DD fueron aquellos con los menores valores de TAG hepáticos, entre las dietas ricas en grasas. Sin embargo, el grupo L30DD fue aquel con el mayor valor tanto de actividad enzimática ACC, como de expresión de *Fas* y *Scd1*. Además, ambos grupos tratados con aceite de lino presentaron los mayores niveles de ARNm de *Srebp1c*, factor de transcripción clave en la inducción de la lipogénesis *de novo*. Además de la mencionada inhibición de las vías lipogénicas frente a una ingesta de altos niveles de grasa (Diraison et al., 2003; Donnelly et al., 2005), es conocido que los PUFA n-3 tienen propiedades anti-lipogénicas, inhibiendo la expresión del *Srebp1c*, y activando la vía del PPAR α (Valenzuela & Videla, 2011). Cabe destacar que el grupo con los mayores valores de estos parámetros lipogénicos, está suplementado con DD (L30DD); además de los compuestos antioxidantes presentes en el aceite de lino virgen (obtenido por prensado en condiciones controladas, sin refinado). En base a esto, podemos inferir que el efecto sobre la lipogénesis, observados en ambos grupos, podría estar dado por su contenido de FE y TF totales. En el caso de los TF, Dossi et al., (2017) demostraron que el tratamiento de ratones con una dieta HF suplementada con aceite de rosa mosqueta (un aceite con alto contenido de γ -TF y una proporción n-6/n-3 similar al aceite de lino), produjo una reducción de los niveles de ARNm de *Srebp1c* y *Fas*.

Respecto a los FE, un estudio realizado por Feng, et al., (2018), demostró que la suplementación de una dieta HF con β -sitosterol produjo un incremento en los niveles de ARNm del *Srebp1c*, al mismo tiempo que incrementaron los niveles de ARNm de *Ppara*, en ratones macho de la cepa C57BL/6. Sumado a esto último, otro de los FE mayoritarios del aceite de lino,

el campesterol, es un potente agonista de los receptores LXR. Los agonistas de LXR activan la síntesis de AG estimulando la expresión de *Srebp1c*, lo cual conlleva a un incremento de los TAG hepáticos y al desarrollo de esteatosis (Belkowski, 2008). Rideout et al., (2010) encontraron en ratones de la cepa C57BL/6J que al tratarlos con una dieta conteniendo FE (principalmente β -sitosterol y campesterol), tenían un claro aumento de los niveles de expresión de *Fas*.

El aceite de lino posee un contenido de, aproximadamente 540 mg FE/100 g aceite, dentro de los cuales el FE mayoritario es el β -sitosterol, con un contenido aproximado de 196 mg β -sitosterol/100 g aceite, seguido del cicloartenol (138 mg cicloartenol/100 g aceite) y el campesterol (113 mg campesterol/100 g aceite). En función de esto, podemos inferir que la mezcla de FE, particularmente el β -sitosterol y campesterol, podría estar activando la vía de la lipogénesis *de novo* en los grupos tratados con aceite de lino. A su vez, como el DD tiene como FE mayoritarios al β -sitosterol (~62%) y campesterol (11%), los efectos observados en el grupo L30DD pueden deberse a que la suplementación con estos FE, potencia aún más el efecto de los niveles basales presentes en el aceite de lino. Esto último, se respalda en el hecho de que no se observaron los mismos efectos en los demás grupos suplementados con DD, lo que sugiere que los niveles basales de estos compuestos presentes en el aceite de lino virgen, pueden ser suficientemente altos como para lograr la reducción de los TAG hepáticos, sin inducir de sobremanera la lipogénesis *de novo*.

3.2.3- Secreción de VLDL-TAG

La secreción de VLDL-TAG, como se mencionó en el punto 2.3.2.3 de la introducción, constituye una de las principales funciones del hígado (Fisher et al., 2001). Numerosos trabajos han evaluado este parámetro tanto *in vivo*, como *in vitro*, mostrando una correlación positiva con el pool de TAG hepáticos. La proteína microsomal de transferencia de TAG, (*Mttp*) es necesaria para el ensamblaje y secreción de las VLDL-TAG, junto con la apoB (Nassir et al., 2015). Se ha encontrado que pacientes con defectos en el gen de la apoB y/o *Mttp*, son incapaces de exportar lípidos desde el hígado, llevando esto al desarrollo de esteatosis hepática. En modelos animales, ratones silenciados en apoB y/o *Mttp*, mostraron una acumulación de TAG hepáticos (Nassir et al., 2015). A su vez, el incremento en la secreción de VLDL-TAG constituye un mecanismo útil para mitigar la acumulación de TAG hepáticos (van Zwol et al., 2024). En el presente trabajo de tesis, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto, en la velocidad de secreción de VLDL-TAG, como en los niveles de ARNm de *Mttp* en S30 vs S7. En adición, se observó una reducción en los niveles de TAG séricos en S30 vs S7. Francone y col. (1992) trataron ratas macho Wistar con una dieta HF (conteniendo un 30% de grasa) y observaron un

incremento de los TAG hepáticos, sin aumento en la secreción de VLDL-TAG. A partir de dicho estudio, los autores plantearon que la formación hepática de TAG no está necesariamente acoplada a la producción de VLDL-TAG (Francone et al., 1992). Estos hallazgos son compartidos por estudios previos de nuestro grupo en otro modelo experimental (Illesca et al., 2015), como también por otros autores (Hashimoto et al., 2013).

Esto a su vez, resulta útil para interpretar lo observado en las dietas ricas en grasas. Los grupos S30, M30, S30DD y M30DD, mostraron un incremento de los TAG hepáticos, el cual no se vio asociado a cambios significativos en los niveles de secreción de VLDL-TAG. Si bien los grupos suplementados con DD mostraron un leve incremento en los niveles de secreción de VLDL-TAG, el cual coincidió con el incremento en la expresión de *Mttp* en M30DD y L30DD, esto no se vio reflejado en un incremento de los TAG circulantes. Fabbrini et al., (2008) plantearon que el incremento en la secreción hepática de VLDL-TAG, es insuficiente para normalizar el contenido de lípidos hepáticos en pacientes con NAFLD. Esto se debe a que la secreción de VLDL-TAG incrementa proporcionalmente con el contenido de TAG intra-hepáticos, hasta alcanzar un *plateau* cuando el contenido de lípidos hepáticos excede cierto valor umbral (Nassir et al., 2015). En base a esto, podemos concluir que la secreción de VLDL-TAG, si bien pareciera estar levemente estimulada por la suplementación con DD, no fue suficiente para alcanzar un efecto significativo sobre los niveles de TAG hepáticos.

3.2.4- Oxidación de AG

Otro mecanismo con gran influencia en el contenido de TAG hepáticos es la oxidación. Algunos autores han demostrado que, una ingesta alta de grasas induce una mayor oxidación de AG (Kakimoto & Kowaltowski, 2016; Vial et al., 2011). Sin embargo, otros autores afirman que la oxidación de AG es un proceso que depende en mayor medida del tipo de AG, más que del contenido total de los mismos (Moussavi et al., 2008). En el presente trabajo, sólo se observó un incremento en los niveles de ARNm de *Acox* en el grupo S30 vs. S7, sin cambios en la actividad ni expresión de CPT-1a, ni del factor de transcripción clave de la β -oxidación, PPAR α . Vamecq et al., (1993) demostraron que el incremento en la relación n-3/n-6 de los AG dietarios, produce un incremento en la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial en roedores. Dado que tanto S30 como S7 poseen el mismo tipo de lípidos dietarios (aceite de soja), ambas dietas poseen la misma relación n-3/n-6. Por este motivo, la oxidación de AG en este caso no ayudaría a contrarrestar la sobrecarga de lípidos provenientes de la dieta en S30, lo cual se ve reflejado en los mayores niveles de TAG hepáticos en dicho grupo, respecto del control.

Al evaluar el consumo de altos niveles de diferentes grasas dietarias, los menores niveles de TAG hepáticos observados en L30 y L30DD pueden relacionarse con la mayor actividad de CPT-1a, en comparación con las demás dietas HF. Este resultado podría estar asociado con el alto contenido de LC-PUFA n-3 observado en el hígado de estos grupos (EPA ~ 5 veces mayor que S30 y DHA ~ 1 vez mayor que S30). Es conocido que la familia de LC-PUFA n-3 está asociada con la promoción de la β -oxidación de AG y la prevención de la esteatosis hepática (Ferramosca & Zara, 2014; Shapiro et al., 2011). Por otro lado, además del incremento en la actividad CPT-1a, se observó un incremento en los niveles de ARNm tanto de *Cpt-1a* como de *Ppara*. Los PPAR son receptores nucleares activables por lípidos, que controlan una amplia variedad de genes en varias vías del metabolismo lipídico. En particular, el isotipo PPAR α media en el control de la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial del hígado (Katz, 1992). En el presente estudio, los niveles de ARNm de *Ppara* aumentaron en todos los grupos suplementados con DD y, particularmente, en el grupo L30DD (aumentaron 6,4 veces frente a S30). Este efecto fue seguido por un aumento en los niveles de ARNm de *Cpt-1a* en dichos grupos, mostrando en L30DD la misma tendencia (~ 1,8 veces mayor frente a S30DD y M30DD). Mientras que cada dieta HF suplementada tiene los mismos niveles de PUFA n-3 que su correspondiente dieta sin DD, el aumento en los niveles de ARNm de *Ppara* y *Cpt-1a* en los grupos con DD, podría estar relacionado con los TF y FE presentes en dichas dietas. En relación a esto, Minamiyama et al., (2008) demostraron que la suplementación con α -TF en ratas diabéticas, disminuyó la acumulación intra-hepática de TAG. Además, Kim et al., (2013) demostraron que la suplementación con TF aumenta los niveles de PPAR α en una dieta HF, en comparación con la misma dieta sin suplementación. Toda esta evidencia demostró que ambas formas de vitamina E (α - y γ -TF), promueven la activación de PPAR α , mejorando la correspondiente vía de β -oxidación. Con respecto a los FE, Micallef & Garg, (2008) revelaron que la suplementación combinada de FE y PUFA n-3, tuvo efectos hipolipemiantes. Feng et al., (2018) descubrieron que los TAG séricos y hepáticos se elevaban significativamente con la dieta HF y que dicho incremento se logró prevenir por el tratamiento con estigmasterol. También demostraron que tanto el estigmasterol, como el β -sitosterol, aumentaron significativamente la expresión de *Ppara*, lo que puede aumentar la β -oxidación hepática. En base a esto, podríamos atribuir el aumento en los niveles de ARNm de *Ppara* y *Cpt-1a* en los grupos suplementados con DD, al mayor contenido de TF y FE presente en las mismas.

