



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INGESTA DE
CHÍA (*Salvia hispanica* L.) EN UN MODELO
DE HIPERTRIGLICERIDEMIA Y ESTEATOSIS
HEPÁTICA AGUDO EN RATAS”**

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

LN. IVET GISELA LIRA ISLAS

Director de Tesis

DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

San Agustín Tlaxiaca Hgo., noviembre de 2016





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Health Sciences

Área Académica de Medicina

Department of Medicine

Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

3/noviembre/2016

AAM/MCBS/095/2016

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Lira Islas Ivet Gisela
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación del efecto de la ingesta de chía (*Salvia hispánica L.*) en un modelo de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática agudo en ratas", con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER
- PRIMER VOCAL DR. TOMAS EDUARDO FERNANDEZ MARTINEZ
- SECRETARIO DRA. RAQUEL CARIÑO CORTES
- SUPLENTE DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
- SUPLENTE DRA. GLORIA SOLANO SOLANO

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR



DRA. ARACELI ORTIZ POLO
COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. MANUEL SANCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Instituto de Ciencias de la Salud
Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuautla.
San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
mtria_bio_sal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción (CIBIOR), del Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa), UAEH, bajo la tutoría del Dr. en C. Tomás Eduardo Fernández Martínez.

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 552384.

AGRADECIMIENTOS

...¿Ves, Momo? A veces tienes ante ti una calle que te parece terriblemente larga que nunca podrás terminar de barrer. Entonces te empiezas a dar prisa, cada vez más prisa. Cada vez que levantas la vista, ves que la calle sigue igual de larga y te esfuerzas más aún, empiezas a tener miedo, al final te has quedado sin aliento. Y la calle sigue estando por delante. Así no se debe hacer. Nunca se ha de pensar en toda la calle de una vez, ¿entiendes? Hay que pensar en el paso siguiente, en la inspiración siguiente, en la siguiente barrida. Entonces es divertido: eso es importante, porque entonces se hace bien la tarea. Y así ha de ser. De repente, se da uno cuenta de que, paso a paso, se ha barrido toda la calle. Uno no se da cuenta de cómo ha sido, y no se queda sin aliento...

Momo. Michael Ende.

Dr. Eduardo, en primer lugar le quiero agradecer todos los regalos que me ha dado: paciencia, respeto, tiempo, apoyo económico para el proyecto e impresión de tesis y conocimientos. Agradezco la confianza que depositó en mí desde que le pedí que me guiara; me ayudó a defender este proyecto. Como no llegar a la meta, si me dio todas las herramientas, me enseñó a desarrollar paso por paso esta investigación y cuando creí que no podría concluir, usted me alentó, me llenó de confianza, y me recordó que, solo era un paso más para llegar al final de esta meta. Me mostró que el trabajo constante, entusiasta y en una red de colaboración, siempre es mejor y sabe mejor. Es un gran ejemplo de humildad, lealtad, nobleza y siempre contagia la gran pasión que tiene por la ciencia, motores que lo impulsan a siempre dar una mano amiga.

Mi especial agradecimiento a **Alicia**, por compartir sus conocimientos, por enseñarme el camino, pero sobre todo, por cada viernes que estuviste ahí, haciéndolos más ligeros, sin ti no hubiera avanzado. Gracias por tu amistad.

Dr. Héctor Antonio Ponce Monter, Dr. Gabriel Betanzos Cabrera y Dra. Raquel Cariño Cortés, por su tiempo y sus enseñanzas. **Dr. Ernesto Alanís García**, por su amistad y apoyo en el análisis químico de la dieta chía utilizada en este proyecto. **Dr.**

Héctor Hernández Domínguez, que en mi etapa inicial en la maestría, me ayudó y enseñó con paciencia, como es el cuidado y uso de animales de laboratorio en el Bioterio de ICSa.

A **mis papás y hermanos Yuri, Armando y Roberto**, que son un motor importante en mi vida, siempre presentes, siempre alentándome y siempre para mí. Los amo profundamente.

A mi amor y compañero de vida, **Daniel**, que estuvo conmigo muchas noches entre cafés, libros, artículos científicos, escritos, hojas, música y cuando estuve a punto de dejar a medias todo, me impulsó y motivó a terminar. Te amo por siempre.

Para todas aquellas personas que creen en mí, que me han regalado una palabra de aliento, una palabra motivante y que han estado en espera de ver esta etapa finalizada, gracias por estar, amigos y tías.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	
ABSTRACT	
I MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Esteatosis hepática (hígado graso).....	1
1.1.1 Prevalencia de EHGNA.....	4
1.1.2 Patogenia.....	4
1.1.3 Factores de riesgo y condiciones asociadas.	8
1.2 Hipertrigliceridemia.....	8
1.2.1 Clasificación.....	9
1.2.2 Prevalencia.....	10
1.2.3 Patogenia.....	10
1.3 Asociación de la HTG con EHGNA	11
1.3.1 Marcadores de daño y diagnóstico en EHGNA e HTG.....	12
1.3.2 Modelos experimentales de daño hepático y de dislipidemias.....	15
1.3.3 Tratamientos de la HTG y de la EHGNA	17
1.4 Alternativas en el tratamiento de EHGNA e HTG.....	21
II ANTECEDENTES	23
2.1 Chía (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	23
2.1.1 Origen y antecedentes históricos.....	23
2.1.2 Características botánicas	23
2.1.3 Composición nutricional	24
2.1.4 Uso medicinal de chía y evidencia científica del uso de la semilla en esteatosis hepática e hipertrigliceridemia	29
III JUSTIFICACIÓN.....	32
IV HIPÓTESIS.....	33
V OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo general	33

5.2 Objetivos específicos.....	33
VI MATERIAL Y MÉTODOS	34
6.1 Diseño de estudio	34
6.2 Material vegetal	34
6.3 Grupos experimentales y dietas	34
6.4 Mediciones	36
6.4.1 Registro de masa corporal	36
6.4.2 Determinación de parámetros bioquímicos en plasma y en hígado	36
6.5 Análisis estadístico	42
VII RESULTADOS.....	43
7.1 Análisis de composición química de dieta chíá.....	43
7.2 Masa corporal y masa hepática.....	43
7.3 Determinación de parámetros bioquímicos en plasma y en hígado	44
7.3.1 Actividad de fosfatasa alcalina	44
7.3.2 Actividad de gamma glutamil-transpeptidasa.....	45
7.3.3 Bilirrubinas totales	46
7.3.4 Actividad de alanina–aminotransferasa.....	47
7.3.5 Grado de peroxidación lipídica.....	47
7.3.6 Catalasa.....	48
7.3.7 Glucógeno hepático	49
7.3.8 Glucosa.....	50
7.3.9 Triglicéridos	50
7.3.10 Colesterol total	51
7.3.11 TNF- α plasmático y hepático	52
7.4 Resumen de pruebas bioquímicas en plasma e hígado.....	54
7.5 Histologías	55
VIII DISCUSIÓN.....	57
IX CONCLUSIONES	66
X BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de esteatosis hepática a cirrosis.....	2
Figura 2. Historia natural de la EHGNA.....	3
Figura 3. Factores incluidos dentro del primer y segundo golpe en el desarrollo de EHGNA.....	5
Figura 4. Esquema de la patogenia de la EHGNA.....	5
Figura 5. Alteraciones metabólicas secundarias a la RI que conducen al acúmulo de TG en el hígado.....	6
Figura 6. Efecto de la peroxidación lipídica y las citocinas proinflamatorias en el desarrollo de EHGNA.....	7
Figura 7. Relación entre hiperinsulinemia, insulinoresistencia, actividad lipoproteinlipasa y concentraciones de triglicéridos plasmáticos.....	11
Figura 8. Plántulas e inflorescencias de <i>Salvia hispanica</i> L.	24
Figura 9. Semillas de chía (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	24
Figura 10. Ácidos grasos poliinsaturados en la chía: ALA (ω -3) y AL (ω -6).	27
Figura 11. Semilla entera hidratada rodeada por una cápsula de mucílago.....	28
Figura 12. Flavonoides y ácidos fenólicos en la chía.....	29
Figura 13. Chía molida.....	34
Figura 14. Curva de masa durante 4 semanas con dieta estándar o control (DE), dieta estándar + semilla de chía (DC).....	44
Figura 15. Actividad de fosfatasa alcalina (μ mol/L.min).....	45
Figura 16. Actividad de gamma glutamil-transpeptidasa (μ mol/L.min).....	46
Figura 17. Actividad de bilirrubinas totales (mg/dL).....	46
Figura 18. Actividad de alanina-aminotransferasa (μ mol/L.min).....	47
Figura 19. Grado de lipoperoxidación (nmolMDA/mgprot).....	48
Figura 20. Actividad de catalasa ($kx10^2$ /min).....	49
Figura 21. Cantidad de glucógeno (glucógeno/100 g de hígado).....	49
Figura 22. Concentraciones de glucosa (mg/dL).....	50
Figura 23. Concentraciones de triglicéridos (mg/dL).....	51
Figura 24. Concentraciones de colesterol total (mg/dL).....	52
Figura 25. A) Concentraciones de TNF- α plasmático (pg/mL) y B) TNF- α hepático (pg/mg).....	53
Figura 26. Panel de fotografías de los resultados histológicos de tejido hepático representativo de los grupos experimentales.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo y condiciones asociadas en la EHGNA	8
Tabla 2. Clasificación de las dislipidemias según fenotipo y etiopatogenia.	9
Tabla 3. Clasificación de los triglicéridos plasmáticos, comparados con los antiguos criterios del ATP II con el ATP III.....	9
Tabla 4. Marcadores de daño hepático en plasma e hígado.	12
Tabla 5. Estudios para el diagnóstico de EHGNA.	15
Tabla 6. Fármacos utilizados en EHGNA.	19
Tabla 7. Composición nutrimental de la chía.	25
Tabla 8. Contenido de aminoácidos correspondientes a hidrolizados de proteínas de semillas de chía.....	25
Tabla 9. Ensayos clínicos en humanos con semilla de chía.	30
Tabla 10. Ingredientes de dieta chía y de dieta estándar	35
Tabla 11. Análisis bromatológico de dieta chía (% en 100 g) y de dieta estándar.....	43
Tabla 12. Masa corporal (g) por semana.	43
Tabla 13. Masa hepática (g) al final de la investigación.	44
Tabla 14. Resultados de marcadores de daño hepático y dislipidemia de los 8 grupos experimentales.....	54

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico	HMG-CoA: hidroximetilglutaril coenzima A reductasa
ACC: acetil CoA carboxilasa deshidrogenasa	HTG: hipertrigliceridemia
Acetil-CoA: acetil-coenzima A	IKK- β : cinasa β del inhibidor κ B
ACL: acetil citrato liasa	IL-1: interleucina 1
ACOX1: acil-coenzima A oxidasa 1	IL-6: interleucina 6
AG: ácidos grasos	IL-10: interleucina 10
AGL: ácidos grasos libres	IRS: sustrato del receptor de insulina
AGNE: ácidos grasos no esterificados	LCE: elongasa de ácidos grasos de cadena larga
AGPI: ácidos grasos poliinsaturados	LOX: lipooxigenasas
AL: ácido α -linoleico (ω -6: omega 6)	LP: peroxidación lipídica
ALA: ácido α -linolénico (ω -3: omega 3)	LPL: lipoproteína lipasa
ALT: alanina aminotransferasa	LTs: leucotrienos
Apo B: apolipoproteína B	LXR: receptor X del hígado
ARNm: ARN mensajero	MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1
AST: aspartato aminotransferasa	MDA: malonaldehído
ATP: adenosin trifosfato	NF- κ B: factor nuclear κ B
CAT I: carnitina aciltransferasa I	PFH: pruebas de función hepática
CAT: catalasa	PGs: protanglandinas
c-HDL: lipoproteína de alta densidad	PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas
ChREBP- proteínas de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono	RI: resistencia a la insulina
c-LDL: lipoproteína de baja densidad	RLO: radicales libres de oxígeno
COX-2: ciclooxigenasa-2	SAG o FAS sintasa de ácidos grasos o por sus siglas en inglés
CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-1	SCD-1: esteroil-CoA desaturasa 1
CPT-1: carnitina plamitoil-1	SOCS: proteínas supresoras de la señalización de citocinas.
CT: colesterol total	SREBP: proteína de unión al elemento regulador del esteroles
DC: dieta chía	TC: tetracloruro de carbono
DE: dieta estándar	TG: triglicéridos
DHA: ácido docosahexaenoico	TGF- β : factor de crecimiento transformante-beta
DM-2: diabetes tipo 2	TI: tiloxapol
EH: estatois hepática	TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa
EHA: enfermedad del hígado graso alcohólico	VLDL: lipoproteína de muy baja densidad
EHGNA o NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico o por sus siglas en inglés	
EHNA o NASH : esteatohepatitis no alcohólica o por sus siglas en inglés	
EPA: ácido eicosapentaenoico	
ERO o ROS: especies reactivas del oxígeno o por sus siglas en inglés	
FA: fosfatasa alcalina	
FAS: sintasa de ácidos grasos	
G6P-DH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	
GGTP: gamma glutamil-transpeptidasa	
GLUT: transportadora de glucosa	
HME: 4-hidroxinoneanal	

RESUMEN

En el estudio presente se evaluó el efecto de la ingesta de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre el daño hepático e hipertrigliceridemia (HTG) producidos por tetracloruro de carbono (CCl_4 o TC) y/o el tilioxapol (TI), en rata Wistar. Se utilizaron 64 ratas, éstas fueron divididas en 8 grupos, se asignó un grupo control el cual consumió una dieta estándar (DE) para roedor, un grupo que consumió chía y no recibió ningún daño, 2 grupos dañados con TI (única dosis 400 mg/kg de masa en solución salina isotónica al 0.85% por vía intraperitoneal), 2 grupos dañados con TC (única dosis de 2.5 mL/kg de masa en aceite mineral 1:1, v/v por vía oral), y 2 más dañados con TI+TC; de cada pareja de grupo con daño, un grupo era el reto que había consumido chía en mezcla con la dieta estándar al 15% (DC) por 4 semanas para observar el efecto vs. solo la dieta estándar (DE).

Los efectos hipolipemiantes de la chía se evaluaron con los marcadores de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG), así mismo se evaluaron los efectos hepatoprotectores con los marcadores enzimáticos de colestasis: fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamyl transpeptidasa, así como concentración de bilirrubinas totales (BT); de daño hepático y función: alanina aminotransferasa (ALT) y glucógeno; estrés oxidativo: catalasa (CAT) y lipoperoxidación (LP), y marcadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), hepático y plasmático. La hepatotoxicidad e hiperlipidemia producida por los agentes tóxicos fue evidente en los grupos dañados que consumieron una dieta estándar (DE), pues los niveles de lípidos, marcadores de colestasis, daño hepático y función, estrés oxidativo e inflamación aumentaron significativamente. En el caso de los grupos que consumieron una dieta con chía (DC), se observa que en algunos marcadores de daño hepático e inflamación disminuyeron y, por el contrario, CAT y glucógeno se mantuvieron normales o no decayeron con el daño ($p < 0.05$) y los marcadores de hiperlipidemia disminuyeron entre un 36% y 52%; estos efectos hipolipemiantes y hepatoprotectores se pueden atribuir a que la chía contiene altas cantidades de ácido α -linolénico (ALA; ω -3), presente en numerosos vegetales, siendo la chía una de las fuentes botánicas más ricas en ω -3 que se conoce (hasta 62%, del total de lípidos presentes en la semilla) y el cual es precursor de los ácidos grasos ω -3 de cadena larga, el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (presentes en el aceite de pescado), este ácido graso

poliinsaturado tiene un efecto antiinflamatorio al inhibir algunas citocinas, ejerce un efecto sobre la expresión génica de factores de transcripción involucrados en el transporte y oxidación de ácidos grasos y modifican la fluidez y el espesor de la membrana que, colectivamente, actúan reduciendo la dislipidemia, mejorando la sensibilidad insulínica y por lo tanto desordenes metabólicos. Otros compuestos importantes de la chía son los compuestos fenólicos (ácido cafeico) y flavonoides (quercetina, kaempferol y miricetina) los cuales también tienen propiedades hepatoprotectoras, ya que inhiben la lipoperoxidación; también, se ha visto que la ingesta de mucílago de chía, tiene influencia en el metabolismo de lípidos, mediante la disminución de la absorción intestinal de ácidos grasos, colesterol y el arrastre de sales biliares. Además, otro constituyente bioactivo de la chía es la fibra dietética soluble, pues origina geles de alta viscosidad que producen enlentecimiento del vaciado gástrico y brinda sensación de saciedad. Los resultados presentados en esta investigación revelan que, la chía, puede funcionar como un alimento hepatoprotector e hipolipemiante, por lo tanto, se recomienda seguir realizando estudios sobre sus mecanismos de acción.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the chia intake (*Salvia hispanica* L.) on the liver damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄ or TC) or on hypertriglyceridemia (HTG) induced by tyloxapol (TI), or on the mixed damage (TC + TI), in Wistar male rats. Eight groups of rats (n = 8 each) were used, a normal control group fed with standard diet (DE) for rodent, a control group fed with chia diet (chia 15% mixed with DE, DC) but without any insult, two dyslipidemic groups using TI (a single 400 mg/kg dose dissolved in isotonic saline, i.p.), two liver damaged groups using TC (a single dose 2.5 mL/kg dissolved in mineral oil 1:1, V/V, p.o.), and two groups with mixed damage (TI+TC). One group of each pair of damaged groups was named the challenge group, because this one was fed with DC; hence, the intake of DC for challenge groups was for four weeks to compare to regular DE intake.

Hypolipidemic effects were assessed by quantifying the plasma total cholesterol (CT) and triglycerides (TG), besides the glucose level; in addition, liver damage markers were evaluated, such as the enzymatic activity of alkaline phosphatase (FA) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP), besides the total bilirubins (BT) as cholestasis markers. Also, the enzymatic activity of alanine-aminotransferase (ALT) as necrosis indicator and the amount of hepatic glycogen as function and stress marker were determined. The oxidative stress was estimated by the enzymatic activity of catalase (CAT) and the lipid peroxidation degree (LP), as well as the plasma and liver tumor necrosis factor- α (TNF- α) was quantified by ELISA as an inflammation indicator.

TC and/or TI caused evident hepatotoxic and/or hyperlipidemic effects in experimental groups just fed with DE, because the levels of lipids in plasma and markers of cholestasis, necrosis, oxidative stress and inflammation were augmented significantly. However, the DC intake prevented the elevation of most liver injury markers ($p < 0.05$) and, conversely, kept normal or without a decrease the CAT activity and the glycogen amount in challenge groups; moreover, plasma lipids were diminished in a range from 36% to 52% due to DC intake, although glucose levels remained without change despite the treatment.

Hypolipidemic and hepatoprotective effects of chia may be strongly related to its high content of α -linolenic acid (ALA; ω -3), that is present in diverse vegetables; in fact, chia

seed is recognized as one of the most ω -3-rich sources (62% content of total lipids) in plants. ALA is a precursor of long chain ω -3 fatty acids, docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), both are present in fish oil; besides, this polyunsaturated acid has been shown to possess antiinflammatory effects by inhibiting proinflammatory cytokines, downregulates the genetic expression of transcription factors involved in transport and oxidation of fatty acids, and modifies fluidity and thickness of cell membranes, all these effects may collectively reduce the dyslipidemia, improve the sensitivity to insulin and, therefore, ameliorate diverse metabolic disorders. Chia also contains other important secondary metabolites, such as phenolic compounds (caffeic acid) and flavonoids (quercetin, kaempferol and myricetin), which have hepatoprotective and antiinflammatory effects by reducing lipid peroxidation; additionally, the chia seed mucilage intake has improved the lipid metabolism via the intestinal decreased absorption of fatty acids and cholesterol as well as the enhanced withdrawal of bile acids. Soluble dietary fiber is another bioactive component in chia seeds, because this can produce high viscosity gels which provoke a slower gastric emptying and the feeling of satiety. Finally, the results herein presented suggest that chia may be used as a hepatoprotective and hypolipidemic food; therefore, further studies are required on its molecular mechanisms of action.

I MARCO TEÓRICO

Son tantas las funciones del hígado que en términos de sofisticación biológica sólo es ligeramente excedido por el cerebro (Otero y Sierra, 2003). Juega un papel central en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas, en la detoxificación, secreción de bilis, procesos inmunitarios, y su objetivo principal es regular el suministro de sustancias a la circulación sistémica e intestinos (Agnel y Soba, 2011; Otero y Sierra, 2003).

El hígado puede verse afectado por etiologías muy diversas, dentro de las cuales las principales incluyen causas infecciosas, metabólicas, tóxicas, neoplásicas y biliares. Las etiologías que afectan al hígado hasta la insuficiencia se pueden clasificar en función del tiempo en que progresa la enfermedad, de modo que se debe identificar entre la insuficiencia hepática aguda y la crónica. Las causas principales que llevan al hígado a la insuficiencia aguda causan necrosis hepática masiva, e incluyen infecciones virales fulminantes como las que pueden ocurrir en el marco de infecciones por virus de hepatitis (A, B, C, D y E), o intoxicación hepática por fármacos como acetaminofén, isoniazida, rifampicina, inhibidores de la monoaminoxidasa, etc. Por otra parte, las principales enfermedades que tienden a la cronicidad y que eventualmente conllevan a cirrosis e insuficiencia hepática incluyen hepatopatía alcohólica, hepatitis vírica y esteatohepatitis no alcohólica (Agnel y Soba, 2011).

1.1 Esteatosis hepática (hígado graso)

La esteatosis hepática (EH), también llamada comúnmente como hígado graso, se presenta en la enfermedad hepática alcohólica (EHA, o AFLD por sus siglas en inglés) y progresa a través de varios estadios de daño tisular y disfunción hepática. El consumo prolongado de alcohol puede conducir a un espectro de anormalidades hepáticas que van desde asintomáticas, caracterizada únicamente por hígado graso, hígado graso acompañado de inflamación (esteatohepatitis), formación cicatrizal del tejido (fibrosis), destrucción de arquitectura normal del hígado (cirrosis) e inclusive cáncer hepático, ver Figura 1. Se considera que el alcohol funciona como una hepatotóxina, al desarrollar enfermedad hepática dependiendo del balance del hospedero con factores como el género, polimorfismos de enzimas metabolizadoras de alcohol, factores inmunitarios, exposición a otras sustancias o fármacos, infecciones virales, obesidad, entre otras. Los hallazgos

histológicos pueden ir desde el almacenamiento de grasa en los hepatocitos hasta esteatohepatitis grave con grasa macrovesicular, necrosis de los hepatocitos y una infiltración prominente por neutrófilos junto con los cuerpos de Mallory formados a partir de mitocondrias dañadas. Se considera a la generación de estrés oxidativo como el eje central de la fisiopatología, junto con una endotoxemia dada por el incremento en la permeabilidad intestinal. Las células de Kupffer se encuentran activadas por la liberación de citocinas proinflamatorias y liberan factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lo que condiciona el infiltrado por neutrófilos como parte de la necroinflamación y activación macrofágica (Vázquez et al., 2013).