Además de la oxidación mitocondrial de AG, existen otras vías de degradación de AG. Una de ellas es la β -oxidación peroxisomal, donde la enzima Acil-CoA oxidasa (ACOX) cataliza el primer paso de la oxidación de AG de cadenas de entre 8 y 18 carbonos. Acox, al igual que

Cpt-1a, son inducidos por PPAR α ; sin embargo, *Acox* mostró un comportamiento diferente a *Cpt-1a*, siendo incrementado en los grupos S30, S30DD y L30DD, entre los grupos ricos en grasas. Si bien el incremento en el grupo L30DD se corresponde con el incremento en los niveles de expresión de *Ppara*, en los grupos S30 y S30DD no está del todo claro el motivo detrás de dicho incremento. Por último, dentro de las vías de oxidación de AG, se encuentra la ω -oxidación microsomal, donde participa principalmente la familia Cyp4 del citocromo P450. Particularmente, la subfamilia Cyp4a es la encargada de metabolizar los AG de cadena media (C10-C16). Los niveles de *Cyp4a* se vieron incrementados en L30 y L30DD, al igual que la actividad de la enzima CPT-1a. Dado que la regulación de la expresión de esta enzima también se encuentra bajo el control del PPAR α , tiene sentido observar un comportamiento similar en esta, a aquel observado en *Cpt-1a*.

A partir de este análisis de las vías oxidativas de AG, podemos concluir que: 1) la reducción de los TAG hepáticos en ambos grupos tratados con aceite de lino, se deben principalmente a una inducción de las vías de la β - y ω -oxidación de AG; 2) Pese a que las vías oxidativas de AG se encuentran reguladas principalmente por PPAR α , las diferentes respuestas obtenidas a partir de un mismo tratamiento dietario, sugieren la existencia de otros factores adicionales que intervienen en dicha regulación.

En la **Figura 41** a partir de las flechas en rojo se representan los principales cambios involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática en el grupo S30, caracterizada por una acumulación de TAG hepáticos.

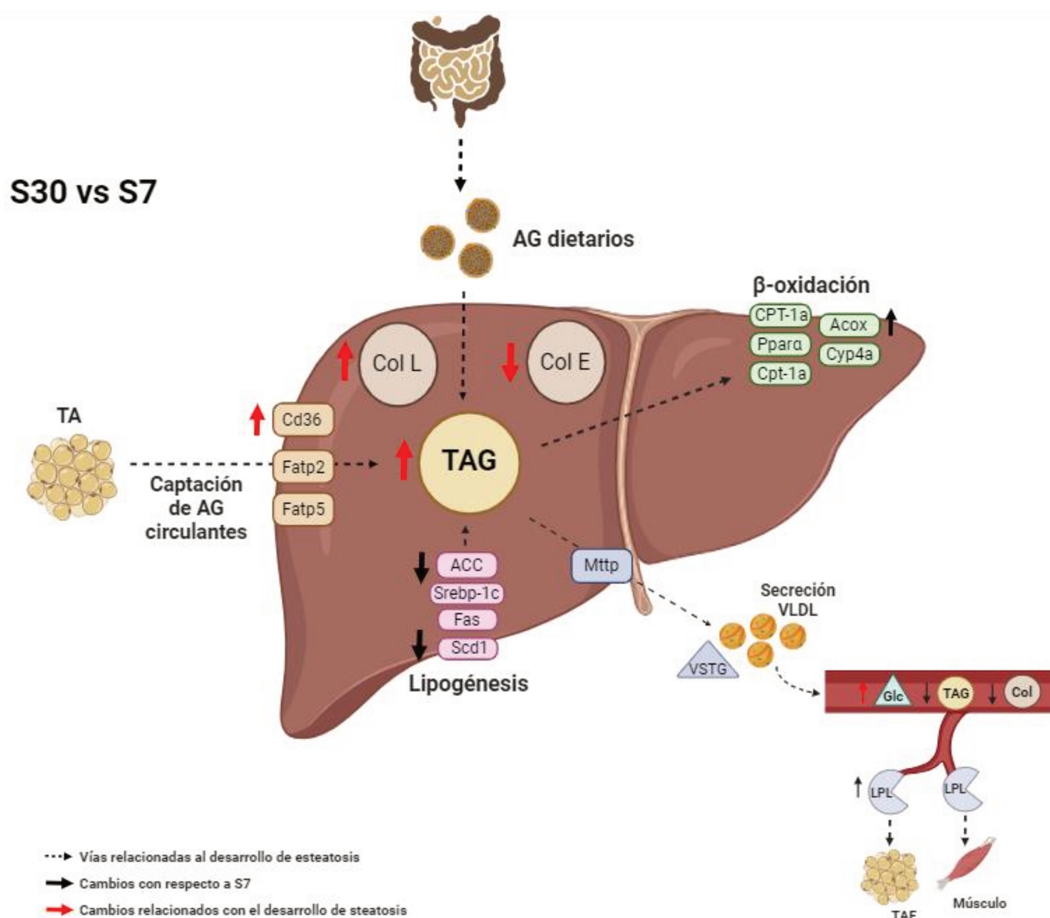


Figura 41: Principales efectos del tratamiento con la dieta *high-fat* S30, con respecto al grupo control S7. ACC: acetil-CoA carboxilasa; Acox: acil-CoA oxidasa; AG: ácidos grasos; Col: colesterol; Cd36: traslocasa de ácidos grasos; CPT: carnitina palmitoil transferasa; Cyp4a: citocromo P450; Fas: ácido graso sintasa; Fatp: proteína transportadora de ácidos grasos; Glc: glucosa; LPL: lipoproteína lipasa; Mttp: proteína transportadora de alfa-tocoferol; Scd1: steroil-CoA desaturasa; Srebp-1c: factor de transcripción 1 de unión a elementos reguladores de esteroides; TA: tejido adiposo; TAE: tejido adiposo epididimal; TAG: triacilglicéridos; VSTG: velocidad de secreción de VLDL-TAG.

En la **Figura 42** se muestran con flechas en color verde los principales efectos benéficos del aceite de lino sobre la prevención de la esteatosis hepática, en comparación con las demás dietas ricas en grasas (S30 y M30).

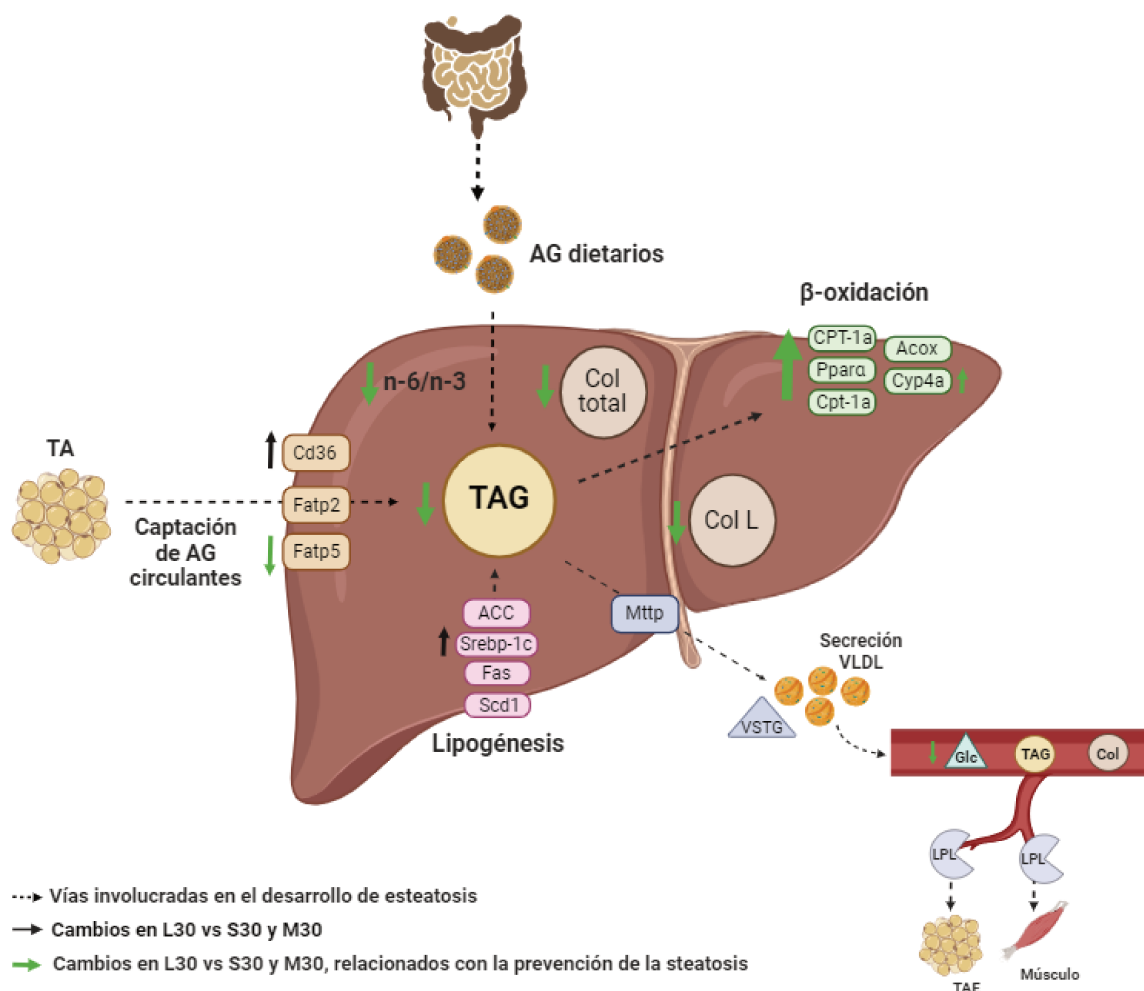


Figura 42: Principales efectos del tratamiento con las dietas conteniendo aceite de lino, sobre la prevención de la esteatosis hepática. ACC: acetil-CoA carboxilasa; Acox: acil-CoA oxidasa; AG: ácidos grasos; Col: colesterol; Cd36: traslocasa de ácidos grasos; CPT: carnitina palmitoil transferasa; Cyp4a: citocromo P450; Fas: ácido graso sintasa; Fatp: proteína transportadora de ácidos grasos; Glc: glucosa; LPL: lipoproteína lipasa; Mtp: proteína transportadora de alfa-tocoferol; Scd1: steroil-CoA desaturasa; Srebp-1c: factor de transcripción 1 de unión a elementos reguladores de esteroides; TA: tejido adiposo; TAE: tejido adiposo epididimal; TAG: triacilglicéridos; VSTG: velocidad de secreción de VLDL-TAG.

En la **Figura 43** se muestran los efectos benéficos adicionales de la suplementación con DD, sobre los parámetros relacionados al desarrollo del NAFLD.

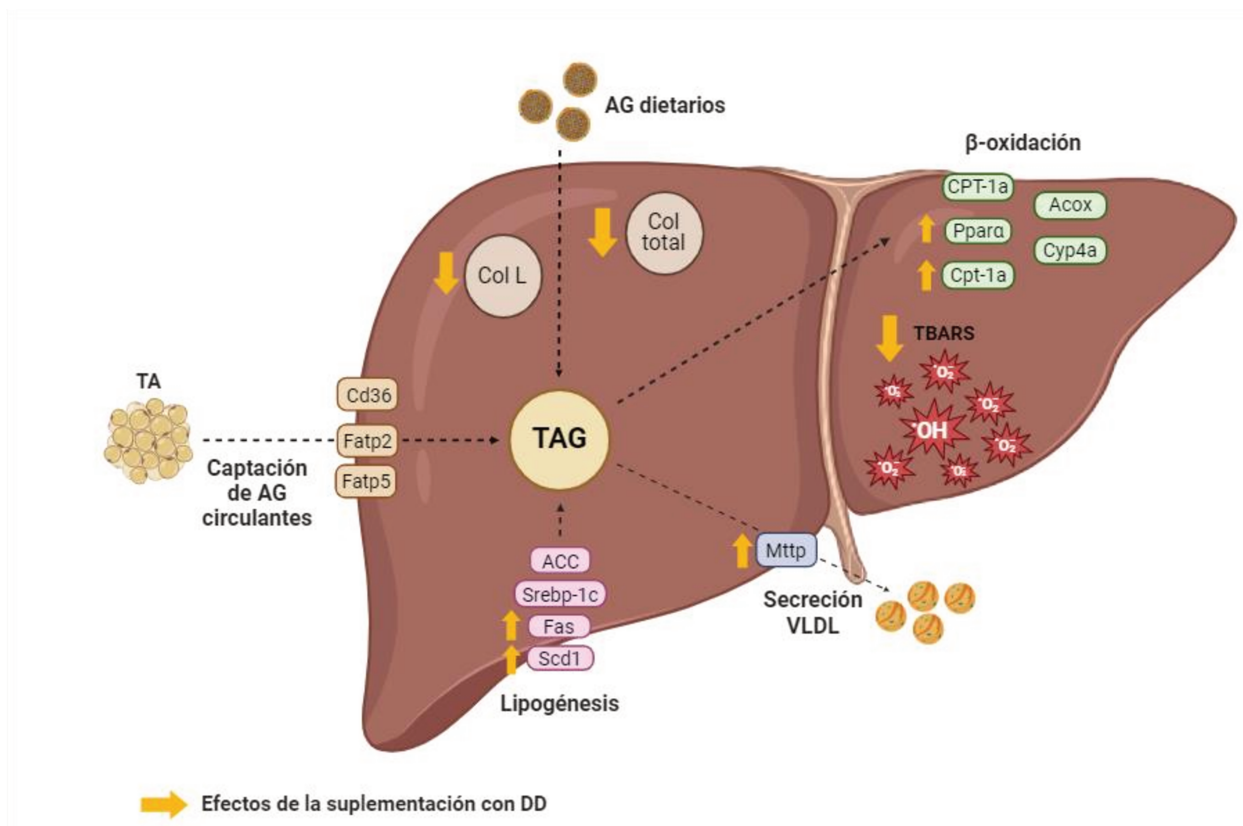


Figura 43: Efectos adicionales de la suplementación con DD sobre la prevención de la esteatosis hepática. ACC: acetil-CoA carboxilasa; Acox: acil-CoA oxidasa; AG: ácidos grasos; Col: colesterol; Cd36: traslocasa de ácidos grasos; CPT: carnitina palmitoil transferasa; Cyp4a: citocromo P450; Fas: ácido graso sintasa; Fatp: proteína transportadora de ácidos grasos; Mttp: proteína transportadora de alfa-tocoferol; Scd1: steroil-CoA desaturasa; Srebp-1c: factor de transcripción 1 de unión a elementos reguladores de esteroides; TA: tejido adiposo; TAG: triacilglicéridos; TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los hallazgos de la presente tesis, demuestran que un aceite de lino virgen, suplementado con tocoferoles y fitosteroles, previene el desarrollo de esteatosis hepática y hepatomegalia, mejorando el estado lipoperoxidativo hepático y la utilización de la glucosa; en un modelo animal de esteatosis, caracterizado por alteraciones lipídicas inducidas por dietas ricas en grasas.

Los principales mecanismos involucrados en los efectos benéficos de los grupos L30 y L30DD estuvieron relacionados con:

- ❖ Una marcada incorporación de ALA en los tejidos, los cuales pudieron generar un entorno lipídico-metabólico favorable para la formación de mediadores biológicos con acciones benéficas e inducción de efectos funcionales (como EPA y DHA).
- ❖ La mejor utilización de glucosa puede ser atribuida a cambios en el perfil de AG de lípidos de membranas.
- ❖ La prevención del desarrollo de esteatosis hepática estuvo asociado a un incremento en la β -oxidación mitocondrial, reflejada por una mayor expresión génica de Ppara y Cpt-1a, e incrementada actividad CPT-1a. Además, en el caso del grupo suplementado con DD, se logró un incremento en la expresión de Acox, junto con una inducción aún mayor de la expresión de los principales mediadores de la β -oxidación, previamente nombrados.
- ❖ La suplementación con DD logró ejercer un efecto antioxidante a nivel biológico, reduciendo los niveles de subproductos de la peroxidación lipídica.
- ❖ Ambos grupos tratados con aceite de lino lograron prevenir el estado inflamatorio hepático, caracterizado por hepatocitos balonzados y agregados inflamatorios, a partir del enriquecimiento en AG precursores de mediadores anti-inflamatorios, junto con los TF y FE.
- ❖ La suplementación con DD logró reducir los niveles de colesterol hepático, particularmente de colesterol libre, el cual constituye un factor clave asociado con el desarrollo de esteatohepatitis.

Los efectos benéficos asociados al consumo de las dietas L30 y L30DD, no pueden ser atribuidos exclusivamente al contenido de ALA, TF y FE del mismo, ya que, al tratarse de un aceite virgen, existe una serie de otros compuestos potencialmente funcionales que podrían estar involucrados en dichos efectos.

A pesar que, los resultados experimentales en modelos animales no pueden extrapolarse directamente a los seres humanos, el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos benéficos del aceite de lino virgen (caracterizado por un alto contenido de ALA), junto con los compuestos bioactivos provenientes de los destilados de desodorización (principalmente tocoferoles y fitoesteroles), podría ser de gran utilidad para el desarrollo de alimentos funcionales eficaces para el tratamiento o prevención de alteraciones observadas en ECNT, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Adams, L. A., & Angulo, P. (2005). Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Med.*, 22(9), 1129–1133.

Akieda-Asai, S., Koda, S., Sugiyama, M., Hasegawa, K., Furuya, M., & Miyazato, M. (2013). Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. *Obes. Res. Clin. Pract.*, 7(4), 243–250.

Al-Madhagy, S., Ashmawy, N. S., Mamdouh, A., Eldahshan, O. A., & Farag, M. A. (2023). A comprehensive review of the health benefits of flaxseed oil in relation to its chemical composition and comparison with other omega-3-rich oils. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 1–17.

Alabdulkarim, B., Bakeet, Z. A. N., & Arzoo, S. (2012). Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *Journal of King Saud University - Science*, 24(4), 319–329.

Altunkaynak, B. Z. (2005). Effects of high fat diet induced obesity on female rat livers (a histochemical study). *European Journal of General Medicine*, 2(3), 100–109. <https://doi.org/10.29333/ejgm/82319>

Alwan, A. (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010, (176-pp).

Alwan, A., MacLean, D. R., Riley, L. M., D'Espaignet, E. T., Mathers, C. D., Stevens, G. A., & Bettcher, D. (2010). Chronic Diseases: Chronic Diseases and Development 5: Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *The Lancet*, 376(9755), 1861.

Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014, 63(7), 895–902.

Andersen, M., Clewell, H., Gearhart, J., Allen, B., & Barton, H. (1997). Pharmacodynamic model of the rat estrus cycle in relation to endocrine disruptors. *J. Toxicol. Environ Health*, 52, 189–209.

Andreoli, M., Gonzalez, M., Martinelli, M., Mocchiutti, N., & Bernal, C. (2009). Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. *Nutrition*, 25, 445–452.

Arab, J. P., Dirchwolf, M., Álvares-da-Silva, M. R., Barrera, F., Benítez, C., Castellanos-Fernandez, M., Castro-Narro, G., Chavez-Tapia, N., Chiodi, D., Cotrim, H., Cusi, K., de Oliveira, C. P. M. S., Díaz, J., Fassio, E., Gerona, S., Giral, M., Hernandez, N., Marciano, S., Masson,

Austin, G., Ogden, L., & Hill, J. (2011). Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971-2006. *Am. J. Clin. Nutr.*, 93(4), 836–843.

Babu, U. S., Bunning, V. K., Wiesenfeld, P., Raybourne, R. B., & O'Donnell, M. (1997). Effect of dietary flaxseed on fatty acid composition, superoxide, nitric oxide generation and antilisterial activity of peritoneal macrophages from female Sprague-Dawley rats. *Life Sciences*, 60(8), 545-554.

Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E., & Ferretti, G. (2011). Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods. *Mediterr. J. Nutr. Metab.*, 4(3), 165–172.

Bagnol, D., Al-Shamma, H., Behan, D., Whelan, K., & Grottick, A. (2012). Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. *Protoc. Neurosci.*, 9(9), 1–13.

Baker, D. H. (2008). Animal models in nutrition research. *The Journal of Nutrition*, 138(1), 391–396.

Barrows, B. R., & Parks, E. J. (2006). Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein- triacylglycerol in the fasted and fed states. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 1446–1452.

Batta, A. K., Xu, G., Honda, A., Miyazaki, T., & Salen, G. (2006). Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism*, 55(3), 292-299.