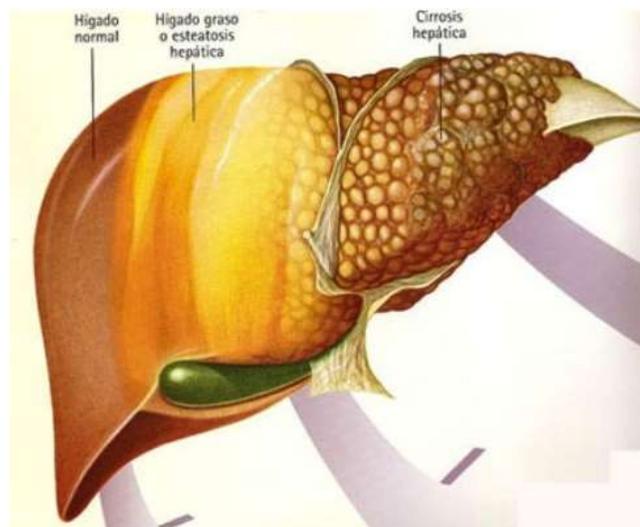


Figura 1. Evolución de esteatosis hepática a cirrosis (Planas y Salmerón , 2007).

La **enfermedad por hígado graso no alcohólico** (EHGNA, o NAFLD por sus siglas en inglés) (Álvarez-Martínez et al., 2004; Buque et al., 2008; Rivero et al., 2012) ocurre en paciente con datos de EH pero con nula o muy baja ingesta de alcohol (Chávez et al., 2006). Es hoy considerada la forma más común de enfermedad hepática crónica, que afecta a una gran proporción de la población en todo el mundo. Abarca un espectro amplio de daño hepático, que va desde esteatosis simple o acumulación intracelular de triglicéridos (TG), a la inflamación (esteatohepatitis, EHNA, o NASH por sus siglas en inglés) término acuñado en 1980 por Ludwig, fibrosis avanzada y cirrosis, es una entidad caracterizada por hallazgos clínicos, bioquímicos e histológicos esencialmente idénticos a los de la esteatohepatitis inducida por alcohol (Baran y Akyüz, 2014; Carrillo y Muciño, 2011; Pettinelli et al., 2011). Se cree que hasta el 90% de los casos de alteración de las funciones

hepáticas sin causa identificable son causados por EHGNA, se sabe que en general la resistencia a la insulina (RI) se encuentra implicada en su patogénesis. La EHGNA se define como la acumulación de grasa que excede en 5 a 10% el peso (Vergani, 2014), aunque en la práctica se estima con base en el porcentaje de los hepatocitos que se observan llenos de grasa bajo el microscopio. Aunque se considera que sólo el 5% aproximado de los pacientes con esteatosis hepática grave desarrollarán a lo largo del tiempo fibrosis o cirrosis, la prevalencia de las personas con sobrepeso/obesidad, convierte al hígado graso no alcohólico en una nueva epidemia de cirrosis, ver Figura 2 (Vázquez et al., 2013).

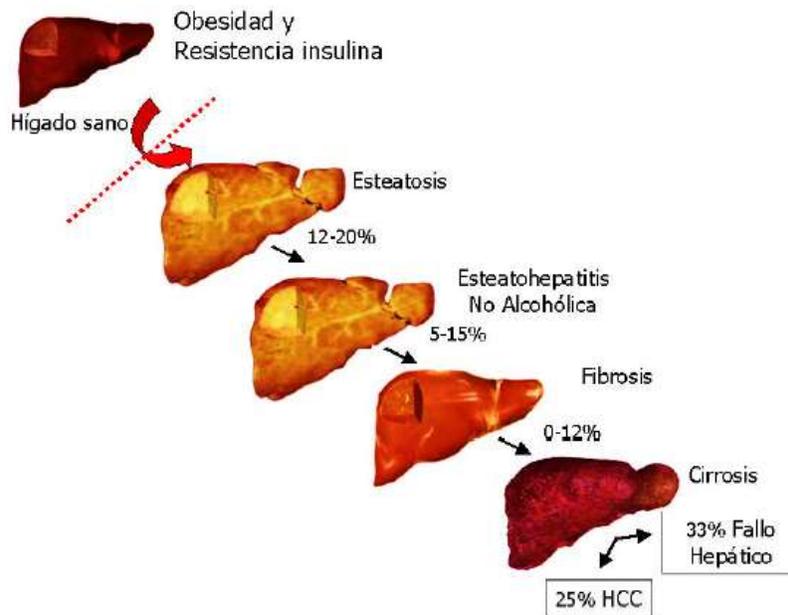


Figura 2. Historia natural de la EHGNA (Pérez, 2009).

Clínicamente, las entidades propias del hígado graso tienden a ser asintomáticas, con algunos pacientes experimentando dolor en hipocondrio, esplenomegalia y malestar general leve. Lo anterior es preocupante especialmente en el caso de la esteatohepatitis no alcohólica ya que las casi nulas manifestaciones clínicas dificultan el diagnóstico de una enfermedad que puede progresar a cirrosis. La EHGNA es emergente como una de las enfermedades más comunes del hígado, lo que lleva al creciente interés de nuevos enfoques terapéuticos para su tratamiento; depende principalmente de una dieta hipercalórica y/o desequilibrada que conduce al sobrepeso y a la obesidad, es una patología asociada con la sobre acumulación de TG en el hígado y representa el más común de todos los trastornos

hepáticos, EHGNA se considera ahora la manifestación hepática del síndrome metabólico, con resistencia a la insulina como su sello distintivo (Vergani, 2014).

1.1.1 Prevalencia de EHGNA

La EHGNA es el trastorno hepático más común en países desarrollados, llegando a afectar del 20 al 40% de la población en general, aumentando la prevalencia entre un 57.5 a 74 % en personas obesas (Ugaz-Soto et al., 2012) o con diabetes del 70-86% (Chávez et al., 2006). En la población de niños con peso saludable, la prevalencia se encuentra alrededor del 2.6% y, en niños obesos de, 22.5 a 52.8% (Ugaz-Soto et al., 2012). La prevalencia estimada de EHNA es mucho menor, y varía de 3% a 5%. La enfermedad es asintomática y es a menudo descubierta por las investigaciones de laboratorio de rutina que muestran transaminasas elevadas (Baran et al., 2014). Entre los factores de riesgo que se asocian con mayor frecuencia a EHGNA se encuentran la obesidad, la diabetes tipo 2 y la dislipidemia. La EHGNA presenta una variedad amplia de trastornos histológicos y clínicos, los cuales comprenden desde la esteatosis hepática no alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica hasta fibrosis severa del tejido hepático y cirrosis hepática. A nivel latinoamericano no se han registrado estudios sobre la prevalencia de EHGNA, a pesar de que se conoce que la dieta es altamente rica en hidratos de carbono y grasas saturadas, lo que conllevaría al desarrollo de obesidad y alteraciones en el metabolismo lipídico hepático (Ugaz-Soto et al., 2012).

1.1.2 Patogenia

Los mecanismos implicados en la acumulación de TG a nivel hepático y subsecuente daño hepatocelular son de carácter multifactorial y no se conocen completamente (Álvarez-Martínez et al., 2004; Pettinelli et al., 2011), la teoría del doble impacto o “hit” (ver Figura 3 y 4) es la más aceptada entre la comunidad científica para explicar la individualidad en la respuesta y cómo, según avanza la enfermedad, se potencia la predisposición del individuo a una progresión de EHGNA (Buque et al., 2008; Sakaguchi et al., 2011). Esta teoría propuesta por Day y James en 1998, postula que un primer impacto provoca acumulación de grasa en el hígado y esta situación hace al hepatocito más sensible a que un segundo impacto desarrolle una respuesta inflamatoria conducente a esteatohepatitis (Buque et al., 2008).

El primer impacto está dado por la RI que puede estar vinculada a la obesidad y/o a factores genéticos predisponentes, facilitados por ciertas condiciones ambientales. El tejido adiposo es una fuente importante de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), el cual regula la sensibilidad a la insulina, suprime la expresión de proteínas que regulan la captación de ácidos grasos libres y la lipogénesis, conduciendo a niveles elevados de ácidos grasos libres (Álvarez-Martínez et al., 2004; Carrillo y Muciño, 2011).

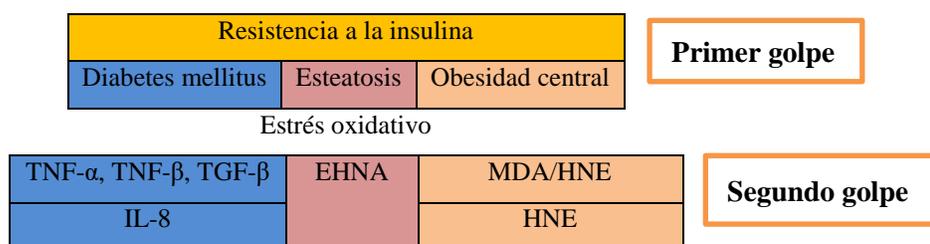


Figura 3. Factores incluidos dentro del primer y segundo golpe en el desarrollo de EHGNA, según el modelo propuesto por Day y James. HNE: 4-hidroxinonenal; MDA: malonilaldehído (Carrillo y Muciño, 2011).

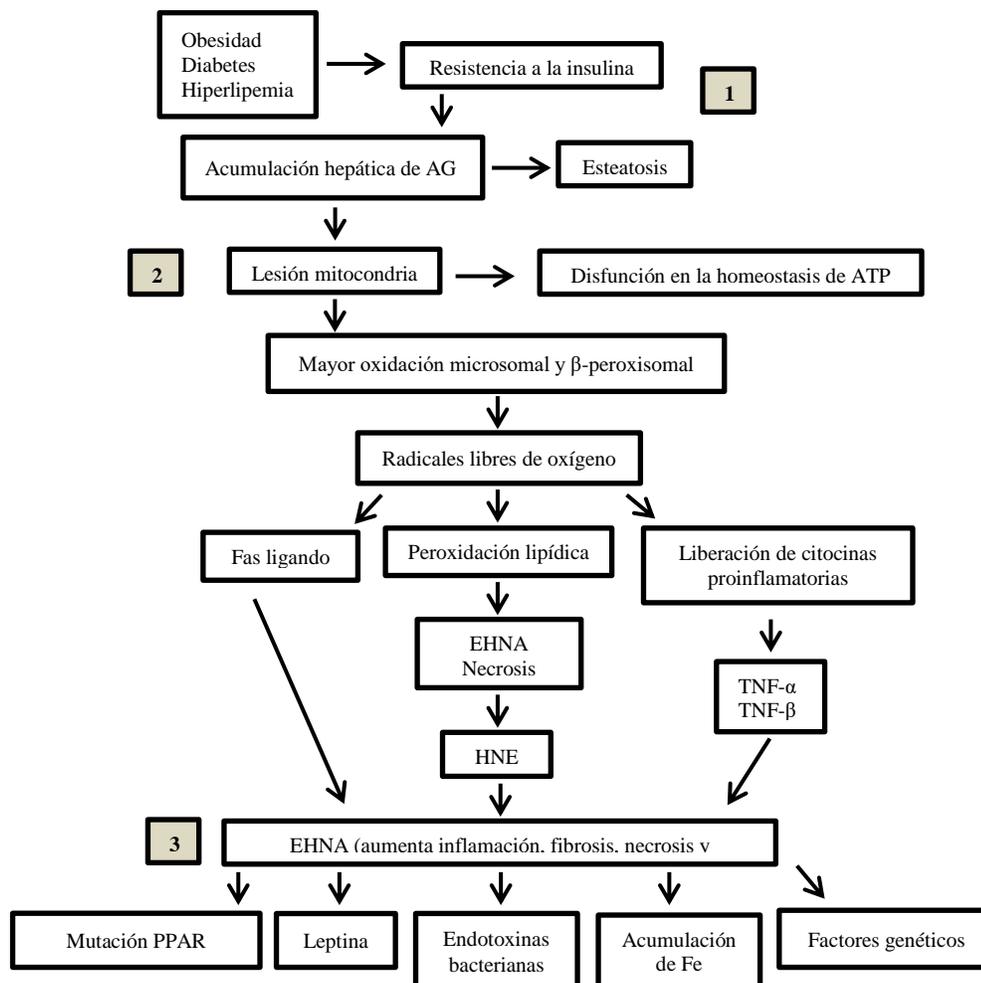


Figura 4. Esquema de la patogenia de la EHGNA. Primer impacto (1): como consecuencia de la RI asociada a diabetes mellitus (DM), obesidad e hiperlipemia se produce acúmulo de ácidos grasos (AG) en el hígado e

incremento de la β -oxidación, alteración en la homeostasis de ATP, lesión mitocondrial y aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO); todo ello da lugar al estrés oxidativo y con ello al segundo impacto (2): las consecuencias del estrés oxidativo sobre las células son múltiples, determinan la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, la degeneración y necrosis de las células, la muerte de estas por apoptosis, la expresión de citocinas proinflamatorias y la activación de las células estrelladas del hígado que dan lugar a la fibrogénesis. Otros factores (3) entre los que se encuentran la mutación de los PPAR (receptor activado por el proliferador de peroxisomas), la leptina, las endotoxinas bacterianas procedentes del intestino, acumulación de Fe y factores genéticos también participan en la lesión hepática. ATP (adenosín trifosfato) (Ayala et al., 2008).

Así mismo, la hiperinsulinemia y el aumento de la producción hepática de glucosa, que se producen como consecuencia de la RI, inducen la expresión de las proteínas de unión a elementos regulador de esteroides (SREBP-1c) (ver Figura 5) y de las proteínas de unión a elementos de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP), respectivamente, que a su vez activan la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis hepática (*de novo*) de AG a partir del exceso de hidratos de carbono. Por otro lado, la SREBP-1c inhibe la transcripción del sustrato del receptor de la insulina-2, lo que induce o exacerba la RI a nivel hepático (Miquilena y García, 2010). La activación incontrolada de SREBP-1c en el hígado puede causar EH, HTG y RI debido a la supresión directa de vías de señalización de la insulina, precipitando el desarrollo del síndrome metabólico (Carrillo y Muciño, 2011; Gusdon et al., 2014; Shimano, 2007).

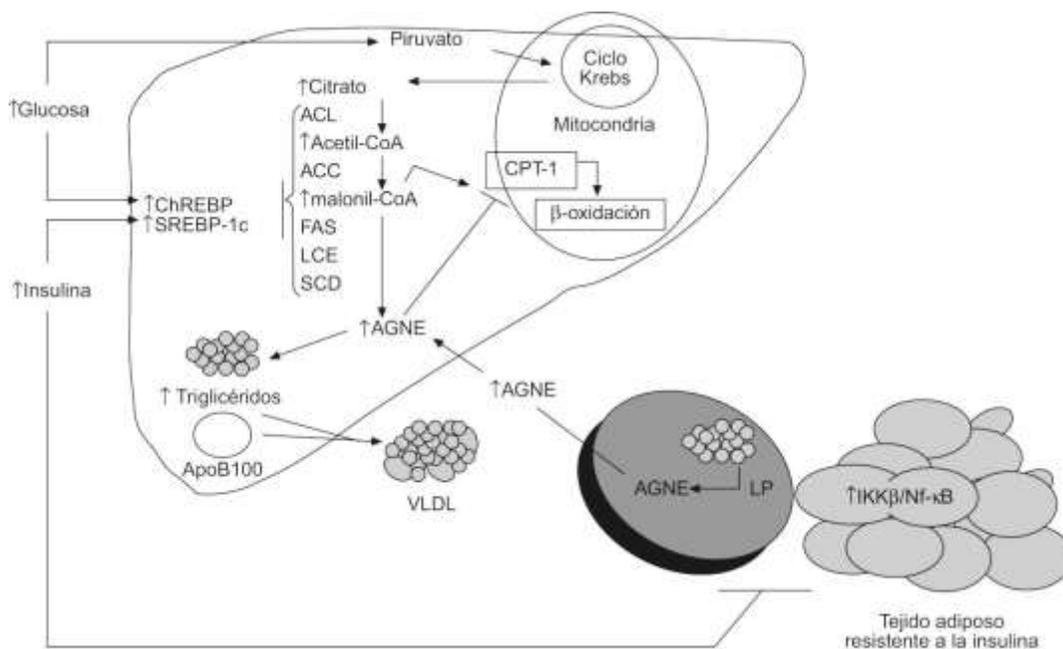


Figura 5. Alteraciones metabólicas secundarias a la RI que conducen al acúmulo de TG en el hígado. La inducción de la lipogénesis *de novo*, mediada por la insulina y la glucosa, la inhibición de la β -oxidación mitocondrial por los AGNE y por la malonil-CoA así como el aumento de la captación de AGNE circulantes

contribuyen a la EH. ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACL: ATP citrato liasa; AGNE: ácidos grasos no esterificados; ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono; CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-1; FAS: sintasa de ácidos grasos; IKK- β : cinasa β del inhibidor κ B; LCE: elongasa de ácidos grasos de cadena larga; LP: lipasa insulinosensible; NF- κ B: factor nuclear κ B; SCD: esteroil-CoA desaturasa; SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esterole; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. \rightarrow : vía estimuladora; \vdash : vía inhibitoria (Miquilena y García, 2010).

Todas las alteraciones mencionadas favorecen a una acumulación excesiva de ácidos grasos libres (AGL) a nivel hepático, esto predispone al estrés oxidativo intrahepático por estimulación de la lipoperoxidación además hay un efecto estimulante sobre la beta oxidación (β -oxidación) mitocondrial (Álvarez-Martínez et al., 2004; Carrillo y Muciño, 2011; Green y Hodson, 2014), en consecuencia esto favorece la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por sus siglas en ingles), lo cual puede promover a necrosis (Pettinelli et al., 2011). Esto induce a la activación de células de Kupffer, lo cual conduce a la producción de NF- κ B (Álvarez-Martínez et al., 2004; Buque et al., 2008). Al incrementar el aporte de AGL al hígado, estos actúan como ligandos para el factor de transcripción PPAR- α , y aumenta la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, además, los productos de la oxidación de AGL, ROS como el peróxido de hidrógeno que generan peróxidos lipídicos y por ende peroxidación lipídica tisular y estrés oxidativo generalizado (Mueriel, 2009). El estrés oxidativo genera disminución de 50% en la actividad enzimática de la cadena respiratoria incrementando la relación ADP/ATP, lo que da peroxidación lipídica. Algunos productos intermedios de la peroxidación lipídica (MDA y HNE) son quimiotácticos de neutrófilos, estimulan las células estelares hepáticas y aumentan la secreción del factor transformador de crecimiento-beta (TGF- β), y TNF- α provocando inflamación y fibrosis (Figura 6) (Carrillo y Muciño, 2011).

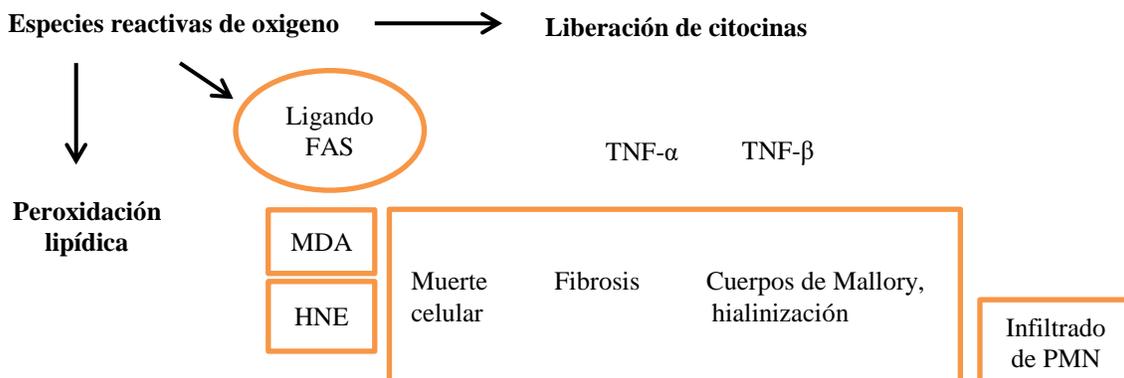


Figura 6. Efecto de la peroxidación lipídica y las citocinas proinflamatorias en el desarrollo de EHNA. EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HGNA: hígado graso no alcohólico; PMN: polimorfonucleares (Carrillo y Muciño, 2011).

1.1.3 Factores de riesgo y condiciones asociadas.

La edad mayor a 40 años, obesidad, diabetes tipo 2 (DM-2), hiperglucemia, RI e HTG son los factores de riesgo más importantes, entre otros como se observa en la Tabla 1 (Pérez-Aguilar et al., 2004).

En el caso contrario las características de una población de bajo riesgo son: ser joven, sano, bajo consumo de alcohol, y ausencia de obesidad (WGO Practice Guideline, 2012).

Tabla 1. Factores de riesgo y condiciones asociadas en la EHGNA (WGO Practice Guideline, 2012).

Factores de riesgo	Progresión de la enfermedad	Afecciones coexistentes
<ul style="list-style-type: none">• Resistencia a la insulina/síndrome metabólico• Cirugía de bypass yeyunoileal• Edad –mayor riesgo en 40-65 años, se da también en niños <10 años• Etnia –mayor riesgo en hispanos y asiáticos, menor riesgo en afroamericanos• Antecedentes familiares positivos – predisposición genética• Medicamentos y toxinas –por ejemplo, amiodarona, coralgil, tamoxifeno, maleato de perhexilina, corticoides, estrógenos sintéticos, metotrexate, tetraciclina IV, drogas, antirretrovirales de alta actividad (HAART)	<ul style="list-style-type: none">• Obesidad, aumento del IMC y de la circunferencia de cintura• Diabetes no controlada• Hiperglicemia• Hipertrigliceridemia• Vida sedentaria, falta de ejercicio• Resistencia a la insulina• Síndrome metabólico• Edad• Factor genético	<ul style="list-style-type: none">• Hiperlipidemia• Resistencia a la insulina• Diabetes tipo 2• Hepatitis C• Perdida rápida de peso• Nutrición parenteral total• Enfermedad de Wilson

1.2 Hipertrigliceridemia

La HTG es un trastorno de lípidos común, así como la hipercolesterolemia. Sin embargo, su clínica no se entiende completamente, debido a sus fenotipos de lipoproteínas heterogéneas y etiología compleja. La HTG severa aumenta el riesgo de pancreatitis así como esteatosis hepática, mientras que leve o moderada puede ser un factor independiente de riesgo de arteriopatía coronaria. Los pacientes con HTG suelen ir acompañados de otros trastornos relacionados como enfermedades cardiovasculares, obesidad central, diabetes tipo 2 y/o esteatosis hepática. La acumulación de grasa ectópica se ve a menudo en sujetos con HTG y lesiones diversas de órganos se desarrollan por lipotoxicidad (Hirano, 2013; Paradies et al., 2014; Sahebkar et al., 2014). Como podemos observar esta patología aumenta el riesgo de morbilidad y muerte y por lo tanto se ha convertido en un problema de salud en el

mundo y en nuestro país por los graves daños que provoca en los pacientes afectados (Miguel, 2009).

1.2.1 Clasificación

En la tabla siguiente se encuentra una clasificación de acuerdo a fenotipo y etiopatogenia:

Tabla 2. Clasificación de las dislipidemias según fenotipo y etiopatogenia.

Clasificación de las dislipidemias según fenotipo y etiopatogenia			
	Primaria o genética	Secundaria a	
		Patologías	Factores ambientales
Hipertrigliceridemia	Familiar Dislipidemia familiar combinada Déficit de lipasa	Obesidad Diabetes mellitus Insuficiencia renal crónica	Dieta rica en azúcares refinados y alcohol Tabaquismo Drogas: beta-bloqueadores, diuréticos, estrógenos

*Adaptada: Normas Técnicas. Dislipidemias (Cave, 2000).

En la Tabla 3 se observa la clasificación de TG de acuerdo a los niveles descritos por la ATP II (guía para el tratamiento en adultos, por sus siglas en inglés “adult treatment panel II o III”) y ATP III, y se considera HTG a los valores mayores o iguales a 150 mg/dL (según el ATP III) (González et al., 2011).

Tabla 3. Clasificación de los triglicéridos plasmáticos, comparados con los antiguos criterios del ATP II con el ATP III.

Clasificación de triglicéridos	Niveles del ATP-II (mg/dL)	Niveles del ATP-III (mg/dL)
Normales	<200	<150
Limites altos	200-399	150-199
Elevados	400-1000	200-499
Muy elevados	>1000	>500

Los valores elevados de TG suelen estar asociados a unos valores elevados de colesterol, con lipoproteína de baja densidad (c-LDL) normal o bajo, lipoproteína de alta densidad (c-HDL) están disminuidos, y niveles normales de apolipoproteína B (Apo B); principalmente el colesterol desempeñan un papel conocido e importante en el desarrollo de la disfunción endotelial y, posteriormente, en la formación acelerada de las placas ateroscleróticas (Cave, 2000; Manhiot et al., 2009; NOM-037-SSA2,2012).

1.2.2 Prevalencia

La HTG es una de las dislipidemias más frecuentes en la población mexicana. En la población adulta urbana de 20 a 69 años, 24.3% presenta concentraciones de TG mayores de 2.24 mmol/L (198.40 mg/dL) (Barquera et al., 2007; Martínez-Hernández et al., 2007) en adolescentes se ha visto una prevalencia de 14.5% (Martínez-Hernández et al., 2007), éstas se encuentran relacionadas principalmente con la distribución de grasa central (Vieira et al., 2011). Esto puede ser atribuido al consumo de alimentos ricos en carbohidratos, sedentarismo, cambios de estilo de vida (Martínez-Hernández et al., 2007), los cuales tienen efecto sobre los niveles de lípidos plasmáticos, específicamente sobre los TG, pues se ha demostrado que cuando un individuo disminuye su ingesta habitual de grasa, generalmente aumenta el consumo de carbohidratos como la fructosa, y consecuentemente se incrementa la síntesis de TG. El aumento de los niveles de TG se asocia a un mayor riesgo de aterosclerosis, por lo que algunos expertos consideran la HTG como un factor de riesgo independiente (Navarrete et al., 2012).

1.2.3 Patogenia

Las VLDL se forman en el hígado y participan en la exportación del exceso de TG derivados de los AG plasmáticos y de los residuos de quilomicrones. La síntesis de estas partículas se incrementa cuando aumentan los AG en el hígado, como resultado de una dieta rica en grasas, o en situaciones como la obesidad o la DM-2 (Manlhiot et al., 2009; Sala, 2008) en que se liberan cantidades grandes de AG a la circulación. La lipoproteinlipasa (LPL) degrada los TG de las VLDL hasta glicerol y AG (Miguel, 2009).

La asociación entre la HTG y la obesidad centralizada se puede explicar por el aumento del número y tamaño de los adipocitos en la región abdominal, que promueve la resistencia a la insulina (Figura 7) y se intensifica la liberación de AGL en el plasma, que proporcionan un sustrato para la síntesis de TG en el hígado, dando lugar a un aumento de la liberación hepática de lipoproteínas ricas en TG y VLDL en el plasma (Vieira et al., 2009).

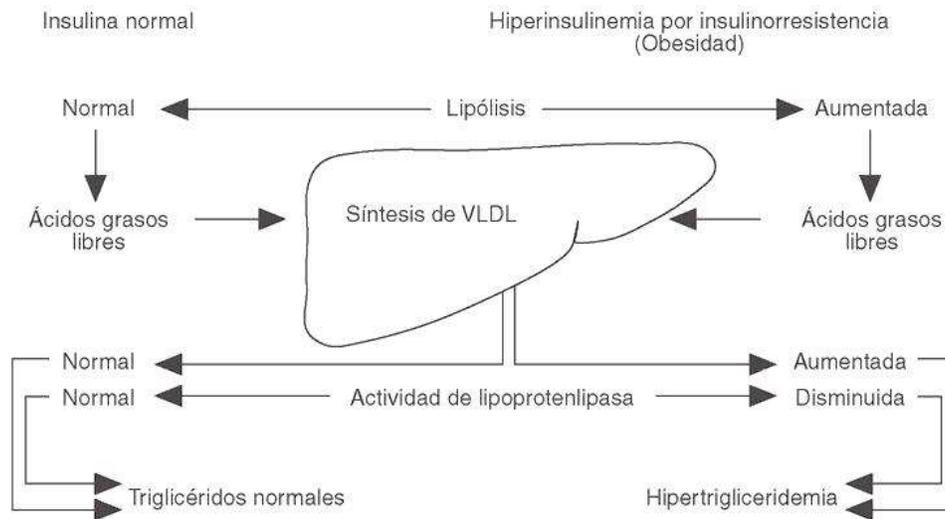


Figura 7. Relación entre hiperinsulinemia, insulinoresistencia, actividad lipoproteinlipasa y concentraciones de triglicéridos plasmáticos (Aranceta et al., 2003).

1.3 Asociación de la HTG con EHGNA

Entre el 20 y el 80% de pacientes con EHGNA tienen hiperlipemia. Aunque se observa una elevación de los TG y/o del CT séricos, hay una mayor asociación con los TG (Méndez-Sánchez et al., 2004; Ogawa et al., 2013; Pérez-Aguilar et al., 2004; Sahebkar et al., 2014). La HTG es el tipo más común de alteración de lípidos en pacientes con EHGNA y la EHNA (Chatrath et al., 2012). Se ha sugerido un papel relevante de la HTG en la patogenia del EHGNA porque la corrección de esta anomalía lipídica se asocia a una mejoría de las pruebas funcionales hepáticas (Pérez-Aguilar et al., 2004). Sin embargo, la patogénesis de esta dislipidemia en EHGNA no se entiende bien, pero probablemente está relacionada con la sobreproducción hepática de VLDL y la disminución del aclaramiento de las lipoproteínas de la circulación. Recientemente, se demostró que los AGL inducen lipoapoptosis de hepatocitos *in vitro* (Ogawa et al., 2013); por otro lado, en la dislipidemia aterogénica típica se detecta con frecuencia en EHGNA, caracterizado por niveles altos de TG y niveles bajos de c-HDL y, como ya se mencionó, también se presenta con RI y la adiposidad visceral juega un papel importante en la aceleración de la aterosclerosis. Un alto nivel de LDL, se detecta con frecuencia en los pacientes con HGNA, así como aumento de los niveles de LDL oxidadas, que es altamente aterogénico. En una cohorte multiétnica, se observó la EHGNA que el fenotipo de la dislipidemia se asocia con dislipemia aterogénica (TG séricos en ayunas más alta y c-HDL baja) lo que sugiere un posible papel fisiopatológico independiente entre EHGNA y dislipidemia. La sobreproducción de

partículas VLDL desde el hígado desempeña un papel clave en la aterosclerosis; además, el aumento de la disponibilidad de los lípidos en el hígado y la RI inhibe la Apo-B (Fargion et al., 2014). Así pues, se ha observado que la EHGNA se asocia no sólo con un riesgo mayor para complicaciones en el hígado sino también con una mayor morbilidad cardiovascular (Tziomalos, 2014), y como ya vimos esta última se asocia con HTG y nuevamente la HTG con EHGNA (Sala, 2008).

1.3.1 Marcadores de daño y diagnóstico en EHGNA e HTG

Existe una amplia variedad de pruebas de laboratorio capaces de medir el daño o la discapacidad funcional del hígado. Cuando se presenta algún tipo de lesión en el hígado, es posible detectarla cuantificando la actividad de algunas enzimas en plasma, esto es debido a que desde etapas tempranas de daños en el tejido, las enzimas citosólicas comienzan a fugarse de células cuya membrana ha incrementado su permeabilidad por diferentes factores que alteran la función celular. Si el proceso de daño continúa avanzando y se extiende a toda la célula, las enzimas mitocondriales y microsomales serán liberadas y su nivel en plasma incrementará (Woodman, 1988). En la Tabla 4 se resumen algunos de estos marcadores de daño:

Tabla 4. Marcadores de daño hepático en plasma e hígado.

<p>Pruebas para detectar daño de los hepatocitos. Actividad enzimática en plasma: Evalúan el daño de las células hepáticas, la capacidad del hígado de sintetizar proteínas y sus funciones excretoras.</p> <p>Una elevación de las enzimas en suero indica daño hepático.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Alanina aminotransferasa (ALT) <p>Un aumento considerable de ALT se observa en casos de daño hepatocelular agudo, como en la hepatitis viral aguda, el daño tóxico (por hepatotóxicos como el CCl₄) y síndrome de Reye. Esta enzima se localiza en el citosol de los hepatocitos y es un indicador de necrosis celular. La actividad enzimática de ALT cuantificada en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 20 y 30 μmol/L.min.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina (FA) <p>Tiene su actividad con un pH óptimo alcalino, esta enzima se encuentra principalmente en hígado, hueso, riñón, intestino y placenta. Es un indicador de colestasis ya que permite medir la función excretora del hígado. Se encuentra presente en las membranas entre las células hepáticas y el conducto biliar y se libera en presencia de enfermedades que lo afectan La actividad enzimática de</p>

FA cuantificada en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 110 y 120 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

- Gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP)

Existen varios mecanismos para el transporte de aminoácidos, uno de ellos es el ciclo gamma-glutamil que es un ejemplo de ciclo de transporte. La GGTP cataliza la transferencia del grupo glutamil de péptidos a aminoácidos, está localizada en la membrana celular; es un indicador muy sensible de colestasis y de enfermedades hepatobiliares. El valor de la GGTP puede ser útil en el diagnóstico de la hepatopatía alcohólica. La actividad enzimática de GGTP cuantificada en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 10 y 15 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

Pruebas para medir la capacidad hepática para transportar aniones orgánicos y el metabolismo de fármacos: Este grupo incluye las bilirrubinas séricas y muestra la habilidad del hígado para eliminar sustancias endógenas y exógenas de la circulación.

- Bilirrubina

Es un pigmento derivado del metabolismo de la hemoglobina y de glóbulos rojos senescentes destruidos por las células fagocíticas del bazo, hígado y médula ósea. La oxidación del grupo hemo por la hem-oxigenasa produce biliverdina y la reducción de ésta por la biliverdina-reductasa origina la bilirrubina. Las bilirrubinas se dividen en dos tipos: bilirrubinas libres o no conjugadas, que son liposolubles y tóxicas, y bilirrubinas conjugadas, que no son tóxicas y son hidrosolubles lo que facilita su eliminación por la bilis. El proceso de eliminación de las bilirrubinas ocurre en el hígado y si se altera disminuye su excreción y se origina regurgitación de la bilirrubina conjugada del hígado al torrente sanguíneo. La determinación de bilirrubinas conjugadas en plasma de rata en ausencia de daño hepático se encuentra entre 5 y 10 mg/L. La determinación de los niveles de bilirrubina sérica, la gamma-glutamil traspeptidasa (GGTP) y la fosfatasa alcalina (FA), son los indicadores de colestasis por excelencia ya que permiten medir la función excretora del hígado.

Pruebas de la capacidad biocinética y metabólica del hígado: En este grupo se puede incluir la capacidad para sintetizar y mantener el glucógeno hepático como indicador del metabolismo energético.

- Glucógeno

El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa, es una reserva importante de combustible presente en hígado y músculo, las funciones del glucógeno son mantener los niveles de glucosa en sangre, es muy importante debido a que la glucosa es prácticamente el único combustible utilizado para suministrar glucosa al cerebro y en la actividad muscular. En las patologías hepáticas la cantidad de glucógeno presenta un decremento como consecuencia de cambios metabólicos, por esta razón la medición de los niveles de glucógeno es un buen indicador

de la funcionalidad y el estrés hepáticos. El glucógeno cuantificado en tejido hepático de rata en ausencia de daño se encuentra entre 3 y 6 g de glucógeno/100 g de hígado.

El daño inducido por CCl_4 , provoca alteraciones en la membrana de los hepatocitos por el incremento del contenido de colesterol y de AMPc. El incremento en los niveles de AMPc, produce una disminución en el contenido de glucógeno.

- Proteínas

Las proteínas reflejan la capacidad de síntesis del hígado, ya que lleva a cabo la síntesis de proteínas como la albúmina y factores de la coagulación como el factor V y factores dependientes de la vitamina K como los factores II, VII, IX y X. Las proteínas son determinadas con el fin de calcular el grado de peroxidación lipídica.

Pruebas para determinar el estrés oxidativo e inflamación

- Catalasa (CAT)

Es una enzima citosólica que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En un daño hepático, la actividad enzimática de la catalasa disminuye, por lo tanto hay una acumulación de H_2O_2 , lo que provoca estrés oxidativo. Esta actividad enzimática puede cuantificarse utilizando permanganato de potasio (KMnO_4), ya que reacciona con el H_2O_2 .

- Peroxidación lipídica (LP)

La peroxidación lipídica es un proceso complejo que involucra la destrucción de los fosfolípidos de membranas celulares debido a la formación de compuestos reactivos, tales como radicales libres que son consecuencia del metabolismo del CCl_4 o de otros agentes de daño hepático formados a partir del oxígeno molecular. La peroxidación lipídica es la responsable de que se efectúe la inactivación de enzimas y de la modificación oxidativa de moléculas como lipoproteínas, por lo que es un parámetro que indica el daño en el hepatocito por estrés oxidativo. El grado de peroxidación lipídica determinado en tejido hepático de rata en ausencia de daño se encuentra entre 0.2 y 0.4 nmol MDA/mg proteína.

- Citocinas

Las citocinas son proteínas solubles del sistema inmunitario semejante a las hormonas que son producidas por una gran variedad de células dado un estímulo por un agente inductor. En el hígado se producen en células endoteliales, células estelares y en hepatocitos. Las citocinas se pueden clasificar por su estructura y función en interleucinas, factores de crecimiento, de necrosis tumoral, interferones y quimosinas, así como son anti y proinflamatorias.

Una de las citocinas proinflamatorias más estudiadas en el ámbito de la farmacología es el $\text{TNF-}\alpha$ o caquectina; las fuentes celulares principales de $\text{TNF-}\alpha$ son los linfocitos T activados y las células de

linaje monocítico al que pertenece un fenotipo como el de las células de Kupffer (DeCicco *et al.*, 1998). El TNF- α tiene impacto en diversos procesos biológicos en el hígado, interviniendo en la proliferación celular, la inflamación, la fibrosis, la necrosis y la apoptosis. En el humano se observa que al incrementar el TNF- α plasmático se ve un aumento en los niveles de ALT y bilirrubinas, indicando un papel citotóxico directo sobre los hepatocitos.

La Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado publicó los resultados de un consenso internacional para el diagnóstico de EHGNA (ver Tabla 5)

Tabla 5. Estudios para el diagnóstico de EHGNA.

Laboratorios	<ul style="list-style-type: none"> • Elevación moderada de los niveles de ALT • Elevación de GGTP y FA • Hiperglucemia (causada por la asociación con diabetes, la cual se presenta hasta en un tercio de los pacientes) • Dislipidemia (usualmente TG) en aproximadamente 20 a 25% de los casos • Índices del metabolismo de hierro anormales (comúnmente aunque no de forma generalizada indican hemocromatosis)
Imagen	<ul style="list-style-type: none"> • Ultrasonido, tomografía computada, imagen por resonancia magnética: son poco sensibles para determinar el grado de esteatosis, en un grado que va del 25 a 30% • Ninguna de estas modalidades es capaz de identificar de forma eficiente el grado de fibrosis y el estadio de la enfermedad • Espectroscopia por resonancia magnética: contenido de grasa y niveles de ATP en la grasa hepática
Histología, biopsia Hepática	<ul style="list-style-type: none"> • Patrón oro • No confiable para distinguir entre EHA y EHGNA • Importante variabilidad entre la lectura de los patólogos de la misma muestra; preferible que esté a cargo de un hepatólogo con gran experiencia

*Adaptada de las Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología (Chávez et al., 2006; WGO Practice Guideline, 2012).

En el caso de HTG se establece un mejor diagnóstico al incluir todo lo siguiente: historia clínica completa, búsqueda intencionada de factores de riesgo cardiovascular, evaluación de la dieta, evaluación de la actividad física, exploración física completa, con medición cuidadosa de la presión arterial y del perímetro abdominal, estudio de la familia, medición y cálculo de lípidos sanguíneos (CT, c-HDL, c-LDL, c-no-HDL y TG), glucosa en ayuno y el cálculo del riesgo cardiovascular global (NOM-037-SSA2, 2012).

1.3.2 Modelos experimentales de daño hepático y de dislipidemias

En EHGNA podemos distinguir dos grandes grupos de modelos animales: los inducidos por agentes externos (sea la dieta, fármacos o toxinas) o los que son resultado de modificaciones genéticas (espontáneas o artificiales); a veces se combinan ambos tipos.

-
- Modificaciones genéticas:
 - Alteraciones genéticas que incrementan la lipogénesis: Sobre-expresión de genes que promueven la lipogénesis (ratones PEPCK-NSREBP-1 α) y mutaciones ocurridas naturalmente que producen lipogénesis hepática (ratones OB/OB).
 - Causas genéticas que dificultan la eliminación de grasa hepática: Delección de genes que regulan la oxidación de ácidos grasos (ratones PPAR- α), mutaciones ocurridas naturalmente que inhiben la β -oxidación de ácidos grasos.
 - Factores ambientales que causan incremento de los ácidos grasos:
 - Dietas que inducen obesidad: dietas ricas en fructosa y sacarosa, dietas ricas en grasas.
 - Dietas aterogénicas.
 - Dietas que inducen lipogénesis hepática sin obesidad: Dietas deficitarias en arginina, dietas ricas en sacarosa/grasas (Ayala et al., 2008).
 - Químicos: Acetaminofeno, galactosamina, tetracloruro de carbono (TC), tioacetamida, concanavalina, lipopolisacárido, azoximetano.
 - Tetracloruro de carbono (TC): Su mecanismo de acción se lleva a cabo en el retículo endoplasmático por la formación de intermediarios reactivos como el triclorometilo ($\text{Cl}_3\text{C}\cdot$) y triclorometilperoxilo ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$) que es más tóxico aún, mediante su metabolismo a través de diversas isoenzimas del sistema citocromo P-450 (CYP2E1, CYP2B1 o CYP2B2 y probablemente CYP3A) (Weber et al., 2003). Ambos radicales inician una reacción en cadena de lipoperoxidación y estrés oxidativo lesionando principalmente a la zona central del acino hepático y puede ocasionar una necrosis masiva al hígado. Este mecanismo también involucra importantes alteraciones en la homeostasis del calcio mitocondrial y es dependiente de la dosis utilizada. Las reacciones hepatotóxicas por TC (CCl_4) tienen dos fases:
 - Durante la primera hora después de la exposición aparecen los metabolitos reactivos ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$ y $\text{Cl}_3\text{C}\cdot$), la peroxidación de lípidos y las uniones covalentes a los receptores nucleófilos.
 - A las seis horas aparecen las consecuencias de la acumulación intracelular de calcio. Se produce la necrosis de células aisladas, que evoluciona hacia una necrosis centrolobulillar extrema en las 24-48

horas siguientes. La regeneración celular es máxima entre 36-48 horas después de la dosis (Tunon et al., 2007).

- Toxinas que inducen lipogénesis hepática: alcohol, valpoatro (Ayala et al., 2008).

En el caso de dislipidemias, se utilizan principalmente dietas altas en grasa, altas en sacaros, altas en fructosa o combinadas, así como animales modificados genéticamente.

También se puede utilizar la inducción de hiperlipidemia por tiloxapol (TI): como agente químico altera físicamente las lipoproteínas de muy baja densidad, haciéndolas refractivas a la acción de las enzimas lipolíticas en la sangre y diversos tejidos (adiposo, corazón, músculo esquelético, pulmón, y aorta), previniendo o retardando su remoción de la sangre y tejidos (Ayala et al., 2008). Es un detergente no iónico, a través de su capacidad para inhibir LPL, al menos 24 h después de la administración, y se acumula en hígado (Millar et al., 2005), conduce a un aumento del colesterol y los triglicéridos, además de favorecer el aumento de la actividad enzimática de la hidroximetilglutaril – CoA reductasa (HMG-CoA) reductasa, que es la enzima clave para la síntesis intracelular de colesterol hepático. Ha sido ampliamente utilizado para bloquear el aclaramiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y de ese modo inducir hiperlipidemia aguda en muchos animales. Este fármaco es valioso como una herramienta para la inducción de la hiperlipidemia (Chisato et al., 2007; Ferreira et al., 2012).