Bayne, K. (1996). Revised guide for the care and use of laboratory animals available. American Physiological Society. *Physiologist*, 39(4), 199.

Beare, J. L., & Kates, M. (1964). The deposition of linoleic acid in rats fed corn oil. *Canadian Journal of Biochemistry*, 42(10), 1477-1486.

Bedossa, P. (2016). Histological Assessment of NAFLD. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1348–1355.

Begrache, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2006). Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitocondrion*, 6, 1–28.

- Bell, R. R., Spencer, M. J., & Sherriff, J. L. (1997). Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *J Nutr*, 127, 2006–2010.
- Bełtowski, J. (2008). Liver X Receptors (LXR) as Therapeutic Targets in Dyslipidemia. *Cardiovascular Therapeutics*, 26, 297-316.
- Beltrán, M. R. (2016). Alimentos funcionales. *Farmacia Profesional*, 30(3), 3–5.
- Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R., & Calvani, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J. Am. Coll. Nutr.*, 23, 281–302.
- Bernal, C., Basilico, M. Z., Gutman, R., & Lombardo, Y. B. (1989). Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet. *Nutrition Reports International*, 40(1), 71–83.
- Bernal, C., Rovira, J., Colandré, M., Cussó, R., & Cadefau, J. (2006). Effects of dietary cis and transunsaturated and saturated fatty acids on the glucose metabolites and enzymes of rats. *Br. J. Nutr.*, 95(5), 947-954.
- Bessone, F., Valeria, M., & Marcelo, R. (2019). Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *In Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 99-128.
- Bianco, C., Romeo, S., Petta, S., Long, M. T., & Valenti, L. (2020). MAFLD vs NAFLD: Let the contest begin! *Liver International*, 40(9), 2079–2081.
- Bielski, B. H., Arudi, R. L., & Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂-with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4759–4761.
- Binukumar, B., & Mathew, A. (2005). Dietary fat and risk of breast cancer. *World J. Surg. Oncol.*, 3, 45.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Boozer, C. N., Schoenbach, G., & Atkinson, R. L. (1995). Dietary fat and adiposity – a dose–response relationship in adult male rats fed isocalorically. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 268, E546–E550.
- Botros, M., & Sikaris, K. A. (2013). The de Ritis ratio: the test of time. *The Clinical Biochemist Reviews*, 34(3), 117.

- Bourgeois, F., Alexiu, A., & Lemonnier, D. (1983). Dietary- induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *Br J Nutr*, 49, 17–26.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye binding. *Crop Journal*, 72, 248–254.
- Bray, G. A., Lovejoy, J. C., Smith, S. R., DeLany, J. P., Lefevre, M., Hwang, D., & York, D. A. (2002). The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *The Journal of Nutrition*, 132(9), 2488–2491.
- Briaud, I., Kelpe, C., Johnson, L., Tran, P., & Poitout, V. (2002). Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes*, 51, 662–668.
- Brigelius-flohe, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145–1155.
- Brunt, E. M. (2010). Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7(4), 195–203.
- Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28(4), 217-225.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 302–310.
- Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798–808.
- Bugianesi, E., Gastaldelli, A., & Vanni, E. (2005). Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*, 48(4), 634–642.
- Burr, G. O., & Burr, M. M. (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry*, 82(2), 345–367.
- Burton, G. W., Traber, M. G., Acuff, R. V., & Al., E. (1998). Human plasma and tissue g-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 67, 669–84.

- Caballero, F., Fernandez, A., De Lacy, A. M., Fernandez-Checa, J. C., Caballeria, J., & Garcia-Ruiz, C. (2009). Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol.*, 50, 789–796.
- Calvani, M., & Benatti, P. (2003). Polyunsaturated fatty acids. *Sigma-tau SpA–Scientific Department*. Retrieved March, 24, 2015.
- Carneiro, J., & Junqueira, L. C. (2002). *Histología Básica*.
- Castera, L., Vilgrain, V., & Angulo, P. (2013). Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(11), 666–675.
- Catalgol, B., & Ozer, N. K. (2012). Protective effects of vitamin E against hypercholesterolemia-induced age-related diseases. *Genes Nutr.*, 7(1), 91-98.
- Cedó, L., Farràs, M., Lee-Rueckert, M., & Escolà-Gil, J. C. (2019). Molecular Insights into the Mechanisms Underlying the Cholesterol-Lowering Effects of Phytosterols. *Curr. Med. Chem.*, 26, 6704–6723.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., Charlton, M., & Sanyal, A. J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 55(6), 2005–2023.
- Chalkley, S., Hettiarachchi, M., Chisholm, D., & Kraegen, E. (2002). Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282, 1231–1238.
- Cheng, Z., & Ristow, M. (2013). Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxid Redox Signal.*, 19(3), 240–242.
- Chilton, F. H., Murphy, R. C., Wilson, B. A., Sergeant, S., Ainsworth, H., Seeds, M. C., & Mathias, R. A. (2014). Diet-Gene Interactions and PUFA Metabolism: A Potential Contributor to Health Disparities and Human Diseases. *Nutrients*, 6, 1993–2022.
- Choi, Y., Lee, S., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Oh, H., & Yoon, Y. (2020). Vitamin E (α -tocopherol) consumption influences gut microbiota composition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(2), 221-225.

Comba, A., Maestri, D., Berra, M., Garcia, C., Das, U., Eynard, A., & Pasqualini, M. E. (2010). Effect of omega-3 and omega-9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis.*, 9, 112.

Corpeleijn, E., Feskens, E. J. M., Jansen, E. H. J. M., Mensink, M., Saris, W. H. M., De Bruin, T. W. A., & Blaak, E. E. (2006). Improvements in glucose tolerance and insulin sensitivity after lifestyle intervention are related to changes in serum fatty acid profile and desaturase activities: The SLIM study. *Diabetologia*, 49(10), 2392–2401.

Costa, I., Moral, R., Solanas, M., Andreu, F. J., Ruiz de Villa, M. C., & Escrich, E. (2011). High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study. *Virchows Arch.*, 458, 141–151.

Crescenzo, R., Bianco, F., Falcone, I., Prisco, M., Liverini, G., & Iossa, S. (2008). Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity*, 16, 958–964.

Cusi, K. (2016). Treatment of patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: current approaches and future directions. *Diabetologia*, 59(6), 1112-1120.

Day, C. P., & James, O. F. W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology*, 114(4), 842–845.

Del Prado, M., Hernandez-Montes, H., & Villalpando, S. (1994). Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch. Med. Res.*, 25, 331-335.

De Lorgeril, M., Renaud, S., Salen, P., Monjaud, I., Mamelle, N., Martin, J. L., & Delaye, J. (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet*, 343(8911), 1454-1459.

DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., & Wahren, J. (1985). Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulindependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 76, 149–155.

Department of Health and Human Services (DHHS); Department of Agriculture. (1985). Dietary Guidelines for Americans. U.S. Dept of Health and Human Services. Washington.

Diraison, F., Moulin, P., & Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metabolism*, 29(5), 478–485.

Doerge, H., Baillie, R. A., & Ortegon, A. M. (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology*, 130(4), 1245–1258.

Dokken, B. B., Saengsirisuwan, V., Kim, J. S., Teachey, M. K., & Henriksen, E. J. (2008). Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, 615–621.

Donnelly, K., Smith, C., Schwarzenberg, S., Jessurun, J., Boldt, M. ., & Parks, E. . (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5), 1343–1351.

Dossi, C. G., Cadagan, C., San Martín, M., Espinosa, A., González-Mañán, D., Silva, D., Mancilla, R. A., & Tapia, G. S. (2017). Effects of rosa mosqueta oil supplementation in lipogenic markers associated with prevention of liver steatosis. *Food and Function*, 8(2), 832–841.

Drevon, C. A. (1991). Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Rad. Res. Commun.*, 14, 229–246.

Efati, M., Khorrami, M., Zarei Mahmudabadi, A., & Raouf Sarshoori, J. (2016). Induction of an animal model of non-alcoholic fatty liver disease using a formulated high-fat diet. *Journal of Babol*, 18(11), 57-62.

Egger, G., & Dixon, J. (2014). Beyond obesity and lifestyle: A review of 21st century chronic diseases determinants. *BioMed Research International*, 731685, 1–12.

Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., Sanyal, A., Neuschwander-Tetri, B., Tiribelli, C., Kleiner, D. E., Brunt, E., Bugianesi, E., Yki-Järvinen, H., Grønbaek, H., Cortez-Pinto, H., Fan, J., Valenti, L., Abdelmalek, M., Romero-Gomez, M., Rinella, M., Arrese, M., Bedossa, P., ... Younossi, Z. (2020). MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1999-2014.e1.

Fabbrini, E., Magkos, F., & Mohammed, B.S, et al. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(36), 15430–15435.

- Fabbrini, E., Mohammed, B., Magkos, F., Korenblat, K., Patterson, B., & Klein, S. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2), 424–431.
- Falcon, A., Doege, H., & Fluitt, A. (2010). FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 299(3), 384–393.
- FAO. (2012). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *Food Nutr.*, 91, 1–166.
- Fariña, A., González, M., Scalerandi, M. V., Lavandera, J., & Bernal, C. (2015). Nutritional and metabolic effects of dietary trans fats depend on the intake of linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117, 933-944.
- Feng, S., Dai, Z., Liu, A. B., Huang, J., Narsipur, N., Guo, G., Kong, B., Reuhl, K., Lu, W., Luo, Z., & Yang, C. S. (2018). Intake of stigmaterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(10), 1274–1284.
- Feng, S., Gan, L., Yang, C. S., Liu, A. B., Lu, W., Shao, P., Dai, Z., Sun, P., & Luo, Z. (2018). Effects of Stigmaterol and β -Sitosterol on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Mouse Model: A Lipidomic Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3417–3425.
- Fernandez, C., Suarez, Y., Ferruelo, A. & Al., E. (2002). Inhibition of cholesterol biosynthesis by D22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol D24-reductase in mammalian cells. *Biochem J*, 366, 109-119.
- Fernández, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2008). Cholesterol and sphingolipids in alcohol-induced liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23(1), 9–15.
- Ferramosca, A., Conte, A., Damiano, F., Siculella, L., & Zara, V. (2014). Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats. *European Journal of Nutrition*, 53(4), 1103–1114.
- Ferramosca, A., & Zara, V. (2014). Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World Journal of Gastroenterology*, 20(7), 1746–1755.

- Fibrozu, T. U. G. K. (2005). Effect of Alpha-Tocopherol on Tissue Transglutaminase and Reversibility of Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in rats. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem*, 31(1), 13-20.
- Fisher, E. A., Pan, M., Chen, X., Wu, X., Wang, H., Jamil, H., Sparks, J. D., & Williams, K. J. (2001). The triple threat to nascent apolipoprotein B: Evidence for multiple, distinct degradative pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 27855–27863.
- Flowers, M. T. (2009). The delta9 fatty acid desaturation index as a predictor of metabolic disease. *Clin. Chem.*, 55, 2071–2073.
- Fon Tacer, K., & Rozman, D. (2011). Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Journal of Lipids*, 783976.
- Francone, O. L., Griffaton, G., & Kalopissis, A. D. (1992). Effect of a high-fat diet on the incorporation of stored triacylglycerol into hepatic VLDL. *The American Journal of Physiology*, 263(4), 615-623.
- Freedman, B., & Bagby, M. O. (1989). Heats of combustion of fatty esters and triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(11), 1601–1605.
- Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 24(7), 908–922.
- Fromenty, B., Berson, A., & Pessayre, D. (1997). Microvesicular steatosis and steatohepatitis: Role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Journal of Hepatology, Supplement*, 26(1), 13–22.
- Gaggini, M., Morelli, M., Buzzigoli, E., DeFronzo, R. A., Bugianesi, E., & Gastaldelli, A. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*, 5, 1544-1560.
- Gallo, R., Babu, G., Bona-Gallo, A., Devorshak-Harvey, E., Leipheimer, R., & Marco, J. (1987). Regulation of pulsatile luteinizing hormone release during the estrous cycle and pregnancy in the rat. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 219, 109–130.
- Gan, L. T., Van Rooyen, D. M., Koina, M. E., McCuskey, R. S., Teoh, N. C., & Farrell, G. C. (2014). Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J. Hepatol.*, 61, 1376–1384.

Geneser. (2020). Geneser Histología, 4a edición.

Gerstner, C. D. (2020). EFECTOS BENÉFICOS DE UNA GRASA LÁCTEA MODIFICADA SOBRE LA FORMACIÓN DE HÍGADO GRASO Y OTRAS ALTERACIONES METABÓLICAS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Gerstner, C., Saín, J., Lavandera, J., González, M., & Bernal, C. (2021). Functional milk fat enriched in conjugated linoleic acid prevented liver lipid accumulation induced by a high-fat diet in male rats. *Food and Function*, 12(11), 5051–5065.

Gibson, R. A., Muhlhausler, B., & Makrides, M. (2011). Conversion of linoleic acid and algalinolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern. Child Nutr.*, 7(2), 17–26.

Gibson, R. A., Neumann, M., Lien, E., Boyd, K., & Tu, W. (2013). Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 88, 139-146.

Gillingham, L., Harris-Janz, S., & Jones, P. (2011). Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*, 46(3), 209–228.

Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., & Al., E. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. *Obes Res*, 10, 956–963.

Gibson, R. A., Muhlhausler, B., & Makrides, M. (2011). Conversion of linoleic acid and algalinolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern. Child Nutr.*, 7(2), 17–26.

Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2017). Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(6), 343-355.

Gonçalves, N. B., Bannitz, R. F., Silva, B. R., Becari, D. D., Poloni, C., Gomes, P. M., Foss, M. C., & Foss-Freitas, M. C. (2018). α -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Clinics*, 73(12), 1–9.

- 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(4), 407–419.
- Graffigna, M., Catoira, N., Soutelo, J., Azpelicueta, Gabriela Berg, C., Perel Migliano, M. E., Aranguren, M., Musso, C., & Javier, F. (2017). Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 54(1), 37–46.
- Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P., & Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research*, 49(2), 186–199.
- Gustafson, L. A., Kuipers, F., Wiegman, C., Sauerwein, H. P., Romijn, J. A., & Meijer, A. J. (2002). Clofibrate improves glucose tolerance in fat-fed rats but decreases hepatic glucose consumption capacity. *Journal of Hepatology*, 37(4), 425–431.
- Gutte, K. B., Sahoo, A. K., & Ranveer, R. C. (2015). Bioactive components of flaxseed and its health benefits. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 31(1), 42–51.
- Gutierrez, J. M., Kaizer, R. R., Schmatz, R., Mazzanti, C. M., Vieira, J. M., Rodrigues, M. V., & Spanevello, R. M. (2012). α -Tocopherol regulates ectonucleotidase activities in synaptosomes from rats fed a high-fat diet. *Cell Biochemistry and Function*, 30(4), 286–292.
- Han, T. S., & Lean, M. E. (2015). Metabolic syndrome. *Medicine*, 43(2), 80–87.
- Hansen, L. L., Ikeda, Y., Olsen, G. S., Busch, A. K., & Mostha, L. (1999). Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. *J Biol Chem*, 274, 25078–25084.
- Hariri, N., Gougeon, R., & Thibault, L. (2010). A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr. Res*, 30(9), 632–643.
- Harrold, J. A., Williams, G., & Widdowson, P. S. (2000). Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurochem*, 74, 1224–1228.

- Hashimoto, Y., Yamada, K., Tsushima, H., Miyazawa, D., Mori, M., Nishio, K., Ohkubo, T., Hibino, H., Ohara, N., & Okuyama, H. (2013). Three dissimilar high fat diets differentially regulate lipid and glucose metabolism in obesity-resistant Slc: Wistar/ST rats. *Lipids*, 48(8), 803–815.
- He, F., & Zuo, L. (2015). Redox roles of reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 27770–27780.
- Henry, L., Paik, J., & Younossi, Z. M. (2022). The epidemiologic burden of non- alcoholic liver disease across the world. *Aliment Pharmacol Ther*, 56, 942–56.
- Hodson, L., Bickerton, A. S., & McQuaid, S. E. (2007). The contribution of splanchnic fat to VLDL triglyceride is greater in insulin-resistant than insulin-sensitive men and women: studies in the postprandial state. *Diabetes*, 56, 2433–2441.
- Hodson, L., McQuaid, S. E., & Humphreys, S. M. (2010). Greater dietary fat oxidation in obese compared with lean men: an adaptive mechanism to prevent liver fat accumulation? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299, 584–592.
- Hodson, L., Rosqvist, F., & Parry, S. A. (2020). The influence of dietary fatty acids on liver fat content and metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 79(1), 30–41.
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research*, 47(5), 348–380.
- Hofacer, R., Magrisso, I. J., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Benoit, S. C., & McNamara, R. K. (2012). Omega-3 fatty acid deficiency increases stearoyl-CoA desaturase expression and activity indices in rat liver: Positive association with non-fasting plasma triglyceride levels. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 86(1–2), 71–77.
- Honors, M. A., Hargrave, S. L., & Kinzig, K. P. (2012). Glucose Tolerance in Response to a High-Fat Diet Is Improved by a High-Protein Diet. *Obesity*, 20(9), 1859–1865.
- Hosomi, A., Arita, M., Sato, Y., Kiyose, C., Ueda, T., Igarashi, O., Arai, H., & Inoue, K. (1997). Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.*, 409, 105–108.
- Houseknecht, K. L., & Kahn, B. B. (1997). Molecular mechanisms for insulin-stimulated glucose transport: regulation of Glut4 translocation. *J Anim Sci*, 75, 32–45.

Hui, J. M., Sud, A., & G.C., F. (2003). Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology*, 125, 1695–704.

Husted, K. S., & Bouzinova, E. V. (2016). The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder. *Medicina*, 52, 139–147.

Ichimura, M., Kawase, M., Masuzumi, M., Sakaki, M., Nagata, Y., Tanaka, K., & Omagari, K. (2014). High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatology Research*, 45(4), 458–469.

Igoudjil, A., Mansouri, A., & Pessayre, D. (2004). The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metabolism*, 30, 121–138.

Illesca, P., Lavandera, J., Gerstner, C., González, M., & Bernal, C. (2015). Trans fatty acids modify nutritional parameters and triacylglycerol metabolism in rats: differential effects at recommended and high-fat levels. *Nutr. Hosp.*, 32(2), 738-748.

Im, Y. R., Hunter, H., de Gracia Hahn, D., Duret, A., Cheah, Q., Dong, J., Fairey, M., Hjalmarsson, C., Li, A., Lim, H. K., McKeown, L., Mitrofan, C., Rao, R., Utukuri, M., Rowe, I. A., & Mann, J. P. (2021). Systematic Review of Animal Models of NAFLD Finds High-Fat, High-Fructose Diets Most Closely Resemble Human NAFLD. *Hepatology*, 74(4), 1884–1901.

Islam, S. M. S., Purnat, T. D., Phuong, N. T. A., Mwingira, U., Schacht, K., & Fröschl, G. (2014). Non-Communicable Diseases (NCDs) in developing countries: a symposium report. *Globalization and health*, 10, 1-8.

Iwasaki, W., Kume, M., Kudo, K., Uchinami, H., Kikuchi, I., Nakagawa, Y., Yoshioka, M., & Yamamoto, Y. (2010). Changes in the fatty acid composition of the liver with the administration of n-3 polyunsaturated fatty acids and the effects on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *Shock*, 33(3), 306–314.

Jahn, D., Kircher, S., Hermanns, H. M., & Geier, A. (2019). Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(5), 943–953.

JeBailey, L., Wanono, O., Niu, W., Roessler, J., Rudich, A., & Klip, A. (2007). Ceramide and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac activation and actin remodeling in muscle cells. *Diabetes*, 56, 394–403.