1.3.3 Tratamientos de la HTG y de la EHGNA

Tratamiento de la HTG

Como se ha visto la HTG es un conjunto de procesos de significado muy heterogéneo. Precisamente, por dicha complejidad, es difícil dar recomendaciones demasiado concretas. Hay formas de HTG que, por su escasa entidad, por no acompañarse de alteraciones en los valores de colesterol unido a HDL o LDL, y por no estar asociadas a manifestaciones propias de un SM, no precisan más que de un seguimiento ocasional. En otros casos, sobre todo en las formas graves, se plantea la necesidad de un tratamiento urgente, ante el riesgo de que se desencadene una pancreatitis aguda y/o EHGNA las cuales son amenazante para la vida (Sala, 2008). Por lo tanto, se propone que se hagan diversas modificaciones y uso en el caso de HTG más graves de algunos fármacos:

- Cambios en el estilo de vida.

-
- Estatinas: una buena opción es la fluvastatina que, con su buena tolerancia, en dosis de 20 a 80 mg diarios, ayuda además a reducir los TG plasmáticos entre el 20 y el 40%, suficiente para normalizar la mayoría de los casos.
 - Fibratos: permite descensos de triglicéridos entre el 40 y el 60%, y son mayores en los pacientes con formas más graves; además incrementan moderadamente las HDL, y llegan a elevarlo entre el 15 y el 25%. Existen evidencias de que estos fármacos reducen el riesgo de sufrir episodios cardiovasculares en pacientes con enfermedad (prevención secundaria), reduciendo la progresión del proceso coronario, seguido con angiografía, en DM-2.
 - Ácido nicotínico: induce una gama de efectos lipídicos muy interesantes, con descenso de TG (30 a 50%), incremento de HDL (20 a 30%) y descenso de LDL (5 a 25%). Ello supone que, aunque su efecto sobre los primeros es inferior a los fibratos, los supera en su acción sobre el HDL. Existen pocos estudios que evalúen su eficacia clínica, siendo el principal el Coronary Drug Project. Sin embargo, el empleo de este fármaco conlleva una serie de efectos secundarios que limita su uso, e incluye incrementos de glucemia y de enzimas hepáticas, junto a síntomas vasomotores, como rubor facial.
 - Ácidos grasos omega 3 (ω -3): Los ω -3 en dosis entre 2 y 4 g diarios pueden ayudar a descender los niveles de TG entre el 30 y 50%. Se han demostrado que estos agentes son, junto a las estatinas, los únicos que reducen los lípidos plasmáticos y disminuyen la mortalidad por todas las causas, en pacientes con enfermedad coronaria. No obstante, dado el amplio espectro de sus efectos biológicos, el beneficio cardiovascular potencial derivaría de unas acciones que van mucho más allá de la reducción de los TG. Un hecho interesante es la seguridad de su administración, dado que las manifestaciones secundarias más frecuentes son una ocasional intolerancia digestiva, con el empleo de dosis altas, y el regusto a pescado, efectos que se pueden minimizar si las cápsulas se ingieren en el momento de irse a la cama o mezcladas con las comidas. Además en su eficacia, no influye el momento del día en que se administren, lo que le da gran flexibilidad a su empleo.
 - Tratamiento combinado (Sala, 2008).

En el caso de EHGNA el proceso fisiopatológico es muy complejo, por lo tanto las modalidades terapéuticas abarcan varios aspectos. El manejo inicial de los pacientes con HGNA debe incluir un programa de intervención sobre el estilo de vida orientado hacia reducción de peso e incremento de la actividad física, también la identificación y adecuado tratamiento de otros componentes del síndrome metabólico son parte esencial del abordaje terapéutico, en la Tabla 6 se muestran algunos fármacos y sus mecanismos de acción que pueden modificar la historia natural de la enfermedad hepática y de las alteraciones cardiovasculares asociadas. La persistencia de enzimas hepáticas elevadas después de un periodo de seis meses de dieta y actividad física se puede considerar una indicación para realizar una biopsia hepática y con base en los hallazgos histológicos se debe evaluar la utilización de otros tratamientos (Chávez et al., 2006).

Tabla 6. Fármacos utilizados en EHGNA.

Estrategias terapéuticas	
Mecanismos de acción y fármacos	
Control de peso	Orlistat Sibutramina Colina
Resistencia a la insulina	Tiazolidinedionas Metformina
Radicales libres	Ácido ursodesoxicólico N-Acetilcisteína Vitamina E Vitamina C
Ácidos grasos libres y radicales libres	Betaína Hipolipemiantes
Control glucémico	Meglitinidas
Factor de necrosis tumoral alfa	Pentoxifilina
Fibrogénesis	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

*Adaptado de Chávez et al., 2006.

El uso de diversos antioxidantes:

- Vitamina E: antioxidante potente particularmente efectivo en contra de la peroxidación de lípidos de membrana, y previene la activación de células estelares, el uso de dosis entre 400-1,200 UI/día (Pérez-Aguilar et al., 2004). mejora los valores bioquímicos de la función hepática y de marcadores de inflamación como el factor transformador de crecimiento $\beta 1$ (inhibiendo su expresión) (Mendez-Sanchez et al., 2004).

-
- Betaína: es un componente normal del ciclo metabólico de la metionina que incrementa los niveles de S-adenosilmetionina, protegiendo al hígado del daño que causan los triglicéridos. Su uso crónico ocasiona una disminución de los valores de las enzimas hepáticas (transaminasas séricas) (Pérez-Aguilar et al., 2004), pero no se ha observado regresión o detención del daño histológico
 - N-acetilcisteína: su uso muestra mejorías significativa en los valores de aminotransferasas, la N-acetilcisteína es un precursor del glutatión que incrementa los niveles de este compuesto en el hepatocito, lo que limita el daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno y por ende protege del stress oxidativo.
 - Ácido ursodesoxicólico: epímero del ácido quenodesoxicólico, debido al reemplazo realizado por los ácidos biliares endógenos, posee propiedades hepatoprotectoras, por la disminución de ácidos biliares hidrofóbicos que origina, disminuye la lesión del hepatocito ocasionada por el stress oxidativo en pacientes con NAFLD, también se ha demostrado que disminuye la producción de TNF- α . El uso de ácido ursodesoxicólico muestra mejoría significativa en los niveles de aminotransferasas cuando se utiliza por periodos de al menos 12 meses, incluso esta mejoría bioquímica sigue siendo importante cuando se compara con pacientes tratados únicamente con dieta (Chávez Tapia et al., 2006; Méndez-Sánchez et al., 2004; Pérez-Aguilar et al., 2004).
 - Probuco: es un agente hipolipemiante con gran capacidad antioxidante. Únicamente existe un reporte acerca de su uso, donde se administraron 500 mg/día versus placebo durante seis meses, mostrando mejoría significativa en los valores de transaminasas (Chávez Tapia et al., 2006).
 - Silimarina: es el derivado de hierbas más comúnmente usado en la terapia de hepatopatías que tiene también propiedades antioxidantes. Es un estimulante de la RNA polimerasa ribosómica, un quelante del hierro y un reductor de la actividad promotora tumoral. En un estudio se valoró la capacidad de la silimarina para disminuir la peroxidación lipídica y la resistencia a la insulina en personas con diabetes con cirrosis alcohólica. A los 12 meses de tratamiento se comprobó un descenso de la glucemia basal, de la insulina y del malonaldehído (Pérez-Aguilar et al., 2004).

-
- ω -3 de pescado: En algunos estudios se ha informado una reducción en los niveles de transaminasas durante el tratamiento. Además de la reducción de transaminasas en otro estudio se observó una mejora en el hígado, tanto en la esteatosis, inflamación, fibrosis y abalonamiento, estos pacientes se sometieron a una biopsia hepática al final del seguimiento (Tziomalos, 2014). También se ha observado atenuación del estado inflamatorio debido a los niveles tisulares de la prostaglandina E2, leucotrieno B4, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y TNF- α se redujo significativamente; factor NF-kB fue casi completamente abolido. Las actividades de los reguladores prolipogénicas, tales como receptor hepático X (LXR), esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD-1), y SREBP-1 se disminuye considerablemente, mientras que la actividad de receptor de PPAR- α el cual facilita la β -oxidación, se incrementó notablemente (Li et al., 2014). Se ha visto que los ω -3 tienen efecto hepatoprotector en la EHGNA (Popescu et al., 2013).

Hasta el momento la reducción de peso continúa siendo la piedra angular en el tratamiento de la EHNA. Ensayos clínicos diversos sugieren que algunos fármacos evaluados en estudios piloto abiertos, podrían ser de utilidad en el tratamiento de EHGNA. Sin embargo, ninguno de los medicamentos que se han evaluado hasta ahora se puede recomendar en el tratamiento del HGNA (Chávez-Tapia, et al., 2006). A pesar de los grandes avances que se han realizado en la patogenia de la HGNA, aún quedan múltiples interrogantes por resolver. En el futuro, éstos serán determinantes en el tratamiento y prevención de esta enfermedad emergente de gran importancia en el momento actual (Méndez-Sánchez et al., 2004).

1.4 Alternativas en el tratamiento de EHGNA e HTG.

A pesar de la importancia clínica, no existe terapia efectiva demostrada contra EHGNA, sin embargo es recomendado el control de factores de riesgo, como es la HTG. Con el aumento de la conciencia de la salud pública a nivel mundial, la demanda de alimentos funcionales con múltiples beneficios para la salud también ha aumentado. El uso de alimentos medicinales de la medicina popular para prevenir enfermedades como la diabetes, la obesidad, problemas cardiovasculares, esteatosis hepática está ganando impulso en la población. La semilla de *Salvia hispanica* L. o más comúnmente conocida como la chía es un alimento tradicional en América central y del sur. Actualmente, se consume ampliamente para diversos beneficios para la salud, especialmente en el mantenimiento de

los niveles ideales de lípidos en sangre. Este efecto es aportado por la presencia de ácidos fenólicos y ω -3 y 6 de aceite en la semilla. Aunque la presencia de ingredientes activos en la semilla de chía garantiza beneficios para la salud, no hay estudios suficientes que demuestren la seguridad y eficacia de este alimento y por lo tanto deben ser validados por la investigación científica. Esta investigación tiene por objetivo aportar evidencia de que el consumo de chía, puede contribuir positivamente en la disminución de esteatosis hepática así como en la disminución de triglicéridos séricos (Mohd et al., 2012).

II ANTECEDENTES

2.1 Chía (*Salvia hispanica* L.)

2.1.1 Origen y antecedentes históricos

Salvia hispanica L. es una especie originaria de Mesoamérica cuya mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico (Beltrán-Orozco y Romero, 2003), siendo nativa de las áreas montañosas del oeste y centro de México (Ayerza y Coates, 2006). Es llamada chía, siendo esta palabra una adaptación española al término náhuatl chían o chien (plural), término que en náhuatl significa “semilla de la que se obtiene aceite” (Watson, 1938). La chía empezó a ser utilizada en la época precolombina, se sabe que en los años 3500 a.C., se utilizó como uno de los alimentos principales en el valle de México por las civilizaciones Teotihuacanas y Toltecas; los mayas y los aztecas, la empleaban como alimento, medicina y ofrenda a los dioses (Ayerza y Coates, 2007; Di Sapio et al., 2008; Murillo et al., 2013; Périgo et al., 2011). Durante muchos años las semillas de chía fueron comercializadas solamente en los mercados mexicanos y utilizada como materia prima para la elaboración de la bebida denominada chía fresca, la cual era consumida por razones étnicas o religiosas (Ayerza y Coates, 2005). En 1965 la chía comenzó a estar disponible en comercios dietéticos del sudeste de California y Arizona y hacia finales de los años 1980s se empezó a comercializar en los Estados Unidos un alimento para mascotas (Chía Pets) (Guiotto, 2014). En el año 2009, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) emitió un dictamen sobre la inocuidad de las semillas enteras y trituradas como ingredientes alimentarios (EFSA, 2009) y a partir de 2013 la semilla de chía se introduce como ingrediente alimentario en diversos productos tales como cereales de desayuno, mezclas de frutas, frutos secos y semillas y como semillas preenvasadas (Guiotto, 2014).

2.1.2 Características botánicas

Es una hierba anual del verano (Figura 8) perteneciente a la familia de la menta (Lamiaceae), se desarrolla desde 1 a 1.5 m de altura según la fecha de siembra, con tallos ramificados de sección cuadrangular con pubescencias cortas y blancas. Presenta hojas opuestas con bordes aserrados de 8-10 cm de longitud y 4-6 cm de ancho, las flores son hermafroditas, púrpuras o blancas, pedunculadas y se encuentran reunidas en grupos de seis o más en ramilletes terminales (Ayerza y Coates, 2005).



Figura 8. Plántulas (izquierda) e inflorescencias de *Salvia hispanica* L. (centro y derecha) (Capitani, 2013).

En la Figura 9 se puede observar el fruto, al igual que otras especies de la familia Lamiaceae, es típicamente un esquizocarpo (fruto seco) consistente en lóculos indehiscentes (cualquier tipo de fruto que no es capaz de abrirse por sus propios medios para dejar salir sus semillas para que se dispersen) que se separan para formar 4 mericarpios parciales denominados núculas, comúnmente conocidos como semillas, los cuales son monospermicos, ovales, suaves y brillantes, de color pardo grisáceo con manchas irregulares marrones en su mayoría y algunos blancos y mide aproximadamente 2 mm de largo por 1mm de ancho (Ayerza y Coates, 2005).



Figura 9. Semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) (4x) (Capitani, 2013).

2.1.3 Composición nutricional

Su composición varía de acuerdo al lugar de procedencia (Ayerza y Coates, 2009). Sin embargo, puede generalizarse que tiene un alto contenido de varios nutrimentos (ver Tabla 7) como proteína (19-23%), lípidos (30-35%), carbohidratos (41%), fibra (18-30%),

compuestos fenólicos, minerales (son excelente fuente de calcio, fósforo, magnesio, potasio hierro, zinc y cobre), vitaminas liposolubles como la A, D, E y K.

Tabla 7. Composición nutricional de la chía.

Composición	Chía g/100 g
Kcal	550
Proteína	21
Grasa	29.82
--Oleico(18:1) ω -9	8.12
--Linoleico (18:2) ω -6	20.68
--Linolénico (18:3) ω -3	63.8
Humedad	5.28
Cenizas	5.28
Carbohidratos	40.34
Fibra dietética	31.36
Minerales (mg/100 g)	
--Calcio	714
--Potasio	700
--Magnesio	390
--Fósforo	1067
--Hierro	16.4

*Tabla adaptada (Ayerza y Coates, 2005; Rupflin, 2011).

Proteínas: La chía contiene una cantidad elevada de este macronutriente, el cual es mayor que el asociado a los cereales tradicionales (arroz, cebada, avena, trigo, maíz) presentando como ventaja adicional el no contener gluten, motivo por el cual ha sido aprobada por la Asociación Celíaca Argentina como apta para su uso en pacientes celíacos aunque no ha sido comercializado como una fuente de proteína (Ixtaina, 2011), principalmente porque el perfil de aminoácidos es limitante (lisina) para los escolares sin embargo, puede ser mezclado con otros granos para mejorar el equilibrio de proteínas (Olivos-Lugo, et al., 2010). Los aminoácidos de las proteínas de la chía se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Contenido de aminoácidos correspondientes a hidrolizados de proteínas de semillas de chía.

Aminoácidos	g/16 g N	Aminoácidos	g/16 g N	Aminoácidos	g/16 g N
Ácido aspártico	7.64	Tirosina	2.75	Serina	4.86
Isoleucina	3.21	Ácido glutámico	12.40	Triptófano	-
Prolina	4.40	Glicina	4.22	Valina	5.10
Treonina	3.43	Fenilalanina	4.73	Arginina	8.90
Leucina	5.89	Alanina	4.31	Lisina	4.44
Histidina	2.57	Cistina	1.47	Metionina	0.36

Tabla adaptada (Ayerza y Coates, 2005). N: nitrógeno.

Lípidos: El contenido de aceite presente en la semilla de chía es de alrededor de 28-33% (ver Tabla 7), el cual presenta el mayor porcentaje ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son indispensables ya que el organismo no puede sintetizarlos. Estos lípidos son el ácido α -linoleico (AL; ω -6) encontrándose en la semilla en un 20-27% (del contenido total de lípidos) y el ácido α -linolénico (ALA; ω -3) (Figura 10), presente en numerosos vegetales, siendo la chía una de las fuentes botánicas más ricas en ω -3 que se conoce (62%, del total de lípidos presentes en la semilla, aunque otros autores refieren 51.8 y 55.3%, respectivamente) (Ayerza y Coates, 2011; Di Sapio et al., 2008; Jiménez et al., 2013) y el cual es precursor de los ácidos grasos ω -3 de cadena larga, el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (presentes en el aceite de pescado) a través de la acción de las enzimas de desaturación y elongación, los cuales se asocian con diversos efectos entre los cuales destaca su efecto antiinflamatorio, al inhibir algunas citocinas, ejerce un efecto sobre la expresión génica de factores de transcripción involucrados en el transporte y oxidación de ácidos grasos y modifican la fluidez y el espesor de la membrana que colectivamente actúan reduciendo la dislipidemia, mejorando la sensibilidad insulínica y por lo tanto desordenes metabólicos (Rossi et al., 2011). El equilibrio entre ω -3 y ω -6 es importante en la salud humana, y la relación óptima en la dieta es de 4 a 1, sin embargo, se ha encontrado que la mayoría de los pacientes con EHNA tienen un mayor nivel de ω -6 y un menor nivel de ω -3, y la relación puede ser desde 20 hasta 25:1. Por lo tanto, la suplementación con ω -3 es necesaria, especialmente para la prevención y el tratamiento de la EHNA (Xi-Xi et al., 2016). Como ya se mencionó la chía es una de las fuentes botánicas más ricas de ω -3 que se conoce, y en comparación con fuentes de origen animal como la camelina (36%), la perilla (53%), fuentes de origen vegetal como Sacha Inchi (53.9%) y de lino (57%), sigue siendo una de las fuentes más altas (Ayerza y Coates, 2011; Murillo et al., 2013; Rossi et al., 2013; Ixtaina, 2011). Por otra parte, en lo que respecta al enriquecimiento de alimentos con ω -3, la chía no presenta ni transmite el característico “olor a pescado”, la estabilidad de dichos ácidos grasos ω -3 es otorgada por los antioxidantes naturales presentes en la semilla (Guiotto, 2014).

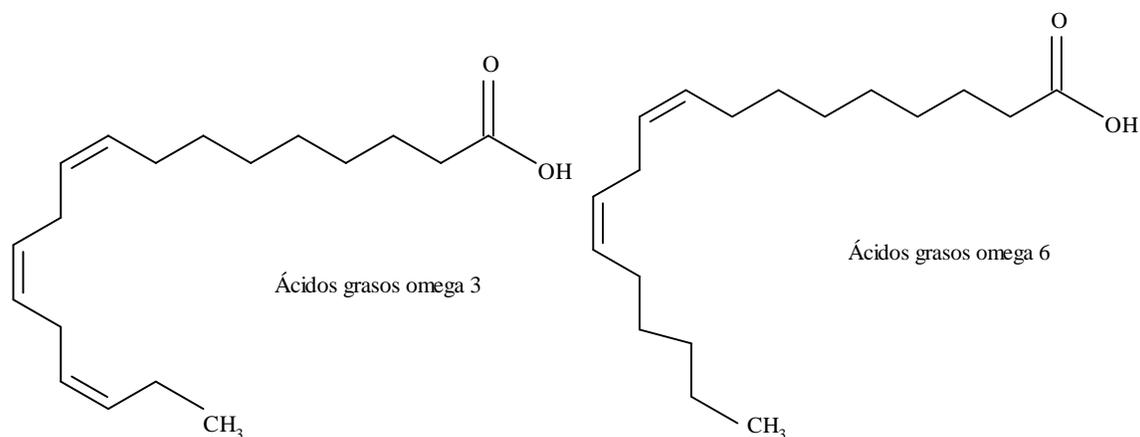


Figura 10. Ácidos grasos poliinsaturados en la chía: ALA (ω -3) y AL (ω -6) (Mohd et al., 2012).

Fibra: La chía tiene más contenido de fibra dietaria que la cebada, trigo, avena, maíz y arroz. En la chía representa alrededor de un 30%, de la cual un 5% corresponde a fibra soluble, denominada mucílago. Las semillas de chía al ser sumergidas en agua, quedan envueltas por un material de aspecto gelatinoso conocido como mucílago, el cual es de interés nutricional y como agente espesante en la industria alimentaria.

Dicho mucílago es un tetrapolisacárido lineal compuesto por D-xilosa, D-glucosa, 4-O-metil-D-ácido glucurónico en proporciones de 2:1:1, cuyo peso molecular varía entre 0.8 a 2×10^6 Da. Este exudado puede absorber hasta 10 veces su peso en agua (Figura 11), lo que permite una absorción más lenta de azúcar en el cuerpo y efectos metabólicos benéficos (Lin et al., 1994; Muñoz et al., 2012; Ixtaina, 2010).

Las semillas de chía contienen 5-6% de mucílago, que se puede utilizar como fibra dietética. Muñoz y colaboradores estudiaron la hidratación de chía mucílago, encontrando que una muestra de 100 mg de mucílago absorbe 2.7 g de agua, que es de 27 veces su propio peso (Muñoz et al., 2012). En comparación con otros cereales como la avena (5.5 g agua / g de fibra) y el trigo (6.6 g de agua / g de fibra). Las fibras dietéticas solubles son fácilmente fermentables por las bacterias del colon, se caracterizan por una alta retención de agua y que tienen la capacidad de formar una masa gelatinosa, lo que aumenta la viscosidad del contenido gastrointestinal y ralentiza el vaciado gástrico, que proporciona una mayor lubricación y el volumen de las heces (Coelho y Salas-Mellado, 2014).