- Jeyapal, S., Kona, S. R., Mullapudi, S. V., Putcha, U. K., Gurumurthy, P., & Ibrahim, A. (2018). Substitution of linoleic acid with α -linolenic acid or long chain n-3 polyunsaturated fatty acid prevents Western diet induced nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports*, 8(1), 10953.
- Jiang, Q., Elson-Schwab, I., Courtemanche, C., & Ames, B. N. (2000). Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha- tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11494–11499.
- Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K., & Ames, B. N. (2001). γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(6), 714–722.
- Jiang, Q., Im, S., Wagner, J. G., Hernandez, M. L., & Peden, D. B. (2022a). Gamma-tocopherol, a major form of vitamin E in diets: Insights into antioxidant and anti-inflammatory effects, mechanisms, and roles in disease management. *Free Radical Biology and Medicine*, 178(November 2021), 347–359.
- Jordão Candido, C., Silva Figueiredo, P., Del Ciampo Silva, R., Candeloro Portugal, L., Augusto dos Santos Jaques, J., Alves de Almeida, J., de Barros Penteado, B. Albuquerque Dias, D., Marcelino, G., & Pott, A. (2020). Protective Effect of α -Linolenic Acid on Non-Alcoholic Hepatic Steatosis and Interleukin-6 and -10 in Wistar Rats. *Nutrients*, 12(9).
- Jump, D. B. (2011). Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(2), 115.
- Kamboh, M. A., Chang, A. S., Wan Ibrahim, W. A., Sanagi, M. M., Mahesar, S. A., Sirajuddin., & Sherazi, S. T. H. (2015). A green method for the quantitative assessment of neutral oil in palm fatty acid distillates by single bounce attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *RSC Advances*, 5, 50591–50596.
- Kakimoto, P., & Kowaltowski, A. (2016). Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol.*, 8, 216-25.
- Katz, N. R. (1992). Metabolic Heterogeneity of Hepatocytes across the Liver Acinus. *Journal of Nutrition*, 122(3 Suppl.), 850–854.
- Kelley, N. S., Yoshida, Y., & Erickson, K. L. (2014). Do n-3 polyunsaturated fatty acids increase or decrease lipid peroxidation in humans? *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 12, 403–415.

- Khor, B. H., Sahathevan, S., Sualeheen, A., Ali, M. S. M., Narayanan, S. S., & Chinna, K. (2019). Dietary fatty acid intake in hemodialysis patients and associations with circulating fatty acid profiles: A cross-sectional study. *Nutrition*, 63, 14-21.
- Kim, D. Y., Kim, J., Ham, H. J., & Choue, R. (2013). Effects of d- α -tocopherol supplements on lipid metabolism in a high-fat diet-fed animal model. *Nutrition Research and Practice*, 7(6), 481-487.
- Kleiner, D. E., & Brunt, E. M. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease: Pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Seminars in Liver Disease*, 32(1), 3–13.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., ... & Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321.
- Koo, S. H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 19(3), 210–215.
- Koonen, D, Jacobs, R. ., & Febbraio, M. (2007). Increased hepatic CD36 expres- sion contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*, 56(12), 2863–2871.
- Kramer, D., & Guilbault, G. (1963). A substrate for the fluorimetric determination of lipase activity. *Analytical Chemistry*, 35, 588-589.
- Kremer, J. (2000). n-3 fatty acid supplements in rheumat oid arthritis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 349–351.
- Krishna, M. (2013). Anatomía microscópica del hígado. *Clinical Liver Disease*, 2(S5), 109–112.
- Krishnan, S., & Cooper, J. A. (2014). Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. *European Journal of Nutrition*, 53, 691–710.
- Kwan, B. C., Kronenberg, F., Beddhu, S., & Cheung, A. K. (2007). Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18, 1246–1261.
- Lambert, J, Ramos-Roman, M., Browning, J., & Parks, E. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 143(3), 726–735.
- Lands, B. (2012). Consequences of essential fatty acids. *Nutrients*, 4(9), 1338–1357.

Larakia, L., Pelletiera, X., Mourol', J., & Debrya, G. (1993). Effects of Dietary Phytosterols on Liver Lipids and Lipid Metabolism Enzymes KeyWords Phytosterols Lipid metabolism Fatty acids Cholesterol Rat. Original Paper *Ann Nutr Metab*, 37, 129–133.

Larter, C. Z., & Yeh, M. M. (2008). Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol*, 23, 1635–1648.

LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., & Powers, M. J. (2012). Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Critical Reviews in Toxicology*, 42(6), 501–548.

Lee, J. H., Bullen Jr, J. W., Stoyneva, V. L., & Mantzoros, C. S. (2005). Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(3), 625–632.

Lenighan, Y. M., McNulty, B. A., & Roche, H. M. (2019). Dietary fat composition: Replacement of saturated fatty acids with PUFA as a public health strategy, with an emphasis on α -linolenic acid. *Proc. Nutr. Soc.*, 78, 234–245.

Legrand, P., Beauchamp, E., Catheline, D., Pédrone, F., & Rioux, V. (2010). Short chain saturated fatty acids decrease circulating cholesterol and increase tissue PUFA content in the rat. *Lipids*, 45(11), 975-986.

Leigh, S., Lee, F., & Morris, M. (2018). Hyperpalatability and the generation of obesity: roles of environment, stress exposure and individual difference. *Curr. Obes. Rep.*, 7(1), 6-18.

Liang, W., Menke, A. L., Driessen, A., Koek, G. H., Lindeman, J. H., Stoop, R., Havekes, L. M., Kleemann, R., & Van Den Hoek, A. M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS ONE*, 9(12), 1–17.

Lieber, C., Leo, M., Mak, K., Xu, Y., Cao, Q., & Ren, C. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(3), 502–509.

Lim, S., Kim, J. W., & Targher, G. (2021). Links between metabolic syndrome and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(7), 500–514.

Ling, B., Aziz, C., & Alcorn, J. (2012). Systematic evaluation of key L-carnitine homeostasis mechanisms during postnatal development in rat. *Nutrition and Metabolism*, 9(1), 1.

- Liu, M., Wallmon, A., Olsson-Mortlock, C., Wallin, R., & Saldeen, T. (2003). Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(3), 700–706.
- Liu, T. W., Heden, T. D., Matthew Morris, E., Fritsche, K. L., Vieira-Potter, V. J., & Thyfault, J. P. (2015). High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: Implications for in Vitro Studies. *Lipids*, 50(10), 997–1008.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lo, C. M., Nordskog, B. K., Nauli, A. M., Zheng, S., Vonlehmden, S. B., Yang, Q., Lee, D., Swift, L. L., Davidson, N. O., & Tso, P. (2008). Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation? *Am J Physiology Gastrointest Liver Physiol.*, 294, G344–G352.
- Lomonaco, R. (2012). Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55, 1389–1397.
- López-Miranda, J., Perez-Jimenez, F., Ros, E., De, C. R., Badimon, L., & Covas, M. (2010). Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 20, 284–294.
- Lutz, O., Lave, T., Frey, A., Meraihi, Z., & Bach, A. C. (1989). Activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase on long- and medium-chain triglyceride emulsions used in parenteral nutrition. *Metabolism*, 38, 507-513.
- Macedo de Almeida, M., Luquetti, S., Sabarense, C., Corrêa, J., dos Reis, L., da Conceição, E. P., Lisboa, P., de Moura, E., Gameiro, J., da Gama, M. A., Lopes, F. C., & Garcia, R. M. (2014). Butter naturally enriched in cis-9, trans-11 CLA prevents hyperinsulinemia and increases both serum HDL cholesterol and triacylglycerol levels in rats. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 200.
- Mantovani, A. (2021). MAFLD vs NAFLD: Where are we? *Digestive and Liver Disease*, 53(10), 1368–1372.
- Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J. C., & Garcia-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.*, 4, 185–198.

Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., Guesnet, P., Amri, E. Z., Negrel, R., & Ailhaud, G. (2003). Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: A human health concern? *Journal of Lipid Research*, 44(2), 271–279.

Masson, L., Alfaro, T., Camilo, C., Carvalho, A., Illesca, P., Torres, R., Do Carmo, M. T., Mancini-Filho, J., & Bernal, C. (2015). Fatty acid composition of soybean/sunflower mix oil, fish oil and butterfat applying the AOCS Ce 1j-07 method with a modified temperature program. *Grasas y Aceites*, 66(1), 1–16.

Matsuzaka, T., & Shimano, H. (2011). Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *Journal of Diabetes Investigation*, 2(3), 170–175

Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., & McCullough, A. J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116(6), 1413-1419.

McGill, D. B., Rakela, J., Zinsmeister, A. R., & Ott, B. J. A. (1990). 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology*, 99, 1396–1400.

McLaughlin, P. J., & Weihrauch, J. L. (1979). Vitamin E content of foods. *J. Am. Diet Assoc.*, 75(6), 647–665.

Meli, R., Mattace Raso, G., Irace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., & Santamaria, R. (2013). High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PLoS One*, 8(6), e66570.

Meyer, B. J., Mann, N. J., Lewis, J. L., Milligan, G. C., Sinclair, A. J., & Howe, P. R. C. (2003). Dietary Intakes and Food Sources of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Lipids*, 38, 391–398.

Micallef, M. A., & Garg, M. L. (2008). The lipid-lowering effects of phytosterols and (n-3) polyunsaturated fatty acids are synergistic and complementary in hyperlipidemic men and women. *Journal of Nutrition*, 138(6), 1086–1090.

Miles, J. M., Park, Y. S., & Walewicz, D. (2004). Systemic and forearm triglyceride metabolism: fate of lipoprotein lipase- generated glycerol and free fatty acids. *Diabetes*, 53, 521–527.

- Min, H. K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., Kellum, J., Warnick, R., Contos, M. J., & Sanyal, A. . (2012). Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.*, 15, 665–674.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Bito, Y., Shinkawa, H., Tsukioka, T., Nakahira, A., Suehiro, S., & Okada, S. (2008). Supplementation of α -tocopherol improves cardiovascular risk factors via the insulin signalling pathway and reduction of mitochondrial reactive oxygen species in type II diabetic rats. *Free Radical Research*, 42(3), 261–271.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social. (2018). 4ta edición de la ENFR. Departamento Nacional de Planeación
- Moreau, R. A. (2003). Plant sterols in functional foods. In *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals* (pp. 284-286). CRC Press.
- Moreau, R. A. (2011, May). An overview of functional lipids. In *Proceedings of the 102nd AOCS Annual Meeting and Exposition*.
- Moreira, E. A., & Baltanás, M. A. (2004). Recovery of Phytosterols from Sunflower Oil Deodorizer Distillates. *Journal of the American Chemical Society*, 81(2), 161–168.
- Moussavi, N., Gavino, V., & Receveur, O. (2008). Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity*, 16, 7–15.
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46–65.
- Nagao, K., & Yanagita, T. (2015). Functional lipids in metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61, S159–S161.
- Nakamura, A., & Terauchi, Y. (2013). Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 21240–21257.
- Nassir, F., Adewole, O. L., Brunt, E. M., & Abumrad, N. A. (2013). CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *J Lipid Res.*, 54(11), 2988–2997.

- Nassir, F., & Ibdah, J. (2014). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*, 15(5), 8713–8742.
- Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterology & Hepatology*, 11(3), 167–175.
- Naz, S., Kara, H., Sherazi, S. T. H., & Aljaboure, A. (2014). A green approach for the production of biodiesel from fatty acids of corn deodorizer distillate. *RSC Adv.*, 4, 48419–48425.
- Naz, S., Sherazi, S. T. H., & Talpur, F. N. (2011). Changes of total tocopherol and tocopherol species during sunflower oil processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 127–132.
- Naz, S., Sherazi, S. T. H., Talpur, F. N., Talpur, M. Y., & Kara, H. (2012). Determination of unsaponifiable constituents of deodorizer distillates by GC-MS. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 973–977.
- Nevzorova, Y. A., Boyer-Diaz, Z., Cubero, F. J., & Gracia-Sancho, J. (2020). Animal models for liver disease – A practical approach for translational research. *Journal of Hepatology*, 73(2), 423–440.
- Ntambi, J. M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 40(9), 1549-1558.
- Odena, G., & Bataller, R. (2012). Fibrogénesis hepática: fisiopatología. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(2), 3–9.
- Ogden, C., Carroll, M., Kit, B., & Flegal, K. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*, 311(8), 806–814.
- Olofsson, S. O., & Boren, J. (2005). Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med.*, 258, 395–410.
- Omagari, K., Kato, S., Tsuneyama, K., Inohara, C., Kuroda, Y., Tsukuda, H., Fukazawa, E., Shiraishi, K., & Mune, M. (2008). Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(12), 3206–3212.
- Oomah, B. D., & Mazza, G. (1998). Flaxseed products for disease prevention. *Functional foods: Biochemical and processing aspects*, 1, 91-138.

- Otway, S., & Robinson, D. S. (1967). The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *The Journal of physiology*, 190(2), 321-332.
- Pahrudin Arrozi, A., Shukri, S. N. S., Wan Ngah, W. Z., Mohd Yusof, Y. A., Ahmad Damanhuri, M. H., Jaafar, F., & Makpol, S. (2020). Comparative effects of alpha- and gamma- tocopherol on mitochondrial functions in alzheimer's disease in vitro model. *Scientific Reports*, 10(1), 8962.
- Pan, M., Liang, J. S., Fisher, E. A., & Ginsberg, H. N. (2002). The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis. *J Biol Chem.*, 277, 4413–4421.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., & Stanton, C. (2012). Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1–16.
- Pessayre, D., & Fromenty, B. (2005). NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology*, 42, 928–940.
- Plat, J., Baumgartner, S., & Mensink, R. P. (2015). Mechanisms Underlying the Health Benefits of Plant Sterol and Stanol Ester Consumption. *J. AOAC Int.*, 98(697–700).
- Ponziani, F., Pecere, S., Gasbarrini, A., & Ojetti, V. (2015). Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Gastroenterology & Hepatology*, 9(8), 1055–1067.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Diwan, V., & Brown, L. (2011). Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in Lipid Research*, 50(4), 372–387.
- Puri, P., Baillie, R. A., Wiest, M. M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M. J., & Sanyal, A. J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 46, 1081–1090.
- Radcliffe, J. D., Czajka-Narins, D. M., & Imrhan, V. (2004). Fatty acid composition of serum, adipose tissue, and liver in rats fed diets containing corn oil or cottonseed oil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(2), 73–77.

- Rafecas, I., Esteve, M., Fernandez-Lopez, J. A., Remesar, X., & Alemany, M. (1994). Whole-rat protein content estimation: applicability of the N x 6.25 factor. *Br. J. Nutr.*, 72, 199-209.
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The Glucose Fatty-Acid Cycle Its Role in Insulin Sensitivity and the Metabolic Disturbances of Diabetes Mellitus. *The Lancet*, 281(7285), 785–789.
- Rasmussen, L. D., Ekelund, F., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Johnsen, K. (2001). Group-specific PCR primers to amplify 24S α -subunit rRNA genes from Kinetoplastida (Protozoa) used in denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbial Ecology*, 42(2), 109–115.
- Rasmy, G. (2007). Protective effect of linseed oil on hyperlipidemia in experimental animals. *Jgeb*, 5(1), 9–17.
- Rawal, G., Yadav, S., & Nagayach, S. (2015). Phytosterols and the health. *Medico Research Chronicles*, 2(3), 441-444.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951.
- Rideout, T. C., Harding, S. V., & Jones, P. J. (2010). Consumption of plant sterols reduces plasma and hepatic triglycerides and modulates the expression of lipid regulatory genes and de novo lipogenesis in C57BL/6J mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(S1), S7-S13.
- Ríos-López, D. G., Aranda-López, Y., Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva, M. (2020). La plasticidad del hepatocito y su relevancia en la fisiología y la patología hepática. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23.
- Rokling-Andersen, M. H., Rustan, A. C., Wensaas, A. J., Kaalhus, O., Wergedahl, H., Røst, T. H., & Drevon, C. A. (2009). Marine n-3 fatty acids promote size reduction of visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar rats fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 102(7), 995–1006.
- Russo, G. L. (2009). Dietary N-6 and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids: From Biochemistry to Clinical Implications in Cardiovascular Prevention. *Biochem. Pharmacol.*, 77, 937–946.
- Sain, J. (2014). Ácidos grasos trans dietarios: interacción nutricional con las diferentes familias de ácidos grasos insaturados. FBCB-UNL.

- Sain, J., Gonzalez, M., Lavandera, J., Scalerandi, M., & Bernal, C. (2015). Trans fatty acid retention and conversion rates of fatty acids in tissues depend on dietary fat in mice. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117(8), 1146-1158.
- Sain, J., Scanarotti, I. G., Gerstner, C. D., Fariña, A. C., Lavandera, J. V., & Bernal, C. A. (2023). Enriched functional milk fat ameliorates glucose intolerance and triacylglycerol accumulation in skeletal muscle of rats fed high-fat diets. *European Journal of Nutrition*, 62(3), 1535–1550.
- Sampaio, K. A., Zyaykina, N., Wozniak, B., Tsukamoto, J., De Greyt, W., & Stevens, C. V. (2015). Enzymatic degumming: Degumming efficiency versus yield increase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117, 81–86.
- Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T., & Inoue, K. (1993). Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 17705–17710.
- Savard, C., Tartaglione, E. V., Kuver, R., Haigh, W. G., Farrell, G. C., Subramanian, S., Chait, A., Yeh, M. M., Quinn, L. S., & Ioannou, G. N. (2013). Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology*, 57, 81–92.
- Savory, W. (1863). Experiments on food; its destination and uses. *The Lancet*, 81(2066), 381–383.
- Scalerandi, M. V. (2013). Interacciones Biquímico-Nutricionales del c9,t11-CLA y de la mezcla c9,t11-CLA + t10,c12-CLA con aceites ricos en ácidos grasos insaturados de las series n-3, n-6 y n-9 en animales de experimentación.
- Schlaepfer, I. R., & Joshi, M. (2020). CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential. *Endocrinology*, 161(2), 46.
- Schwimmer, J. B., Behling, C., Newbury, R., Deutsch, R., Nievergelt, C., Schork, N. J., & Lavine, J. E. (2005). Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 42(3), 641–649.
- Segré, D., Ben-Eli, D., Deamer, D. W., & Lancet, D. (2001). The lipid world. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31, 119-145.

- Şekeroğlu, V., Aydın, B., Şekeroğlu, Z. A., & Kömpe, Y. Ö. (2018). Hepatoprotective effects of capsaicin and alpha-tocopherol on mitochondrial function in mice fed a high-fat diet. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 821-825.
- Shapiro, H., Tehilla, M., Attal-Singer, J., Bruck, R., Luzzatti, R., & Singer, P. (2011). The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Nutrition*, 30(1), 6–19.
- Sherazi, S. T. H., Mahesar, S. A., & Sirajuddin. (2016). Vegetable oil deodorizer distillate: A rich source of the natural bioactive components. *Journal of Oleo Science*, 65(12), 957–966.
- Siedel, J. (1983). Total cholesterol, end-point and kinetic method. *In Methods of enzymatic analysis*. 130–148.
- Simopoulos, A. P. (1999). Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 60(5–6), 421–429.
- Singh, K., Jhamb, S., & Kumar, R. (2012). Effect of pretreatments on performance of screw pressing for flaxseed. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 543–556.
- Singh, K., Mridula, D., Rehal, J., & Barnwal, P. (2011). Flaxseed: a potential source of food, feed and fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 210–222.
- Sjögren, P., Sierra-Johnson, J., Gertow, K., & Rosell, M. (2008). Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia*, 51, 328-335.
- Song, L., Qu, D., Zhang, Q., Jiang, J., Zhou, H., Jiang, R., Li, Y., Zhang, Y., & Yan, H. (2017). Phytosterol esters attenuate hepatic steatosis in rats with non-alcoholic fatty liver disease rats fed a high-fat diet. *Scientific Reports*, 7.
- Song, L., Zhao, X. G., Ouyang, P. L., Guan, Q., Yang, L., Peng, F., Du, H., Yin, F., Yan, W., Yu, W. J., & Al., E. (2020). Combined Effect of -3 Fatty Acids and Phytosterol Esters on Alleviating Hepatic Steatosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Subjects: A Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Br. J. Nutr.*, 123, 1148–1158.
- Song, L., Zhou, H., Yu, W., Ding, X., Yang, L., Wu, J., & Song, C. (2020). Effects of Phytosterol Ester on the Fatty Acid Profiles in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Medicinal Food*, 23(2), 161–172.

- Sookoian, S., Rosselli, M., & Gemma, C. (2010). Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α promoter. *Hepatology*, 52(6), 1992–2000.
- Stein, Y., & Stein, O. (2003). Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170(1), 1–9.
- Storlien, L. H., Baur, L. A., Kriketos, A. D., Pan, D. A., Cooney, G. J., Jenkins, A. B., & Campbell, L. V. (1996). Dietary fats and insulin action. *Diabetologia*, 39, 621–631.
- Stuchlík, M., & Zak, S. (2002). Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomedical papers-palacky university in olomouc*, 146(2), 3-10.
- Sundaram, M., & Yao, Z. (2010). Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutr Metab*, 7(1), 35–37.
- Svensson, A. M., Hellerström, C., & Jansson, L. (1996). Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat: a preferential increase in islet blood perfusion persists after withdrawal of the diet and normalization of body weight. *The Journal of Endocrinology*, 151(3), 507–511.
- Takahashi, M., Ikemoto, S., & Ezaki, O. (1999). Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose. *J Nutr Sci Vitaminol*, 45, 583–593.
- Takahashi, Y., & Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15539–15548.
- Tapia, G., Silva, D., Romero, N., Pettinelli, P., Dossi, C. G., de Miguel, M., & González-Mañán, D. (2018). Role of dietary α - and γ -tocopherol from *Rosa mosqueta* oil in the prevention of alterations induced by high-fat diet in a murine model. *Nutrition*, 53, 1–8.
- Tan, M. H., Sata, T., & Havel, R. J. (1977). The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscles. *Journal of Lipid Research*, 18(3), 363-370.
- Tarugi, P., Lonardo, A., & Ballarini, G. (1996). Fatty liver in heterozygous hypobetalipoproteinemia caused by a novel truncated form of apolipoprotein B. *Gastroenterology*, 111(4), 1125–1133.
- Teachey, M. K., Taylor, Z. C., Maier, T., Saengsirisuwan, V., Sloniger, J. A., Jacob, S., Klatt, M. J., Ptock, A., Kraemer, K., Hasselwander, O., & Henriksen, E. J. (2003). Interactions of conjugated

linoleic acid and lipoic acid on insulin action in the obese Zucker rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 52(9), 1167–1174.