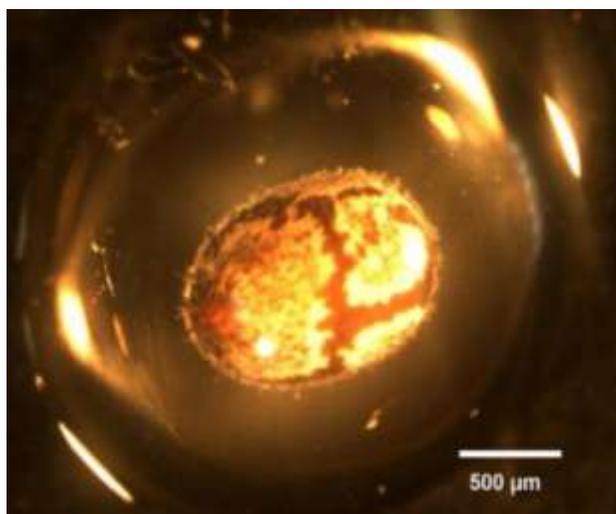


Figura 11. Semilla entera hidratada rodeada por una cápsula de mucílago (Muñoz et al., 2012).

Antioxidantes: Se ha reportado que la semilla de chía contiene algunos compuestos con actividad antioxidante potente. Entre los más importantes están los antioxidantes fenólicos, tales como el ácido clorogénico y el ácido cafeico, flavonoles como miricetina, quercetina y kaempferol (Figura 12) (Scapin, et al., 2015). Estos compuestos son antioxidantes primarios y sinérgicos y proporcionalmente hacen una mayor contribución a la actividad antioxidante. La quercetina es un antioxidante potente capaz de prevenir la oxidación de las grasas, proteínas y ADN, atrapando radicales libres y metales y estas propiedades antioxidantes son significativamente más eficaces que otros compuestos flavonoides. El ácido cafeico y el ácido clorogénico protegen contra los radicales libres e inhiben la peroxidación de las grasas (Fernández-Martínez et al., 2007). Estos compuestos presentes en la semilla tienen propiedades antioxidantes mucho más fuertes que los de ácido ferúlico, la vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina E (α -tocoferol) (Ayerza y Coates, 2005; Taga et al., 1984); por lo tanto, la chía podría considerarse una semilla con capacidad antioxidante alta y fuente novedosa de isoflavonas que se puede incorporar en la dieta humana. Es interesante observar que la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de chía no están presentes en otras semillas oleaginosas y que estas sustancias ayudan a mantener más estable la composición lipídica de la semilla y hace que su aceite no se enrancie a lo largo del tiempo (Martínez et al., 2014).

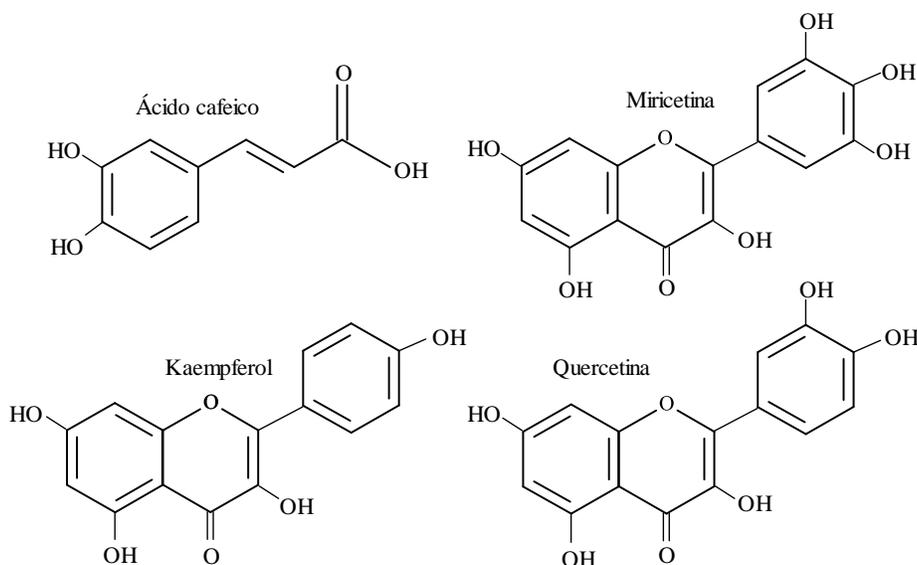


Figura 12. Flavonoides y ácidos fenólicos en la chía (Mohd Ali et al., 2012).

2.1.4 Uso medicinal de chía y evidencia científica del uso de la semilla en esteatosis hepática e hipertrigliceridemia

No hay evidencia de efectos adversos o alergenicidad causada por la chía (EFSA, 2009). En años recientes, las semillas de chía han cobrado gran importancia debido a los efectos benéficos que se han encontrado para los AG ω -3 en la salud y la nutrición humanas (Murillo et al., 2013). En el caso de la semilla entera, conviene ingerirla molida, para permitir su metabolización correcta. Los requerimientos diarios de ω -3 se pueden cubrir con apenas 5 g de semilla molida (Pérido et al., 2011). Se ha encontrado que 100 g de semilla tiene la misma cantidad de ω -3 que 790 g de salmón, casi la misma cantidad de calcio que 3 tazas de leche y casi tanto hierro como 5 tazas de espinacas (Vuksan et al., 2010).

En un estudio realizado en ratas, se administró chía en un modelo de hiperlipidemia inducido por consumo de sacarosa, se observó que la chía impidió la aparición de dislipidemia y resistencia a la insulina (Chicco et al., 2009). En otro estudio realizado en ratas, el objetivo fue comparar el efecto sobre CT, LDL, HDL, administrando semilla de chía (15% o 150 g/kg) o aceite de chía (5% o 59.9 g/kg) durante 4 semanas; se encontró un efecto hipolipidémico. La mayoría de las investigaciones en rata, han evaluado los aceites de pescado que son ricos en ω -3 de cadena larga (EPA, y DHA); pocos han examinado fuentes vegetales tales como ALA de la semilla de chía (Ayerza y Coates, 2005). Se ha observado que la chía estimula la actividad de la glucógeno sintasa, glucógeno, glucosa-6-

fosfato y GLUT-4, así como hace que haya una reversión en la RI y la dislipidemia (Oliva et al., 2013); ésta mejora en la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, reduce la adiposidad visceral, y disminuye la esteatosis hepática, así como hay disminución del gasto cardíaco, inflamación hepática y fibrosis. Probablemente la fuente de ALA induce una redistribución de lípidos asociada con la cardio y hepatoprotección (Poudyal et al., 2012). En un modelo de ratas con RI se encontró que las enzimas claves en las actividades hepáticas como FAS, ACC, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), CPT-1 y oxidasa de ácidos grasos que participan en el metabolismo de lípidos se regularon con el consumo de chía y PPAR aumentó. Por lo tanto, en este estudio se recomendó el consumo de chía para la prevención y la normalización de dislipidemia y la esteatosis en el hígado (Rossi, 2012). En el caso de uso de la chía en humanos, hay pocos estudios clínicos (ver Tabla 9):

Tabla 9. Ensayos clínicos en humanos con semilla de chía.

Duración	Modo de ensayo	Formulación	Resultados
7 semanas	10 mujeres posmenopáusicas	25 g de semillas de chía / día	Aumento plasmático de ácidos grasos poliinsaturados (ALA y EPA) después de la suplementación con chía molida. El resultado fue de acuerdo con estudios anteriores realizados en las gallinas, ratas y conejos (Jin et al., 2010).
12 semanas	Simple ciego con 76 sujetos (37 con placebo; y 39 sujetos con la semilla de chía)	25 g de semillas de chía en 250 ml de agua dos veces / día	Nieman y colaboradores plantearon la hipótesis de que el alto contenido de fibra dietética y ALA de la chía puede promover la pérdida de peso humano y reducir los factores de riesgo de enfermedades relacionadas con las enfermedades del corazón y la obesidad, en este estudio no hubo resultados significativos en la pérdida de peso y los factores de riesgo de la enfermedad a pesar de que el nivel plasmático de ALA aumentaron (Nieman et al., 2009).
2 meses	Ensayo aleatorio, con la dieta control (500 kcal por 2 semanas), 67 sujetos con síndrome metabólico (placebo 35; bebida 32)	Bebidas de 235 kcal que contiene proteína de soya, el nopal, la semilla de chía y avena	Pérdida de peso corporal y la reducción de los niveles de triglicéridos y glucosa en sangre (Guevara-Cruz et al., 2012).
120 minutos	Ensayo aleatorizado, doble ciego en 11 sujetos sanos	50 g de pan blanco que contiene 0, 7, 15, o 24 g de semillas de chía	Reducción de la glucemia postprandial (Vuksan et al., 2010).

Tomado de Mohd et al., 2012

También se le ha atribuido a la semilla de chía lo siguiente:

- Ayuda a reducir el colesterol.
- Inhibe la coagulación de la sangre y promueve la regeneración de tejidos. Ayuda a reducir el tiempo de digestión de hidratos de carbono, por lo que la asistencia del control de los niveles de azúcar en la sangre.
- Ayuda a prevenir enfermedades del cerebro, la depresión y la epilepsia.
- Mejora el sistema inmune.
- Ayuda al desarrollo de la retina y el cerebro, y también tiene efectos beneficiosos en los niños menores de 2 (Muñoz, 2012).

Estos hallazgos sugieren que la chía puede ser una alternativa como fuente rica en ω -3, proteínas, vitaminas, minerales y antioxidantes para diversas patologías, pudiéndose usar en personas vegetarianas y alérgicas al pescado y los productos pesqueros (Ayerza y Coates, 2005).

III JUSTIFICACIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es el trastorno hepático más común en países desarrollados, llegando a afectar del 20 al 40% de la población en general, aumentando la prevalencia entre un 57.5 a 74 % en personas obesas. Entre los factores de riesgo que se asocian con mayor frecuencia a EHGNA se encuentran la obesidad, resistencia a la insulina y trastornos del metabolismo de TG. En la actualidad hay evidencia sobre la relación independiente entre los triglicéridos con el riesgo cardiovascular e hígado graso.

Una de las alternativas más económicas para prevenir esteatosis hepática e hipertrigliceridemia son el cambio en el estilo de vida. A pesar de la importancia clínica, no existe terapia efectiva demostrada contra EHGNA, sin embargo es recomendado el control de factores de riesgo, como es la HTG.

El uso de alimentos medicinales de la medicina popular para prevenir enfermedades como la diabetes, la obesidad, problemas cardiovasculares, esteatosis hepática está ganando impulso en la población. La chía es un alimento con diversos beneficios para la salud, especialmente en el mantenimiento de los niveles ideales de lípidos en sangre. Parece ser que este efecto es aportado principalmente por la presencia de ácidos grasos omega 3 en la semilla. Aunque la presencia de ingredientes activos en la semilla de chía garantiza beneficios para la salud, los estudios clínicos sobre la seguridad y eficacia de chía aún son limitados. Esta investigación tiene por objetivo aportar evidencia de que, el consumo de chía, puede contribuir positivamente en la disminución de esteatosis hepática así como en la disminución de triglicéridos séricos, además, es de suma importancia buscar alternativas nutricionales que puedan ayudar en el control de estas patologías; así, la chía puede ser una alternativa.

IV HIPÓTESIS

La ingesta de chía disminuye los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma y, así mismo, previene la esteatosis y daño hepático no alcohólico en ratas.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la ingesta de chía (*salvia hispanica* l.) en un modelo de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática agudo en ratas

5.2 Objetivos específicos

- Inducir la hipertrigliceridemia con tilaxapol y/o la EHGNA utilizando tetracloruro de carbono en ratas Wistar macho para establecer un modelo combinado agudo de estas patologías.
- Evaluar el efecto de la ingesta de chía sobre los marcadores de dislipidemia inducida con tiloxapol para evidenciar sus efectos hipolipemiantes y antiesteatogénicos.
- Determinar el efecto hepatoprotector y antioxidante de la ingesta de chía con marcadores de daño y estrés oxidativo ocasionado por tetracloruro de carbono, en hígado, para evidenciar su mecanismo de acción probable.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño de estudio

El estudio fue de tipo experimental y transversal.

6.2 Material vegetal

Las semillas de chía, proceden del estado de Guadalajara, se compraron en la Central de Abastos de la ciudad de Pachuca Hidalgo. La harina de la chía se obtuvo moliendo las semillas, realizado con molino analítico A11 BASIC IKA. Según se expresa en el Código Alimentario Argentino (2009) (CAA), art. 1407 bis (Res. Conj. 86/ 2009 SPReI y 711/2009 SAGPyA): “con la denominación harina de ‘chía’, se entiende el producto proveniente de la molienda de la semilla de ‘chía’, debiendo presentar esta última, características de semillas sanas, limpias y bien conservadas” (Figura 13).



Figura 13. Chía molida.

6.3 Grupos experimentales y dietas

Se utilizaron 64 ratas macho Wistar con un peso de 180-200 g. Los animales permanecieron en cajas plásticas a temperatura constante de 21°C, bajo ciclos de luz/obscuridad de 12 h y tuvieron acceso libre al agua purificada y alimento. Las ratas recibieron trato humanitario de acuerdo a los lineamientos institucionales y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), acerca de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se formaron ocho grupos, cuatro de los cuales correspondieron a grupos control, y los restantes a grupos con un daño inducido con tetracloruro de carbono y/o con tiloxapol (Triton WR 1339):

1. Grupo control de controles n=6

DE = Vehículo de tiloxapol (solución salina) + Vehículo del CCl₄ (aceite mineral) + dieta estándar

2. Grupo control de chía n=6

DC = Vehículo de tiloxapol + vehículo del CCl₄ + dieta chía

3. Grupo control dislipidémicos n=8

TI = Tiloxapol 400 mg/kg + Vehículo del CCl₄ + dieta estándar

4. Reto dislipidémicos n=8

TI + DC = Tiloxapol 400 mg/kg + vehículo del CCl₄ + dieta chía

5. Grupo control esteatosis y daño hepático n=8

TC = Vehículo de tiloxapol + CCl₄ 2.5 mL/kg + dieta estándar

6. Reto esteatosis y daño hepático n=8

TC + DC = Vehículo de tiloxapol + CCl₄ 2.5 mL/kg + dieta chía

7. Grupo control daño combinado n=10

TI + TC = Tiloxapol 400 mg/Kg + CCl₄ 2.5 mL/kg + dieta estándar

8. Reto daño combinado n=10

TI + TC + DC = Tiloxapol 400 mg/kg + CCl₄ 2.5 mL/kg + dieta chía

El TC fue disuelto en una relación 1:1 con aceite mineral, en un volumen que asegurara la administración de 2.5 mL/kg. La administración en cada uno de los grupos se realizó vía oral. El TI fue disuelto en solución salina isotónica al 0.85%, en un volumen que asegurara la administración de 400 mg/kg y fue administrado vía intraperitoneal.

Dietas

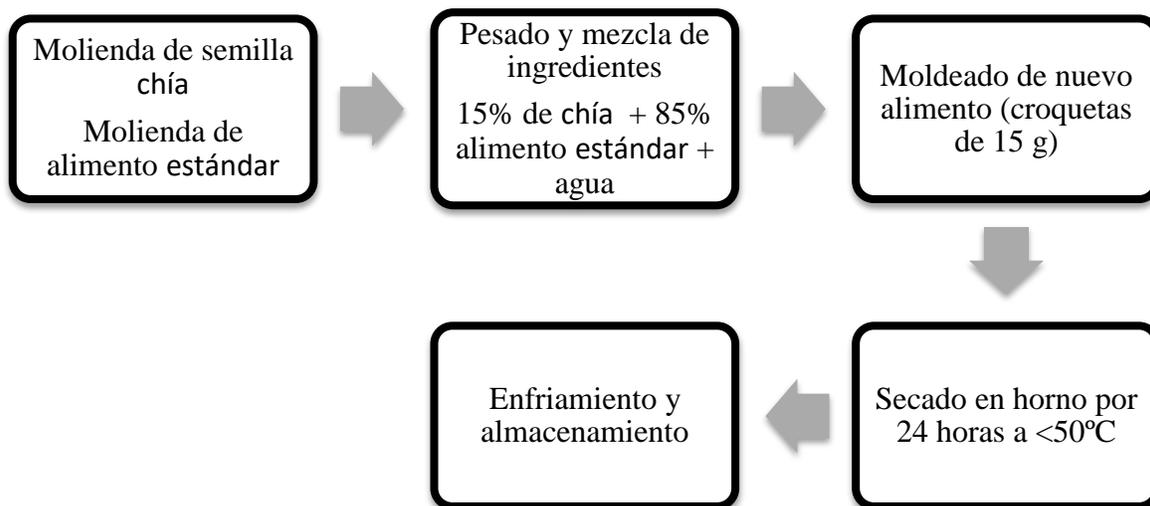
La DE comercial fue de laboratorio Chow (Rodent 5001), siendo ésta a libre demanda; y la DC (Tabla 10) fue una mezcla de alimento rodent 5001 adicionada con chía molida, posteriormente sometiéndolas a un secado en horno a menos de 50°C por 24 h. con fin de deshidratar el producto pero sin alterarlo térmicamente (Figura 13).

Tabla 10. Ingredientes de dieta chía y de dieta estándar.

Componentes	Dieta chía (%)	Dieta estándar (%)
Alimento comercial para roedor	85 g	100 g
Semilla de chía molida	15	--
Agua	100 mL	--

Fuente: elaboración propia.

Figura 13. Secuencia de operaciones para preparación dieta chíá



Porcentaje de pérdida de agua en la cocción

Se pesaron en balanza digital con precisión de ± 1 g los ingredientes a utilizar en cada fórmula. Tras el secado se obtuvo el peso cocido de las croquetas y a partir de la diferencia de masa entre croquetas se obtuvo el porcentaje de pérdida de agua durante la cocción.

6.4 Mediciones

6.4.1 Registro de masa corporal

Se realizó un registro de masa corporal de cada rata cada siete días, durante 4 semanas con la finalidad de observar cambios en la ganancia o pérdida de masa en los distintos grupos de estudio.

6.4.2 Determinación de parámetros bioquímicos en plasma y en hígado

Después de 4 semanas de que se inició el experimento las ratas se sacrificaron por exsanguinación con punción cardíaca bajo anestesia ligera con éter etílico. La sangre se colectó en una jeringa conteniendo heparina sódica (1000 U/mL); el hígado se removió y se lavó con solución salina (0.9%). Las muestras se conservaron en hielo para realizar las determinaciones bioquímicas en plasma e hígado, el plasma se obtuvo al centrifugar la sangre a 3000 rpm por 10 minutos.

Los parámetros fueron los siguientes:

Esteatosis hepática

Colestasis → FA, GGTP, Bilirrubinas totales

Necrosis → ALT

Estrés oxidativo y funcionalidad hepática → proteínas → peroxidación lipídica, glucógeno, catalasa

Dislipidemia → glucosa, triglicéridos y colesterol

Inmunomodulador y antiinflamatorio → TNF- α

En el plasma se determinó:

1. Actividad de FA.
2. Actividad de GGTP.
3. Bilirrubinas totales.
4. Actividad de ALT.
5. Glucosa.
6. Triglicéridos.
7. Colesterol total.
8. TNF- α plasmático

En hígado se determinó:

9. Grado de peroxidación lipídica.
10. Catalasa.
11. Cuantificación de proteínas
12. Cantidad de glucógeno.
13. TNF- α hepático
14. Muestras para histología (tinción de eosina /hematoxilina).

1. Determinación de FA

Método que se basa en la hidrólisis del *p*-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina para producir fosfato inorgánico y *p*-nitrofenol, el cual se lee a 410 nm (Berger y Rudolph, 1963; Bergmeyer *et al.*, 1983). La cantidad de *p*-nitrofenol se determinó a partir de una curva estándar de *p*-nitrofenol de 10 μ mol/mL con el fin de interpolar los resultados de las muestras y obtener su actividad enzimática.

Para medir la actividad enzimática se colocaron en cada uno de los tubos de ensayo, 0.25 mL de un amortiguador de glicina 0.1 M con MgCl₂ 1 mM a pH= 10.5 y 0.25 mL de *p*-

nitrofenilfosfato. Los tubos se incubaron en baño de María a 37°C por 5 minutos, enseguida se adicionaron 50 µL de plasma, se mezcló y se incubó por 30 minutos a la misma temperatura anterior. Transcurrido este tiempo se adicionaron 5 mL de NaOH 0.02 N, se agitó y se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 410 nm. El blanco se preparó con los reactantes descritos anteriormente, pero sustituyendo la muestra plasmática por agua.

2. Determinación de GGTP

Esta técnica utiliza como sustrato la glutamil-*p*-nitroanilida que en presencia de la enzima γ -1-glutamyl transpeptidasa y del receptor del grupo γ -1-glutamilo, como lo es glicil-glicina, produjo γ -glutamylglicina y *p*-nitroanilina que se cuantifica con un espectrofotómetro a 410 nm (Glossman y Neville, 1972) descrita a continuación:

En cada uno de los tubos se colocaron 400 µL de tris-HCl 200 mM a pH= 8.2, 100 µL de MgCl₂ 200 mM, 100 µL de glicil-glicina 40 mM pH= 8.2 y 200 µL de γ -glutamyl-*p*-nitroanilida 10 mM, los tubos se incubaron en baño de María a 37 °C durante 10 minutos, se agregaron 200 µL de plasma, se agitaron e incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo con 2 mL de ácido acético 1.5 M. El blanco se preparó de igual forma, pero agregando 200 µL de agua en lugar de plasma. Se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 410 nm.

3. Determinación de bilirrubinas

El método utilizado para cuantificar bilirrubinas, tanto directas como totales, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante del Kit, marca Teco Diagnostics (California, E.U.A.) que se basa en la reacción de la bilirrubina con ácido sulfanílico para formar un compuesto azoico que tiene una absorbencia máxima de 560 nm, por lo que la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de bilirrubinas.

4. Determinación de ALT

Este método se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Reitman y Frankel (1957). Se rotulan los tubos para la muestra problema y un tubo blanco por cada muestra; se agregaron 0.25 mL de sustrato a cada uno de los tubos, enseguida se adicionaron únicamente a los tubos problema 0.05 mL y todos los tubos se incuban durante una hora en baño de María a 37°C. Después se agregó a cada tubo 0.25 mL de reactivo cromógeno (blanco y problema) y únicamente a los tubos blanco 0.05 mL de plasma. Posteriormente, todos los tubos se incubaron en baño de María a la misma temperatura durante 15 minutos. Transcurrido el

tiempo se agregaron 2.5 mL de NaOH 0.4 N a todos los tubos, se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 515 nm.

5. Determinación de glucosa

Se utilizó el método enzimático descrito por el fabricante del Kit, marca Teco Diagnostics, y se basa en que la β -D-glucosa oxida a la glucosa para producir ácido D-glucónico y peróxido de hidrógeno. El hidrógeno producido se acopla oxidativamente con 4-aminoantipirina y un sustituto de fenol, pHBS, en la presencia de peroxidasa para dar un colorante rojo quinoneimina. La cantidad del complejo coloreado formado es proporcional a la concentración de glucosa y se puede medir fotométricamente.

6. Determinación de triglicéridos

El procedimiento involucra la hidrólisis de triglicéridos por la lipasa. Luego se determina la concentración del glicerol por prueba enzimática en conjunto con la reacción de Trinder que finaliza con la formación de un tinte de quinoneimina color rojo. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra medida a 520 nm. Se utilizó el método establecido por el Kit enzimático de la marca Teco Diagnostics.

7. Determinación de colesterol total

Se utilizó el método enzimático descrito por el fabricante del Kit, marca Teco Diagnostics (California, E.U.A.), y se basa en la oxidación del colesterol donde se usa el peróxido de hidrogeno junto con peroxidasa, 4-aminoantipirina, y fenol para formar una tinta quinonaamina. Este reactante emplea el ácido hidroxibencensulfónico, en lugar de fenol para producir un tinte quinoneimina con mayor absorbencia a 520 nm y un surfactante para facilitar la reacción.

8. TNF- α plasmático

Se utilizaron kits marca Invitrogen E.U.A, para cuantificación de TNF- α por el método de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, por sus siglas en inglés y Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, en español). La técnica se siguió tal cual está descrita por el proveedor. Las concentraciones plasmáticas están expresadas como pg/mL. La mínima concentración detectable para el TNF- α es <4 pg/mL.

9. Determinación del grado de peroxidación lipídica

Método que se basa en la reacción de dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) con una molécula de malondialdehído (MDA) formando un complejo colorido, el cual se lee a 532

nm (Buege y Aust, 1978). Para llevar a cabo la determinación se realizó el siguiente procedimiento:

Se pesaron 0.5 g de hígado, se homogenizaron con 5 mL de agua. Se tomaron alícuotas de 300 μ L y se adicionaron 700 μ L de Tris-HCl 150 mM; los tubos se incubaron a 37° C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se agregaron 2 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético al 15%, se taparon los tubos y se colocaron en ebullición por un período de 45 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm; el sobrenadante se utilizó para la lectura en el espectrofotómetro.

10. Catalasa

La catalasa descompone al agua oxigenada en agua y oxígeno. La técnica espectrofotocolorimétrica se fundamenta en cuantificar el agua oxigenada remanente que reacciona con un exceso estándar de permanganato de potasio (forma óxido de manganeso) y posteriormente medir el permanganato de potasio residual en un espectrofotómetro.

Una pieza de 0.5 g de hígado de rata se homogeniza en 5 mL de PBS fría con 20 golpes en homogenizador de vidrio con pistilo de teflón. El homogenizado se centrifuga a 3000 rpm por 6 minutos. Se toma una alícuota de 1 mL de sobrenadante (homogenado aproximadamente al 10 % m/v) en un tubo de ensaye de 13 x 100 en hielo, a ésta se le agregan 10 μ L de etanol (aproximadamente 0.01 mL EtOH/mL de sobrenadante, queda así a 0.17 M de EtOH), mezclar y dejar incubar por 30 min en hielo. Después de este tiempo se añaden 100 μ L de tritón al 10 %, queda así en una concentración final del 1 % y se mezclan bien. De esta mezcla de homogenado se toman 100 μ L y se agregan a 4.9 mL de PBS, se mezclan bien para producir una dilución de 50 veces (la técnica original es con hígado de ratón y la dilución final es de 100 veces, se decidió entonces sólo diluir a 50 veces considerando una alta actividad enzimática en hígado, pero menor actividad en rata que en ratón).

11. Determinación de proteínas

Se aplicó la técnica descrita por Bradford (1976). Para lo cual se colocaron en tubos de ensayo 100 μ L del homogenado (preparado para determinar peroxidación lipídica) y 900 μ L de agua. Se tomaron alícuotas de 20 μ L de la mezcla preparada anteriormente y se llevaron a un volumen final de 100 μ L con agua; se preparó un tubo blanco con 100 μ L de agua destilada, se agregaron 2.4 mL de reactivo de Bradford y se tomó la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm.

El valor de la concentración de proteínas en la muestra se determinó mediante una curva de calibración que se preparó colocando 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 μL de una solución de albúmina sérica bovina (1mg/mL) y aforando cada uno a 100 μL .

11. Determinación de glucógeno hepático

La determinación de glucógeno se llevó a cabo con base en la reacción colorimétrica de antrona con glucosa (Seifter *et al.*, 1950), la cual se obtiene de la digestión de la muestra de hígado con hidróxido de potasio (KOH), técnica descrita a continuación:

Se colocaron 0.5 g de hígado en tubos esmerilados, se adicionaron 1.5 mL de KOH (30%), se taparon y se calentaron a ebullición durante media hora. El contenido de los tubos se vació cuantitativamente en matraces volumétricos de 25 mL, se realizó el aforo; de la solución anterior se tomaron muestras de 40 a 160 μL , se llevaron a 1 mL con agua; el blanco se preparó con 1 mL de agua destilada. Se prepararon dos estándares con 20 μL glucosa (1 mg/mL) y 80 μL de agua. A cada uno de los tubos se agregaron 2 mL de antrona (0.2 % en H_2SO_4 concentrado), se calentaron los tubos a ebullición durante 15 min y finalmente se enfriaron sobre hielo, se leyeron en un espectrofotómetro a 620 nm.

12. TNF- α hepático

Se realizó la prueba comercial de ELISA de TNF- α (Invitrogen E.U.A) de acuerdo al protocolo del fabricante. Para obtener los extractos de hígado, se pesaron muestras de 0.5 g y se homogenaron en hielo con 5 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) fría a pH 7.4, que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (Tablets Complete Roche, Alemania). Los homogenados se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 min a 15 °C. La mínima concentración detectable para el TNF- α es <4 pg/mL. Las cantidades hepáticas de TNF- se calcularon para 1 g de tejido húmedo en 5 mL de PBS. Las concentraciones plasmáticas están expresadas como pg/mL y las cantidades hepáticas se expresan como pg/mg de tejido.

13. Histología

Se analizaron las muestras de tejido hepático de los ocho grupos tratados. Éstas fueron procesadas en el CINVESTAV de la ciudad de México, con el apoyo de la Dra. Elizabeth Pérez Hernández. Se aplicó la tinción de hematoxilina/eosina que muestra el núcleo de los hepatocitos de color azul y el citoplasma color rosa, también permite observar el músculo en tonos rojizos y los glóbulos rojos de color naranja-rojizo, además de la fibrina en rosa intenso técnico que se describe a continuación: Las rebanadas de tejido (conservadas

previamente en solución fijadora de formaldehído al 10% en solución salina de fosfatos, PBS) se desparafinaron y rehidrataron con xileno, etanol absoluto y etanol al 95 %, enseguida se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 minutos, se lavaron con agua por 2 minutos. Las muestras se diferenciaron en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones y se observaron al microscopio donde se distinguió el color de los núcleos (azul). Posteriormente, las muestras se lavaron con agua, se sumergieron en agua amoniacal o en solución saturada de carbonato de litio, se lavaron con agua de 10 a 20 minutos, se tiñeron con eosina, se lavaron con etanol al 95%, etanol absoluto (al menos 2 cambios) y xileno (al menos 2 cambios), para finalmente montar las muestras en el polímero Permount o bálsamo.

6.5 Análisis estadístico

Los valores se presentan como media \pm error estándar. A cada uno de los grupos experimentales se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía, la cual lleva a cabo una comparación de todos los grupos contra todos, mediante la denominada comparación múltiple pareada total del método de Student-Newman-Keuls; prueba que proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una $P < 0.05$. La prueba t-Student, se utilizó cuando se tenían 2 muestras apareadas, y se deseaba obtener la comparación de un grupo contra otro. El análisis se realizó en un paquete de Sigma-Stat versión 3.1 (SYSTAT Co. USA). Las gráficas que se presentan como parte de los resultados involucran el promedio de cada uno de los datos obtenidos de los grupos, a partir de las determinaciones bioquímicas (FA, GGTP, BT, ALT, glucosa, TG, CT, TNF- α , CAT, glucógeno) y \pm error estándar indicado en la parte superior. En cada grupo se eliminaron valores aberrantes y fuera del promedio, manteniendo al menos 4 de un total de 6-10 animales por grupo.

VII RESULTADOS

7.1 Análisis de composición química de dieta chíá

Se hizo un análisis químico de la croqueta de alimento balanceado para roedor con chíá, este análisis se realizó en el Área Académica de Nutrición de la UAEH y fue comparada con la DE (Tabla 11) reportada en la etiqueta del producto (Rodent Lab Chow 5001):

Tabla 11. Análisis bromatológico de dieta chíá (% en 100 g) y de dieta estándar.

Componentes	Dieta chíá (%)	Dieta estándar (%)
Humedad	9.53 ± 0.2 ^a	12.0
Proteína	30.68 ± 0.38 ^a	23.9
Grasa	8.73 ± 0.1 ^a	5.0
Cenizas	7.32 ± 0.1 ^a	7.0
Carbohidratos totales	35.24 ± 0.2 ^a	48.7
Fibra dietética	8.5 ± 0.3 ^a	5.1

Cada valor representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado o triplicado, ± error estándar. a: diferente de dieta estándar (DE). $p < 0.05$, prueba t de Student.

Como se aprecia en la Tabla 11, la proteína, grasa, cenizas y fibra dietética fueron más altos en la DC que en la DE, aportándose así 6.78% más de proteínas, 3.73% de grasa y 3.4% de fibra dietética alcanzando un nivel de significancia; la humedad y carbohidratos fueron significativamente menores en la DC. Todos estos valores indican que la DC mantiene un alto valor nutricional.

7.2 Masa corporal y masa hepática

En la Tabla 12 y la Figura 14 se observa que durante las tres primeras semanas la ganancia de masa corporal fue muy similar entre el grupo alimentado con DE y el alimentado con DC; sin embargo, la masa final (cuarta semana) del grupo que consumió DC es significativamente menor con respecto a la de DE.

Tabla 12. Masa corporal (g) por semana.

Masa corporal					
Grupo	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Dieta chíá	198.40±2.86	227.63±3.69 ^a	260.54±4.03	279.06±6.06	286.75±7.51 ^a
Dieta estándar	201.95±2.40	234.25±2.90	262.93±3.94	281.75±6.43	301.19±7.37

Cada valor representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado o triplicado, ± error estándar. a: diferente de dieta estándar (DE). $p < 0.05$, prueba t de Student.

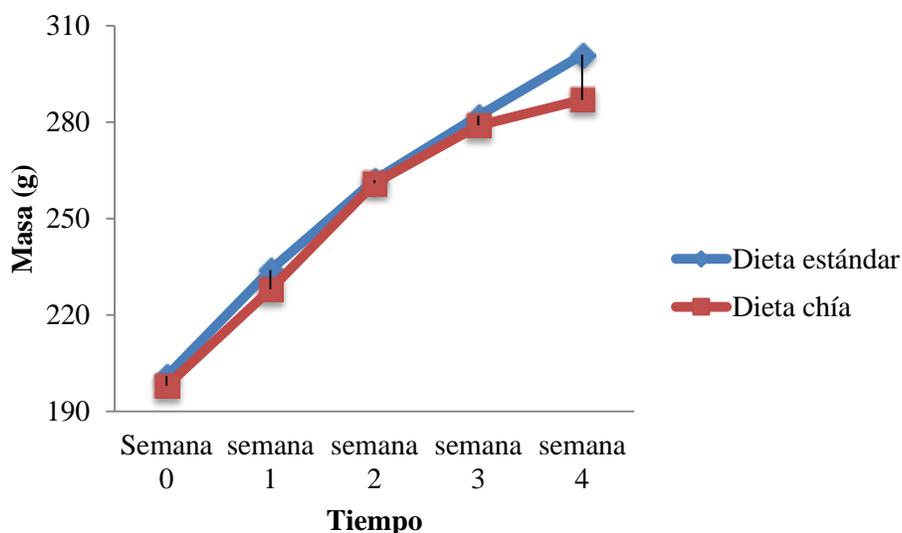


Figura 14. Curva de masa durante 4 semanas con dieta estándar o control (DE), dieta estándar + semilla de chía (DC). Los valores son expresados como media \pm error estándar. Treinta y dos animales se incluyeron en cada grupo experimental. a: diferente de dieta estándar (DE). $p < 0.05$, prueba t de Student.

El consumo promedio que consumían los roedores con DC fue de 21.3 ± 0.71 g/rata/día ($p < 0.05$) vs. 23 ± 1.04 g g/rata/día el grupo DE, siendo el grupo con DC el que consumió menos gramos de alimento.

Así mismo, los grupos que consumieron DE presentaron ligeramente una mayor cantidad de masa hepática (Tabla 13) que los grupos que consumieron DC, que resulta proporcional a la masa corporal obtenida para cada grupo.

Tabla 13. Masa hepática (g) al final de la investigación.

Masa hepática	
Dieta chía	9.99 ± 0.39^a
Dieta estándar	10.75 ± 0.38

Cada valor representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado o triplicado, \pm error estándar. a: diferente de dieta estándar (DE). $p < 0.05$, prueba t de Student.

7.3 Determinación de parámetros bioquímicos en plasma y en hígado

7.3.1 Actividad de fosfatasa alcalina

La Figura 15 muestra la actividad de FA, marcador de colestasis, que se elevó varias veces por la administración del TI, al doble por la administración del TC, y, de forma inesperada, también se incrementó debido a la DC sola, incluso a un nivel similar del inducido por el TI y al que se produjo por el daño mixto (TI + TC). Sin embargo, la alimentación con DC previno el incremento de este marcador entre un 50-70 % en los tres grupos con daño, por TI, TC, o mixto ($p < 0.05$); por lo tanto, se sugiere que la DC no sea un agente

procolestático *per se*, sino que el efecto observado puede ser una inducción directa sobre la actividad enzimática de FA.

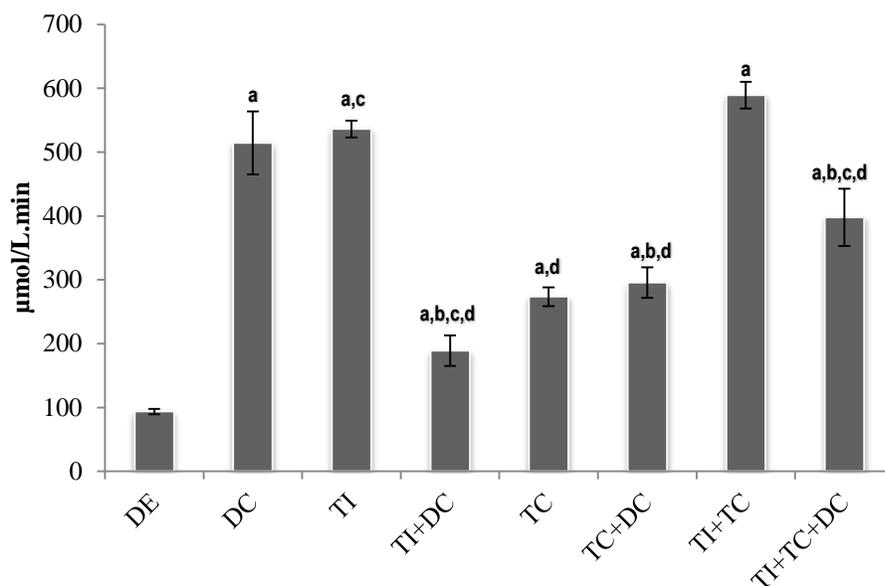


Figura 15. Actividad de fosfatasa alcalina ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$) determinada en muestras de plasma de ratas. Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.2 Actividad de *gamma* glutamil-transpeptidasa

La actividad enzimática del marcador más sensible de colestasis, la GGTP, se muestra en la Figura 16. La alimentación con DC no modifica el valor normal de GGTP, al ser comparado con el grupo control normal que consumió DE; por el contrario, la actividad de esta enzima se elevó ostensiblemente en el plasma del grupo administrado con TI ($p < 0.05$), y en el grupo dañado con TC, aunque éste no alcanzó a ser significativamente diferente al grupo control; empero, el daño mixto sí elevó de manera significativa a este indicador. La ingesta de DC previno parcialmente el incremento de la actividad de GGTP en el grupo dañado con TI y completamente su elevación en el grupo dañado con TC ($p < 0.05$), aunque no previno el incremento marcado provocado por la administración combinada de ambos toxones.

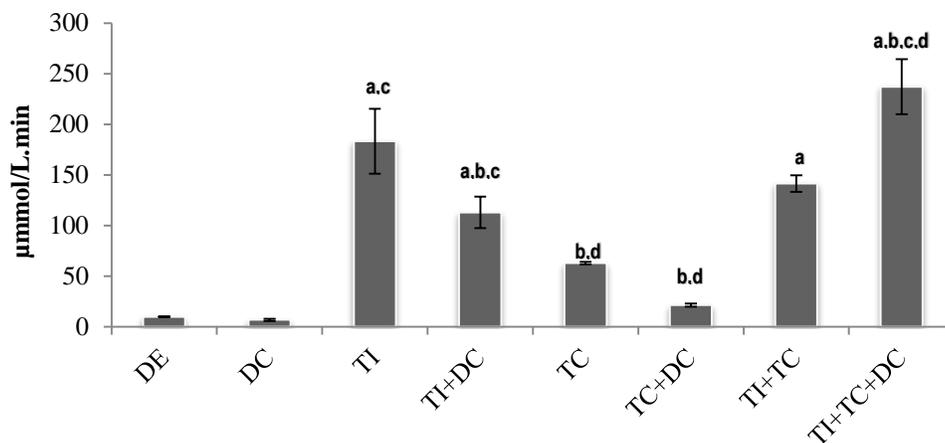


Figura 16. Actividad de gamma glutamyl-transpeptidasa ($\mu\text{mmol/L}\cdot\text{min}$). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.3 Bilirrubinas totales

La concentración de BT indica funcionalidad hepática y colestasis, porque expresa la regurgitación de esos compuestos a la sangre. La concentración de BT en las ratas del grupo control fue indetectable, no así en el grupo alimentado con DC, pues se elevó más del triple ($p < 0.05$); también, su concentración se incrementó de forma creciente y significativa por la administración de TI, TC, y más con el daño por ambos toxones, pues la elevó 5 veces (ver Figura 17). Sin embargo, nuevamente la ingesta de DC abolió tales aumentos y mantuvo la concentración de BT dentro del nivel normal. Este efecto refuerza la sugerencia de que la DC no es procolestática per se, como se vio con FA, sino que tal vez incrementa el metabolismo o producción de las bilirrubinas.

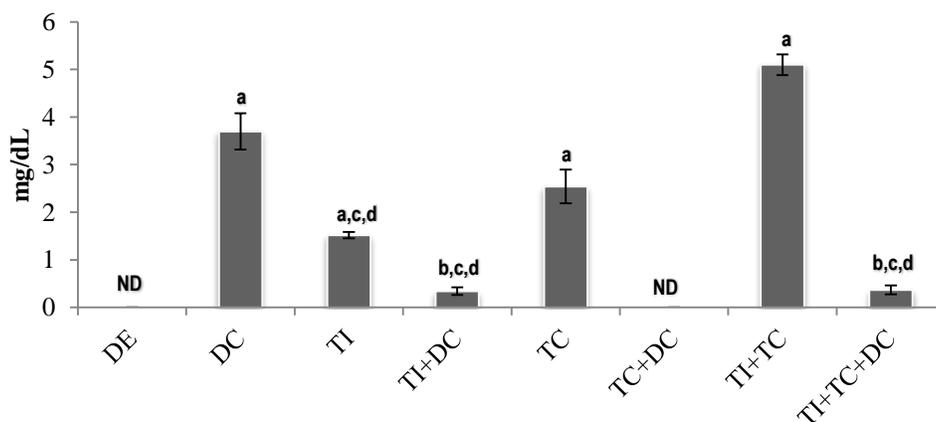


Figura 17. Actividad de bilirrubinas totales (mg/dL). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a:

diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.4 Actividad de alanina-aminotransferasa

En la gráfica de la Figura 18 se presenta la actividad enzimática de la ALT, un marcador de necrosis. La ingesta de DC no modifica el valor normal de este indicador, al ser comparado con el grupo control normal alimentado con DE, pero su actividad enzimática se eleva al doble por la administración del TI, o por el daño mixto (TI + TC), e incluso se incrementa un 300% por el daño inducido con el TC solo. La alimentación con DC redujo casi a un nivel normal la actividad de ALT provocada por el TI, aunque no alcanzó significancia estadística; en contraste marcado, la DC previno completamente el incremento de la ALT, inducido por TC o por el daño mixto, e incluso lo disminuyó más allá del nivel normal ($p < 0.05$).

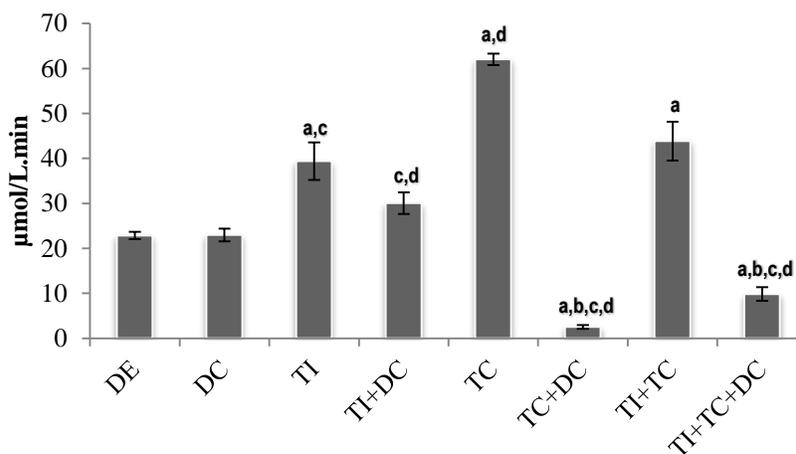


Figura 18. Actividad de alanina-aminotransferasa ($\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.5 Grado de peroxidación lipídica

Los resultados recabados del grado de peroxidación lipídica (PL), marcador de estrés oxidativo membranal, se detallan en la Figura 19. Como se observa, la PL se incrementó inesperadamente y de manera significativa por la ingesta de DC; también, se elevó marcadamente por la administración de TI, y aún más por el daño con TC, así como mostró un incremento por el daño mixto, similar al inducido por el TI ($p < 0.05$). Precisamente, la ingesta de DC no previno la PL generada por el TI, aunque previno parcial y significativamente el aumento de este marcador inducido con el TC; por el contrario, la DC

mantuvo dentro del valor normal a la PL durante el daño dual con TI + TC, comparado con el grupo control sano.