Tep, S., Mihaila, R., & Freeman, A. (2012). Rescue of Mtp siRNA-induced hepatic steatosis by DGAT2 siRNA silencing. *J Lipid Res.*, 53(5), 859–867.

Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52, 1836–1846.

Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2017). Advances in Microencapsulation of Polyunsaturated Fatty Acids (Pufas)-rich Plant Oils Using Complex Coacervation: A Review. *Food Hydrocoll.*, 69, 369–381.

Traber, M., Burton, G., Hughes, L., Ingold, K., Hidaka, H., Malloy, M., Kane, J., Hyams, J., & Kayden, H. . (1992). Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.*, 33(8), 82.

Traber, M. G., Siddens, L. K., Leonard, S. W., Schock, B., Gohil, K., Krueger, S. K., Cross, C. E., & Williams, D. E. (2005). α -tocopherol modulates Cyp3a expression, increases γ -CEHC production, and limits tissue γ -tocopherol accumulation in mice fed high γ -tocopherol diets. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(6), 773–785.

Tschop, M., & Heiman, M. (2001). Rodent obesity models: an overview. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 109(6), 307-319.

Tsikas, D., Rothmann, S., Schneider, J. Y., Suchy, M. T., Trettin, A., Modun, D., Stuke, N., Maassen, N., & Frölich, J. C. (2016). Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 1. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1019, 95–111.

Turchini, G. M., Ng, W.-K., & Tocher, D. R. (2010). Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds. *CRC Press*.

Unwin, N., Shaw, J., Zimmet, P., & Alberti, K. G. M. M. (2002). Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: The current status on definition and intervention. *Diabetic Medicine*, 19(9), 708–723.

- Valenzuela, R., Espinosa, A., González-Mañán, D., D'Espessailles, A., Fernández, V., Videla, L. A., & Tapia, G. (2012). N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Significantly Reduces Liver Oxidative Stress in High Fat Induced Steatosis. *PLoS ONE*, 7(10), 1–8.
- Valenzuela, A., & Valenzuela, R. (2014). Acidos grasos omega-3 en la nutrición ¿cómo aportarlos? *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 205-211.
- Valenzuela, R., & Videla, L. A. (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 and Function*, 2(11), 644–648.
- Vamecq, J., Vallee, L., & de la Porte, P. L. (1993). Effect of various n-3/n-6 fatty acid ratio contents of high fat diets on rat liver and heart peroxisomal and mitochondrial β -oxidation. *Biochem Biophys Acta*, 1170, 151–156.
- van Zwol, W., van de Sluis, B., Ginsberg, H. N., & Kuivenhoven, J. A. (2024). VLDL Biogenesis and Secretion: it takes a village. *Circulation Research*, 134(2), 226-244.
- Vanni, E., Bugianesi, E., Kotronen, A., De Minicis, S., Yki-Järvinen, H., & Svegliati-Baroni, G. (2010). From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and Liver Disease*, 42(5), 320-330.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, ilip, Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, rank. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(711), 34–1.
- Verhe, R., Verleyen, T., V., van H., & De Greyt, W. (2006). Influence of refining of vegetable oils on minor components. *J. Oil Palm. Res.*, 18, 168–179.
- Vial, G., Dubouchaud, H., Couturier, K., Cottet-Rousselle, C., Taleux, N., & Athias, A. (2011). Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J. Hepatol.*, 54(2), 348-356.
- Vijaimohan, K., Jainu, M., Sabitha, K. E., Subramaniyam, S., Anandhan, C., & Shyamala Devi, C. S. (2006). Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sciences*, 79(5), 448–454.
- Wang, D. Q. H., Portincasa, P., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2013). Steatosis in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1493–1532.

- Wang, C., & Hegsted, D. (1949). Determination of blood and plasma volumes, thiocyanate space, and bromsulfalein clearance in rats. *Am. J. Physiol.*, 156, 227–232.
- Wang, M., Zhang, X. J., Feng, K., He, C., Li, P., Hu, Y. J., Su, H., & Wan, J. B. (2016). Dietary α -linolenic acid-rich flaxseed oil prevents against alcoholic hepatic steatosis via ameliorating lipid homeostasis at adipose tissue-liver axis in mice. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- Wardani, H., Ayu, R., Mahardian, A., Chrismawan, B., Segaran, S., Kamaruddin, N. S., & Khotib, J. (2019). Development of nonalcoholic fatty liver disease model by high-fat diet in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(6), 20190258.
- Warden, C., & Fisler, J. (2008). Comparisons of diets used in animal models of high fat feeding. *Cell Metab.*, 7(4), 277.
- Wechter, W. J., Kantoci, D., Murray Jr, E. D., D'Amico, D. C., Jung, M. E., & Wang, W. H. (1996). A new endogenous natriuretic factor: LLU- α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 6002-6007.
- Williamson, K. S., Gabbita, S. P., Mou, S., West, M., Pye, Q. N., Markesbery, W. R., & Hensley, K. (2002). The nitration product 5-nitro- γ -tocopherol is increased in the Alzheimer brain. *Nitric Oxide*, 6(2), 221–227.
- Windham, W. (1999). Animal feed. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 4.1-4.45.
- Winzell, M. S., & Ahren, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(3), 215-219.
- Wong, V. W. S., Adams, L. A., de Lédinghen, V., Wong, G. L. H., & Sookoian, S. (2018). Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(8), 461–478.
- Wouters, K., van Bilsen, M., van Gorp, P. J., Bieghs, V., Lutjohann, D., Kerksiek, A., Staels, B., Hofker, M. H., & Shiri-Sverdlov, R. (2010). Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett.*, 584, 1001–1005.
- Xu, J., Rong, S., Gao, H., Chen, C., Yang, W., Deng, Q., Huang, Q., Xiao, L., & Huang, F. (2017). A combination of flaxseed oil and astaxanthin improves hepatic lipid accumulation and reduces oxidative stress in high fat-diet fed rats. *Nutrients*, 9(3).

- Xu, Z. J., Fan, J. G., Ding, X. D., Qiao, L., & Wang, G. L. (2010). Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(4), 931–940.
- Yachi, R., Igarashi, O., & Kiyose, C. (2010). Protective effects of vitamin E analogs against carbon tetrachloride-induced fatty liver in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47(2), 148–154.
- Yang, J., Fernández-Galilea, M., Martínez-Fernández, L., González-Muniesa, P., Pérez-Chávez, A., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2019). Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: Effects of omega-3 fatty acid supplementation. *Nutrients*, 11(4), 1–37.
- Yang, L., Yang, C., Song, Z. X., Wan, M., Xia, H., Xu, D., Pan, D., Wang, S. K., Shu, G., & Sun, G. (2022). Effects of blended oils with different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios on high-fat diet-induced metabolic disorders and hepatic steatosis in rats. *Food Science and Technology*, 42, 1–10.
- Yang, H., Yan, F., Wu, D., Huo, M., Li, J., Cao, Y., & Jiang, Y. (2010). Recovery of phytosterols from waste residue of soy- bean oil deodorizer distillate. *Bioresour. Technol.*, 101, 1471–1476.
- Yaqoob, P., Sherrington, E. J., Jeffery, N. M., Sanderson, P., Harvey, D. J., Newsholme, E. A., & Calder, P. C. (1995). Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 27(3), 297–310.
- Yasari, S., Prud'homme, D., Wang, D., Jankowski, M., Levy, E., Gutkowska, J., & Lavoie, J. M. (2010). Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 335, 291–299.
- Yilmaz, Y. (2012). Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther*, 36, 815–823.
- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(1), 11–20.
- Yoshida, Y., & Niki, E. (2003). Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 49(4), 277–280.

- Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Iwaya, H., Fujii, N., Hori, S., Lee, D. G., & Ishizuka, S. (2019). Alteration of bile acid metabolism by a high-fat diet is associated with plasma transaminase activities and glucose intolerance in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 65(1), 45-51.
- Younossi, Z. M., Marchesini, G., Pinto-Cortez, H., & Petta, S. (2019). Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. *Transplantation*, 103(1), 22–27.
- Younossi, Z. M., Rinella, M. E., Sanyal, A. J., Harrison, S. A., Brunt, E. M., Goodman, Z., & Loomba, R. (2021). From NAFLD to MAFLD: implications of a premature change in terminology. *Hepatology*, 73(3), 1194-1198.
- Zeng, S., Wu, F., Chen, M., Li, Y., You, M., Zhang, Y., & Chen, Y. (2022). Inhibition of fatty acid translocase (FAT/CD36) palmitoylation enhances hepatic fatty acid β -oxidation by increasing its localization to mitochondria and interaction with long-chain acyl-CoA synthetase 1. *Antioxidants & Redox Signaling*, 36(16–18), 1081-1100.
- Zhang, M., Bai, X., Du, Q., Xu, J., Wang, D., Chen, L., & Yang, J. (2023). The Different Mechanisms of Lipid Accumulation in Hepatocytes Induced by Oleic Acid/Palmitic Acid and High-Fat Diet. *Molecules*, 28(18), 6714.
- Zhang, X., Xu, G. B., Zhou, D., & Al., E. (2018). High-fat diet modifies expression of hepatic cellular senescence gene p16(INK4a) through chromatin modifications in adult male rats. *Genes Nutr*, 13(1), 1–12.
- Zimmermann, R., Haemmerle, G., Wagner, E., Strauss, J., Kratky, D., & Zechner, R. (2003). Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J. Lipid Res.*, 44(11), 2089-2099.
- 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 Sciences*, 79(11), 1100–1107.