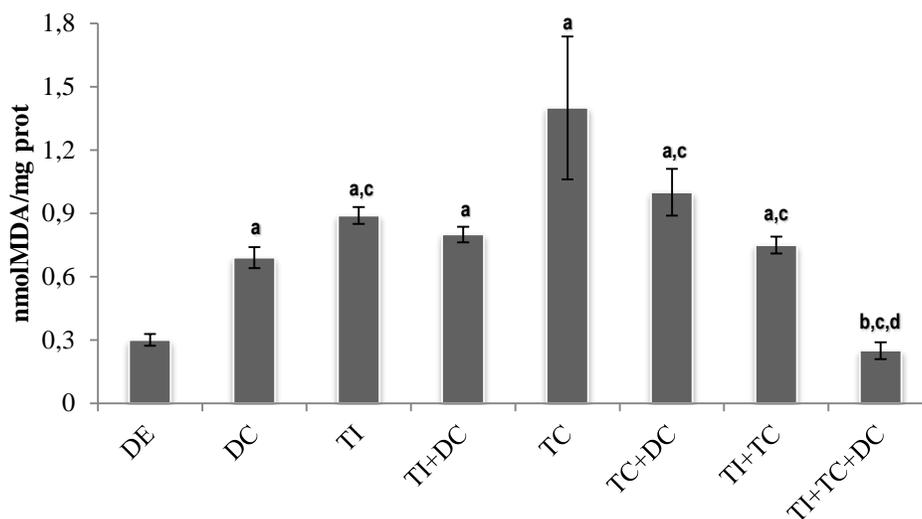


Figura 19. Grado de lipoperoxidación (nmolMDA/mgprot). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.6 Catalasa

CAT es una enzima citosólica que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2); durante el daño hepático, la actividad enzimática de CAT disminuye, con lo que se incrementa la concentración de H_2O_2 , lo que provoca estrés oxidativo. La Figura 20 presenta los valores de actividad enzimática CAT. El consumo de DC reduce ligeramente, pero de forma significativa, la actividad de CAT, así como el TI y más aún el TC solo; sorprendentemente, la actividad de CAT durante la administración dual, con TI + TC, no muestra diferencia con respecto al grupo normal. La alimentación con DC previene de forma significativa la disminución de la actividad enzimática de CAT, por la administración de TI y de TC, aunque la reduce parcialmente durante el daño combinado.

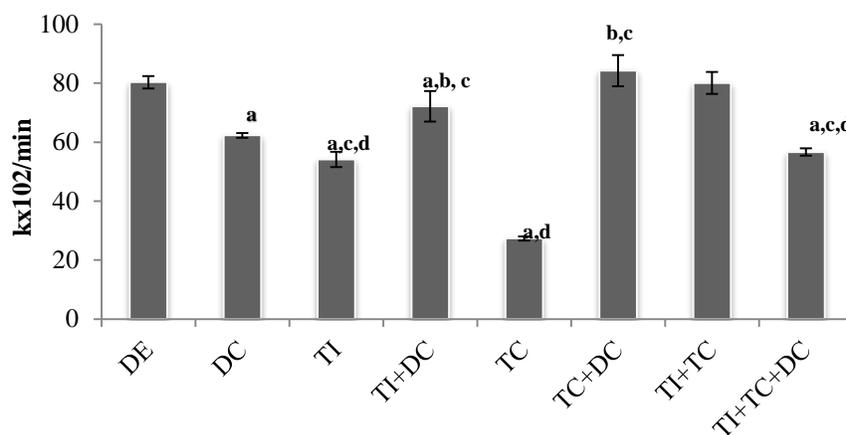


Figura 20. Actividad de catalasa ($kx10^2/min$). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p<0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.7 Glucógeno hepático

El glucógeno (Figura 21) es la fuente principal de carbohidratos en el organismo, y la cuantificación de éste es de gran importancia, porque refleja la disfuncionalidad y el estrés hepático. Se observó que el nivel de glucógeno hepático no se modifica por la DC, pero prácticamente se depletó por el daño inducido con TI, TC, y mixto. La alimentación con DC no logró elevar al glucógeno a la normalidad por la administración del TI, y aunque sí mantiene de forma parcial el contenido de glucógeno durante la administración de TC, este valor no logra alcanzar el nivel normal; asimismo, el daño dual abole el glucógeno hepático sin que la DC lo prevenga.

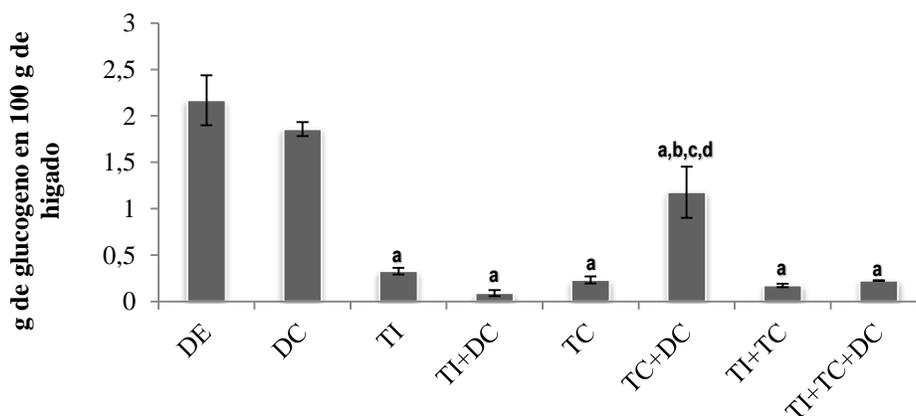


Figura 21. Cantidad de glucógeno (glucógeno/100 g de hígado). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p<0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.8 Glucosa

La glucosa es la fuente más importante de energía para la mayoría de las células del cuerpo, por ejemplo, las del cerebro. Las hormonas producidas en el cuerpo ayudan a controlar los niveles de glucosa en la sangre, los incrementos de la glucosa pueden indicar una alteración en el metabolismo de carbohidratos o una resistencia a insulina. No se observan cambios importantes en las concentraciones de glucosa en los grupos tratados con DE con o sin daño, de igual forma la DC no altera las concentraciones de glucosa en los grupos tratados con esta dieta (Figura 22).

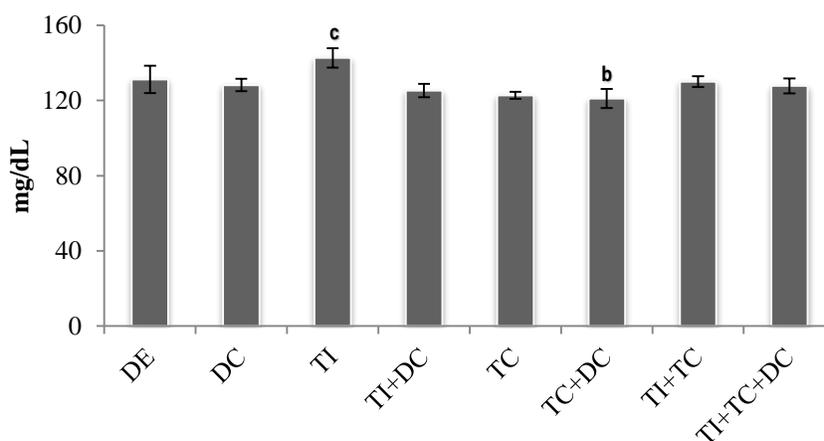


Figura 22. Concentraciones de glucosa (mg/dL). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.9 Triglicéridos

La elevación de TG en plasma indica daño por dislipidemia; su incremento está relacionado con enfermedades cardiovasculares, pancreatitis, y daño hepático. La Figura 23 muestra que la DC no modifica el valor normal de TG en plasma pero, como se esperaba, la administración de TI provoca una HTG muy marcada. Por el contrario, el TC no altera los valores normales, pero el daño combinado induce una HTG similar a la observada con TI solo. El consumo de DC disminuyó de manera parcial pero importante ($p < 0.05$) la HTG generada por el TI; también, mantuvo los niveles normales durante el daño con TC, y causó una disminución ligera, aunque significativa, en el nivel de HTG promovido por el daño dual (TI + TC).

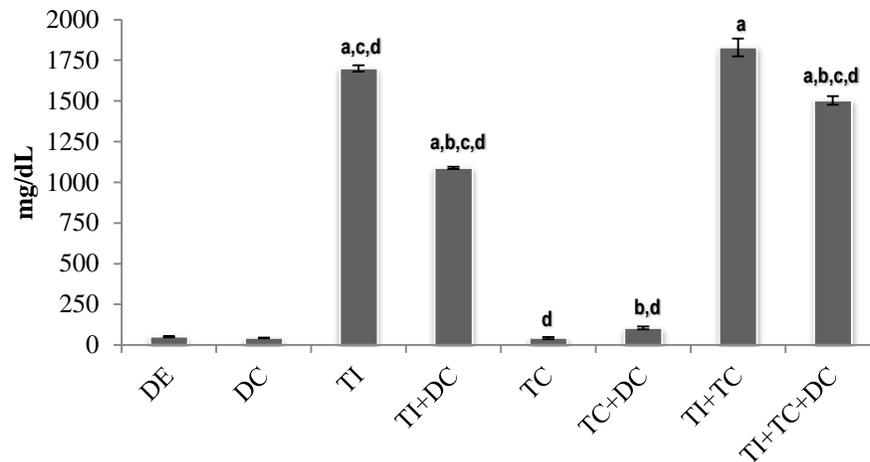


Figura 23. Concentraciones de triglicéridos (mg/dL). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.10 Colesterol total

El incremento de CT en plasma también indica daño por dislipidemia, y está relacionado con enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Como se observa en la Figura 24, la DC no modifica el valor bajo y normal de CT en plasma pero, como se esperaba, la administración de TI provoca un incremento del CT muy marcado. Asimismo, el TC eleva ligeramente la colesterolemia, aunque de manera significativa, mientras que el daño combinado provoca un aumento mayor en el CT, pero menor al de TI solo. El consumo de DC disminuyó de manera parcial pero importante ($p < 0.05$) el CT en plasma inducido, por el TI; también, mantuvo los niveles normales durante el daño con TC, y causó una disminución ligera, pero no significativa en el nivel de CT promovido por el daño dual (TI + TC).

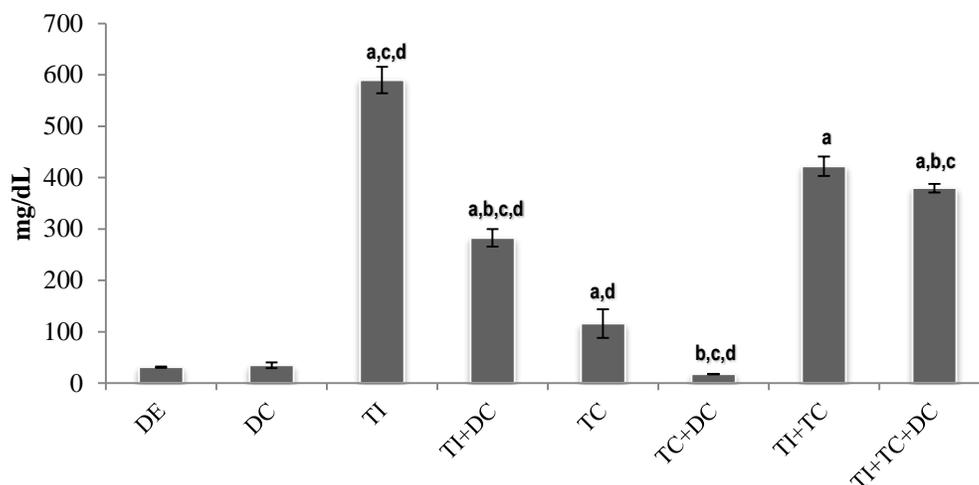


Figura 24. Concentraciones de colesterol total (mg/dL). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.3.11 *TNF- α plasmático y hepático*

El TNF- α es una citocina proinflamatoria, pronecrótica y procolestática. La Figura 25A, muestra los valores normales de TNF- α plasmático del grupo control de DE, que no son alterados por la DC, ni por la administración de TI; empero, el daño inducido por TC sí causa un incremento de esta citocina y, por el contrario, el daño mixto no lo eleva. Sin embargo, la DC concomitante al daño con TI aumenta de forma significativa la concentración plasmática de TNF- α , aunque la DC sí inhibe el incremento de esa citocina en el grupo administrado con TC, alcanzando casi su nivel normal ($p < 0.05$), como también ocurre en el grupo de daño combinado. En la Figura 25B la cantidad hepática de TNF- α se mantiene prácticamente dentro de valores normales, sin importar el tratamiento de dieta o deletéreo, en varios grupos; sin embargo, la DC produce una disminución significativa de esos valores en el grupo administrado con TC y daño mixto (TI + TC).

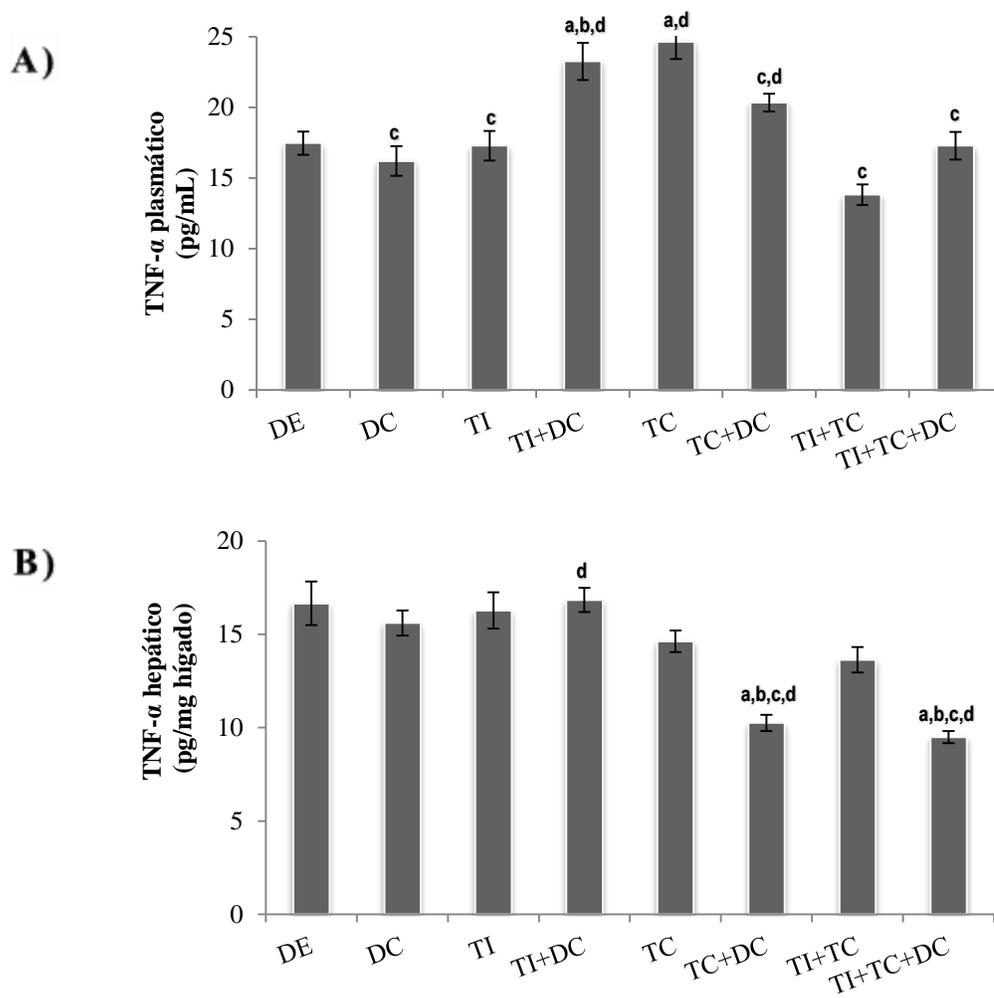


Figura 25. A) Concentraciones de TNF- α plasmático (pg/mL) y B) TNF- α hepático ((pg/mg). Cada barra representa el promedio de cada uno de los grupos experimentales realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales \pm error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado $p < 0.05$, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls.

7.4 Resumen de pruebas bioquímicas en plasma e hígado

La Tabla 14 resume los resultados mostrados con anterioridad en los gráficos, aquí se puede ver un copilado de los valores de cada marcador de daño realizados.

Tabla 14. Resultados de marcadores de daño hepático y dislipidemia de los 8 grupos experimentales.

DETERMINACIÓN	GRUPO CONTROL			GRUPOS CON DAÑO Y SU RETO				
	DE	CHÍA	TI	TI+DC	TC	TC+DC	TI+TC	TI+TC+DC
FA (μmol/L.min)	93.8 ± 4.3	514.63 ± 49.4 ^a	536.32 ± 13.2 ^{a,c}	189.05 ± 24.0 ^{a,b,c,d}	273.57 ± 14.5 ^{a,d}	295.72 ± 24.1 ^{a,b,d}	589.13 ± 20.8 ^a	397.85 ± 44.8 ^{a,b,c,d}
GGTP (μmol/L.min)	10.0 ± 0.24	6.97 ± 1.1	183.37 ± 32.2 ^{a,c}	113.08 ± 15.5 ^{a,b,c}	63.0 ± 1.3 ^{b,d}	21.56 ± 1.7 ^{b,d}	141.59 ± 8.3 ^a	237.18 ± 27.2 ^{a,b,c,d}
BT (mg/dL)	ND	3.7 ± 0.38 ^a	1.52 ± 0.07 ^{a,c,d}	0.343 ± 0.08 ^{b,c,d}	2.54 ± 0.35 ^a	ND ^{b,c,d}	5.1 ± 0.22 ^a	0.37 ± 0.09 ^{b,c,d}
ALT (mmol/L.min)	22.86 ± 0.79	22.95 ± 1.4	39.37 ± 4.2 ^{a,c}	30.03 ± 2.4 ^{c,d}	62 ± 1.3 ^{a,d}	2.54 ± 0.40 ^{a,b,c,d}	43.84 ± 4.3 ^a	9.84 ± 1.5 ^{a,b,c,d}
Peroxidación lipídica (nmolMDA/mg de prot.)	0.3 ± 0.03	0.69 ± 0.05 ^a	0.89 ± 0.04 ^{a,c}	0.8 ± 0.04 ^a	1.4 ± 0.33 ^a	1.0 ± 0.11 ^{a,c}	0.75 ± 0.04 ^{a,c}	0.25 ± 0.04 ^{b,c,d}
CAT (kx10 ² /min)	80.33 ± 2.07	62.31 ± 0.8 ^a	54.16 ± 2.6 ^{a,c,d}	72.17 ± 5.1 ^{a,b,c}	27.32 ± 0.66 ^{a,d}	84.26 ± 5.3 ^{b,c}	80.09 ± 3.7	56.66 ± 1.2 ^{a,c,d}
Glucógeno (g/100 de hígado)	2.17 ± 0.3	1.86 ± 0.08	0.33 ± 0.04 ^a	0.09 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.04 ^a	1.18 ± 0.28 ^{a,b,c,d}	0.17 ± 0.0 ^a	0.23 ± 0.004 ^a
Glucosa (mg/dL)	131.2 ± 7.3	128.27 ± 3.3	142.72 ± 5.2 ^c	125.29 ± 3.5	122.75 ± 1.9	121.04 ± 5.06 ^b	130.09 ± 2.9	127.79 ± 3.9
Triglicéridos (mg/dL)	51.5 ± 4.6	43.73 ± 2.2	1699.9 ± 19.04 ^{a,c,d}	1088.47 ± 6.8 ^{a,b,c,d}	43.59 ± 6.8 ^d	104.72 ± 9.01 ^{b,d}	1829.12 ± 53.9 ^a	1503.33 ± 26.9 ^{a,b,c,d}
Colesterol total (mg/dL)	31.3 ± 1.2	34.76 ± 5.3	590.06 ± 25.6 ^{a,c,d}	282.77 ± 17.1 ^{a,b,c,d}	115.93 ± 27.8 ^{a,d}	17.72 ± 0.61 ^{b,c,d}	421.99 ± 18.8 ^a	379.57 ± 8.2 ^{a,b,c}
TNF-alfa hígado (pg/mL)	16.66 ± 1.1	15.61 ± 0.6	16.62 ± 0.9	16.83 ± 0.64 ^d	14.62 ± 0.57	10.25 ± 0.43 ^{a,b,c,d}	13.63 ± 0.6	9.49 ± 0.31 ^{a,b,c,d}
TNF-alfa plasma (pg/mL)	17.46 ± 1.6	16.2 ± 2.33 ^c	17.28 ± 2.5 ^c	23.32 ± 2.6 ^{a,b,d}	24.64 ± 3.0 ^{a,d}	20.32 ± 1.6 ^{c,d}	13.82 ± 2.0 ^c	17.28 ± 2.4 ^c

Resultados obtenidos para los marcadores de daños determinados en muestras de hígado y plasma de los diferentes grupos experimentales. Cada valor representa el valor promedio de los experimentos realizados por duplicado o triplicado, n de 6 a 10 animales ± error estándar. a: diferente vs. grupo control. b: diferente vs. grupo TI. c: diferente vs. grupo TC. d: diferente vs. daño combinado p<0.05, ANOVA, prueba Student-Newman-Keuls. Los grupos marcados son los grupos reto.

7.5 Histologías

A. Sólo se identifica parénquima, no se aprecian espacios portales ni vena centrolobulillar, disposición habitual en cordones de placas y sinusoides.

B. La administración de TI causó necrosis pronunciada con micro y macro vacuolización e inflamación del parénquima.

C. En el extremo derecho se observa un agregado de histiocitos de morfología espumosa con necrosis balonzante. En el extremo izquierdo parte de la triada portal. No se observan con claridad los hepatocitos y su disposición por la inflamación congestiva.

D. En el centro una vena centrolobulillar, disposición de cordones y hepatocitos habitual. Los sinusoides muestran discreta dilatación en la zona que emerge de la vena centrolobulillar, y se observa escasa leucostasis (muy escasos linfocitos en los espacios sinusoidales).

E. Se observa un espacio portal parcial, discreta dilatación sinusoidal, leucostasis. Aunque no se aprecian claramente los hepatocitos al parecer hay escasos cambios regenerativos, es decir, binucleación, nucleolos aparentes. Se observa un pequeño agregado de células en el parénquima, posiblemente células inflamatorias mononucleares.

F. Se identifica una vena centrolobulillar, leve dilatación sinusoidal y leucostasis, datos de regeneración hepatocelular.

G. Se observa un espacio porta completo, congestión, edema leve de hepatocitos.

H. Se identifica un espacio porta y dos venas centrolobulillares, leucostasis y cambios leves de regeneración hepatocelular.

Se observa que en conclusión los grupos que fueron administrados con los toxones y que consumieron DC hubo una disminución de la acumulación hepática de lípidos e impidió la progresión de esteatosis microvesicular (Figura 26). El análisis histológico mostró que los animales administrados con TI y/o TC presentan algún grado microvesicular de esteatosis.

Parece que la chía ejerce un efecto hepatoprotector.

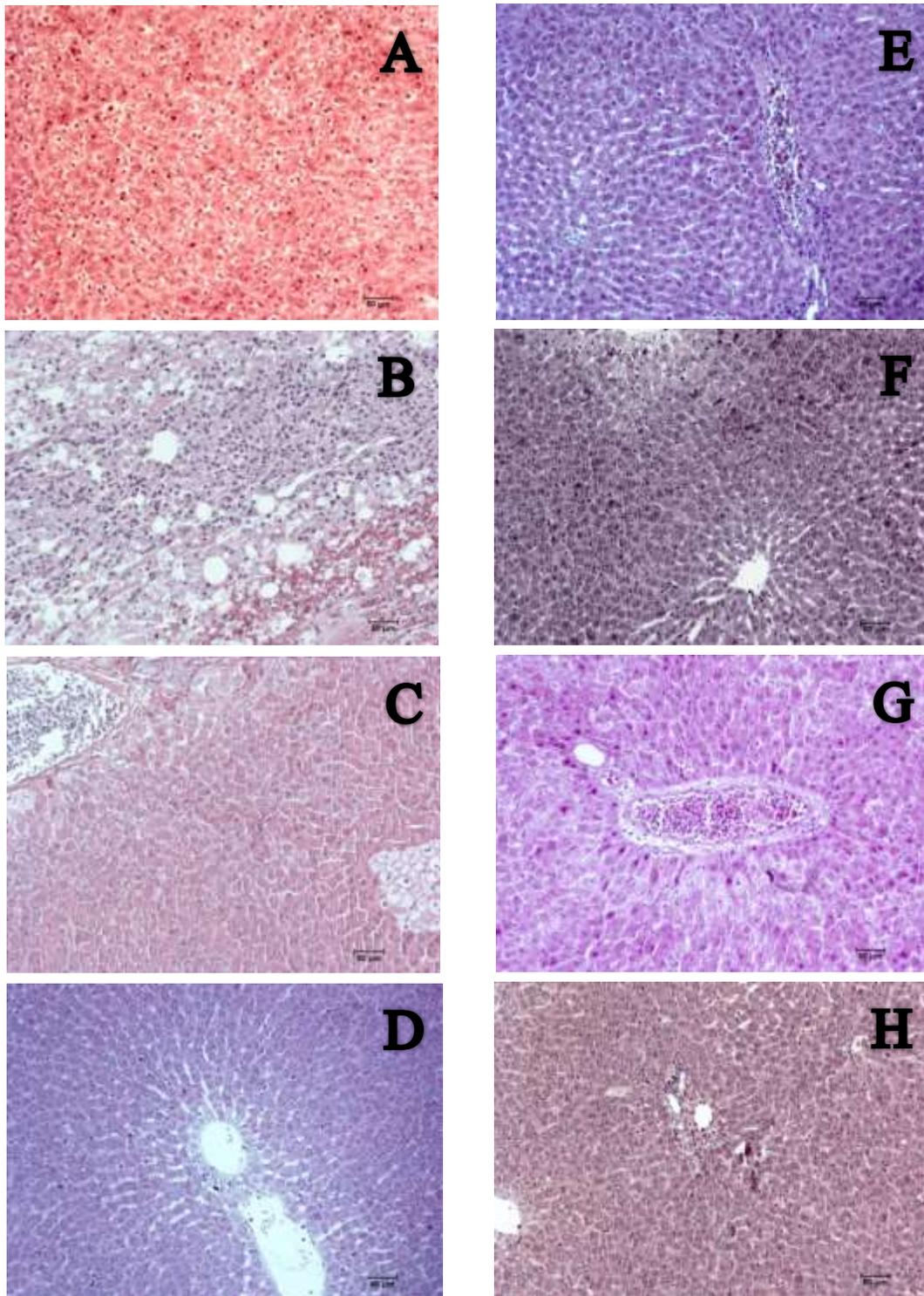


Figura 26. Panel de fotografías de los resultados histológicos con tinción de hematoxilina/eosina, donde se muestra un tejido hepático representativo de los grupos experimentales A: Control, B: Tiloxapol, C: Tetracloruro, D: Daño combinado, E: Dieta chía, F: Tiloxapol + dieta chía, G: Tetracloruro + dieta chía, H: Tiloxapol + tetracloruro + dieta chía.

VIII DISCUSIÓN

Como se ha mencionado, la chía es una de las fuentes vegetales más rica en ω -3, con alta cantidad de proteínas, fibra y de antioxidantes (Rossi et al., 2011). En esta investigación, el objetivo fue aportar información del efecto de la ingesta de chía para prevenir el daño hepático y esteatosis causados por un agente hepatotóxico como lo es el TC, así como para prevenir la dislipidemia aguda generada por el TI, y, asimismo, evidenciar si tenía efecto la DC en un modelo de daño combinado, hepático con esteatosis y dislipidemia, ya que no siempre son concomitantes, aunque la dislipidemia puede, de forma crónica, causar esteatosis y daño hepático y, a la vez el daño hepático y esteatosis promover más la dislipidemia.

Estudios epidemiológicos y experimentales numerosos han demostrado que cambios en la composición de macronutrientes de la dieta son determinantes importantes en la prevención y/o mejoramiento de desórdenes metabólicos como son dislipidemia y esteatosis hepática (Rossi et al., 2011). Los nutrientes pueden regular la expresión de genes directamente, por la regulación de la actividad de ciertos factores de transcripción que controlan la expresión de genes implicados en las vías metabólicas específicas, e indirectamente, mediante la estimulación de la secreción de hormonas que pueden activar factores de transcripción a través de vías de señalización específicas (Corthésy-Theulaz et al., 2005).

Composición química de dieta chía. Se hizo un análisis y comparación de la composición química de la DC vs. DE, donde la DC tiene un contenido mayor y significativo de proteína (6.78%), grasa (3.73%) y fibra (3.4%); también una ventaja de las croquetas de chía es, su menor contenido de humedad, lo cual es útil para su almacenamiento y comprueba la eficacia del secado, pues se logró reducir, además del agua agregada para el moldeado de la croqueta con chía, el 2.47% ($p < 0.05$) de humedad en comparación con la croqueta de dieta estándar. El análisis químico de la composición de DC nos muestra que el alimento elaborado posee un alto valor nutricional.

Masa corporal y masa hepática. Se observa que durante las tres primeras semanas la ganancia de masa corporal es muy similar entre el grupo alimentado con DE y el alimentado con DC; sin embargo, la masa final (cuarta semana) del grupo que consumió DC es significativamente menor con respecto a la de DE, esto puede ser debido a que la fibra de la chía, origina geles de alta viscosidad que producen enlentecimiento del vaciado

gástrico y brinda sensación de saciedad (Guiotto, 2014). Se ha documentado que los alimentos ricos en fibra soluble reducen la ingestión de alimentos, por ende hay una reducción en el consumo de la densidad energética y esto ayuda al control de la masa corporal, hecho que se corrobora con el consumo promedio que se obtuvo de cada grupo, siendo el grupo con DC el que consumió menos gramos de alimento ($p < 0.05$) por día (21.3 ± 0.71 g/rata/día el grupo con DC vs. 23 ± 1.04 g g/rata/día el grupo DE). Además de los mecanismos mencionados, se han propuesto otros para explicar la relación entre la fibra y la disminución de masa corporal, incluyendo: la baja densidad calórica de la fibra, que los alimentos con mayor contenido de fibra requieren un mayor esfuerzo y tiempo en el proceso de masticación, además de que un aumento en la masticación promueve la distensión gástrica, un retraso del vaciamiento gástrico, estimulación de hormonas gastrointestinales y una reducción de la energía que se obtiene por la digestión (Almeida-Alvarado et al., 2014).

La masa hepática de los animales que fueron alimentados con chíá fue menor que en el grupo control, lo cual resulta proporcional a la masa corporal obtenida para cada grupo. Da Silva, reporta algo similar en un estudio realizado en ratas que consumieron chíá por 14 días (Da Silva et al., 2016).

Efecto de la DC sobre dislipidemia aguda y el daño hepático, esteatosis. En diversos estudios se ha demostrado que la administración de TI conduce al desarrollo alteraciones lipídicas a través de su capacidad para inhibir la LPL, además de favorecer el aumento de la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa, que es la enzima clave para la síntesis intracelular de colesterol hepático; también, ha sido ampliamente utilizado para bloquear el aclaramiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) y de ese modo inducir hiperlipidemia aguda en especies animales diversas (Avendaño, 2010; Borensztajn et al., 1976; Ferreira et al., 2012; Abe et al., 2007; Millar et al., 2005; Otway y Robinson, 1967). En este estudio el uso de TI fue efectivo para lograr el incremento tanto de TG como de CT y tuvo un efecto inesperado y que no se había documentado, pues el TI no modifica los niveles de glucosa, pero indujo depleción de glucógeno y aumento en los valores de FA, GGTP, BT, ALT y PL, sugiriendo que provoca colestasis, necrosis y estrés hepático. La DC, ayudó en el grupo dislipidémicos a revertir la colestasis, logrando disminuir FA (64%), GGTP (38%) y BT (77%), aunque no la necrosis ni el estrés hepático. En el caso del grupo con daño combinado, la DC logra una reversión de la necrosis y estrés

hepático, efecto similar observado en los grupos con daño hepático y que se explican más adelante.

El grupo DC no modifica el valor normal de TG y CT en plasma pero, como se esperaba, el TI provoca HTG y una elevación de CT muy marcada en los grupos administrados. Por el contrario, el TC no altera los valores normales, pero el daño combinado induce una HTG e hipercolesterolemia similar a la observada con TI solo. El consumo de DC disminuyó en un 36% la HTG ($p < 0.05$) por lo tanto, tal porcentaje coincide con lo reportado por algunos investigadores, donde referenciaron que con estatinas se logra una disminución de 20-40% y con ω -3 de 30-50% (Sala, 2008). Así mismo, hubo una disminución de CT generado por el TI, logrando una disminución de 52%; también, la DC mantuvo los niveles normales de TG y CT durante el daño con TC, y causó una disminución ligera (17.8%), aunque significativa, en el nivel de HTG promovido por el daño dual (TI + TC), aunque en este último grupo no se alcanza una disminución de CT significativa, sí tiende a la baja, con una reducción del 10%.

La disminución de TG y CT, puede atribuirse a los compuestos con actividad biológica de la chía como el ω -3. En este contexto, en estudios similares en modelos experimentales en animales y en humanos se ha mostrado que el ω -3 de pescado se asocia con la reducción de dislipidemia y mejora de la sensibilidad de insulina (Lomardo y Chicco, 2006), ya que, promueve la disminución de los niveles de TG plasmáticos y hepáticos, induce una redistribución lipídica, tienen efectos inhibitorios sobre los mecanismos de lipogénesis y oxidación, induce modificaciones en las actividades de enzimas como la FAS, ACC y G6P-DH (Ide et al., 2000). Con ello, no solo contribuyen en la prevención de alteraciones lipídicas plasmáticas, sino también en la prevención de la esteatosis hepática (Rossi et al., 2011; Espinosa et al., 2013; Poudyal y col., 2012). También, se ha visto que el aceite de chía y el aceite de rosa mosqueta aumentan la expresión de acil-coenzima A oxidasa 1 (ACOX1) y la carnitina aciltransferasa I (CAT I), enzimas que fueron relacionadas con la baja de TG y CT (González-Mañán, 2012). Otra enzima que tiene un efecto hiperlipemiante es SAG, ésta fue disminuida por el consumo de ω -3 de pescado, en un estudio realizado en ratas (Kim y Choi, 2001).

En este trabajo no se determinó la actividad de enzimas claves en la oxidación de ácidos grasos, sin embargo, es bien aceptado que ALA es un sustrato preferido para la β -oxidación y, por lo tanto, está menos disponible para la síntesis de TG y posterior síntesis y secreción

de lipoproteínas ricas en TG. De igual manera se ha demostrado que la mitocondria de la rata oxida el ω -6 10 veces más rápido que un ácido graso saturado (Rodríguez-Cruz et al., 2005) contribuyendo a disminuir niveles plasmáticos de lípidos (Rossi et al., 2011), como pudo suceder por el contenido de ω -3 de la chía.

Actualmente, se sabe que los AGPI inducen la expresión génica de enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos y reprimen la expresión de enzimas lipogénicas a través de diferentes mecanismos: ω -3 suprime la expresión del factor de transcripción SREBP-1c, el cual regula genes involucrados en la lipogénesis. Recientemente, se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales los AGPI regulan la lipogénesis a través de SREBP-1; el primero, sugiere que los AGPI reducen la forma nuclear activa de SREBP-1 en ratas. Segundo, los AGPI disminuyen la estabilidad del mensajero de SREBP-1 y, tercero, suprimen la expresión del ARNm de SREBP-1. Por lo que dietas con alto contenido en AGPI favorecerán la disminución de SREBP-1 y, como consecuencia, disminuirán la lipogénesis (Li et al., 2014), resultados que se han demostrado con el uso de aceite de chía (rico en ALA) (Rincón-Cervera et al., 2016).

Otros factores de transcripción involucrados son los PPAR, los cuales participan en la regulación de la homeostasis de los lípidos. Los PPARs se activan por concentraciones micromolares de ω -3, los cuales por su instauración son muy potentes para activarlos, esto a su vez ayudará en la disminución de TG y CT debido a un aumento en la oxidación de ácidos grasos (Rodríguez-Cruz et al., 2005). Por otro lado, un consumo mayor de ω -3 ha demostrado que atenúa la resistencia a la insulina, esto está asociado al incremento de la expresión de genes implicados en la sensibilidad a la insulina, como el receptor PPAR γ , los transportadores de glucosa GLUT-2 y GLUT-4, y las proteínas de señalización del receptor de la insulina, IRS-2, en el tejido adiposo y en el hígado. Asimismo, la etiología de la esteatosis hepática, está íntimamente relacionada con la resistencia a la insulina (González-Pérez et al., 2009), por lo tanto el contenido elevado de ω -3 de la chía pudo haber inhibido a SREBP y activado a los PPAR y estar contribuyendo en la mejora de la dislipidemia provocada por el TI. Con estos mecanismos involucrados, algunos estudios han mostrado una efecto hipoglucémico (Da Silva et al., 2016), sin embargo en esta investigación no se observan modificaciones en la glucosa.

Por otra parte, todas las membranas celulares contienen bicapas lipídicas y son impermeables a las moléculas cargadas, de tal forma que para que ocurra la comunicación

entre células y compartimientos se requieren de transportadores proteicos o receptores que estén embebidos en esta doble capa. Además, se observa un mecanismo de fluidez que propicia el movimiento lateral de las proteínas e invaginación que permite la endocitosis y la exocitosis. Esta fluidez requiere de ácidos grasos de cadena larga que además tengan insaturaciones, porque los saturados disminuyen esta característica vital. Otro beneficio que aportan los AGPI, es que modifican la fluidez y espesor de las membranas y alteran las interacciones específicas con las proteínas de la membrana (Coronado et al., 2006). Ferreira y col. demostraron que las semillas de chía aumentan la proporción de ω -3 y ω -6 de la membrana (Ferreira et al., 2016). Por ejemplo, el papel que tiene la insulina de comunicar su señal durante el metabolismo de glucosa en ratas se ve dañada cuando la alimentación proporciona más del 10% de calorías de la dieta proveniente de ácidos grasos saturados, lo cual puede mejorar con la ingesta de ω -3. En este trabajo no se cuantificaron niveles de insulina en las ratas, sin embargo, es bien sabido que la resistencia a la insulina está implicada en la patogenia de la dislipidemia y de la esteatosis hepática, pero con la ingesta de ω -3, hay una mejora en la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa, reduce la adiposidad visceral, y disminuye la esteatosis hepática, así como, hay disminución del gasto cardíaco, inflamación hepática y fibrosis (Poudyal et al., 2012); esto sugiere que los modelos de daño no modifican substancialmente la glucosa plasmática o que la chía ayudó a regularla en los grupos administrados.

Otro elemento que la chía contiene en gran cantidad es, la fibra, y se ha demostrado que tiene influencia en el metabolismo de lípidos, mediante la disminución de la absorción intestinal de algunos ácidos grasos y del colesterol, aumentando su pérdida a través de las heces, además de inhibir la síntesis endógena de éste y la desaceleración de la digestión y la absorción de nutrimentos (Guiotto, 2014).

El TC ha sido utilizado ampliamente para inducir daño hepático en ratas y su mecanismo de acción se lleva a cabo en el retículo endoplasmático por la formación de intermediarios reactivos como el triclorometilo ($\text{Cl}_3\text{C}\cdot$) y triclorometilperoxilo ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$) que es más tóxico aún, mediante su metabolismo a través de diversas isoenzimas del sistema citocromo P-450 (CYP-450), iniciando una reacción en cadena de lipoperoxidación y estrés oxidativo lesionando principalmente a la zona central del acino hepático y puede ocasionar una necrosis masiva al hígado. Este mecanismo también involucra alteraciones importantes en

la homeostasis del calcio mitocondrial y es dependiente de la dosis utilizada (Tunon et al., 2007; Muriel, 2003).

Como se ha reportado el TC fue efectivo para ocasionar daño hepático en los grupos administrados con este toxón. A pesar del efecto mayoritariamente anticoléstatico observado en la mayoría de los grupos experimentales, la DC parece inducir una elevación de la actividad de FA y de la concentración de BT plasmática, mismo que no se reprodujo en los grupos dañados y que consumieron DC. El incremento en la actividad de FA en plasma por la ingesta de DC podría ser debido a que algunos compuesto de origen natural aumentan per se la actividad de esta enzima, que no solo se halla en hígado, sino en hueso y riñones (Caichompoo et al., 2009). Más aún, el kaempferol, que se halla en la chía, ha mostrado ser un estimulador de la FA (Nakamura et al., 2005); así mismo una elevación en la actividad de FA por la ingesta de chía ha sido reportada en ratas obesas (Poudyal et al., 2012), aunque los autores no explican tal efecto. En el caso de BT también se sugiere que la DC y sus contribuyentes incrementaron la síntesis de éstas, sin embargo tampoco se reprodujo tal efecto coléstatico en algún otro grupo, por el contrario, BT disminuyó a valores iguales a los del grupo control; de igual manera, hubo una disminución importante de GGTP (65%), algunos autores han reportado la disminución de este marcador de daño, pero con la suplementación de ω -3 de pescado (Nobili et al., 2013; Nobili et al., 2011, Xi-Xi et al., 2016).

La chía resultó antinecrótica, logrando disminuir niveles de ALT, incluso por debajo del obtenido en el grupo control, nuestros resultados apoyan el uso de la chía por su alto contenido de ω -3, algunos autores han reportado que el uso de ω -3 de pescado es práctico y eficaz para el tratamiento de EHNA, logrando disminución de AST y ALT al suplementar ω -3 en seres humanos con hígado graso no alcohólico (Parker et al., 2012; Xi-Xi et al., 2016; Musso et al., 2010); tal situación es contraria a la reportada en un estudio realizado en roedores obesos, donde se vio un incremento de ALT en el grupo dañado y que consumió una dieta con chía (Poudyal et al., 2012). También, se observa que hubo un daño menor por peroxidación lipídica (que disminuyó un 28.5%), la actividad de CAT mejoró, logrando niveles iguales al grupo control, lo que sugiere un efecto similar al que se ha demostrado con la quercetina y algunos antioxidantes (los cuales se mencionan más adelante) pues atenúan la mayoría de los síntomas del síndrome metabólico, incluyendo obesidad abdominal, remodelado cardiovascular y EHNA, con la disminución en el estrés

oxidativo y la inflamación (Panchal et al., 2012); sin embargo, los mecanismos subyacentes siguen sin estar claros (Stoldt, et al., 2016). Como consecuencia hubo una mejor funcionalidad del hígado, manteniendo mayor cantidad de glucógeno hepático (80%).

La chía no solo contiene gran cantidad de ω -3 (62%, del total de lípidos presentes en la semilla) también contiene ω -6 (Ayerza y Coates, 2005), éstos son elongados y desaturados dentro del hígado para formar AGPI de cadena larga. El ácido araquidónico (AA), el principal producto de la familia ω -6, se sintetiza a partir AL y su función principal es servir como precursor para la síntesis de una extensa familia de mediadores bioactivos conocidos como eicosanoides (Rodríguez-Cruz et al., 2005). La misma vía metabólica usa el ALA para producir DHA y EPA, que son los principales productos de la familia ω -3, los cuales sirven como precursores. AL y ALA compiten por las mismas enzimas. Esta competencia explica por qué el consumo elevado de AL reduce el nivel de ALA (González-Pérez et al., 2006). El equilibrio entre ω -3 y ω -6 es importante en la salud humana, y la relación óptima en la dieta es de 4 a 1, sin embargo, se ha encontrado que la mayoría de los pacientes con EHGNA tienen un mayor nivel de ω -6 y un menor nivel de ω -3, y la relación puede ser desde 20 hasta 25:1. Por lo tanto, la suplementación con ω -3 es necesaria, especialmente para la prevención y el tratamiento de la EHGNA (Xi-Xi et al., 2016). Con respecto a los eicosanoides, éstos modulan la intensidad y la duración de las respuestas inflamatorias, ocasionan un aumento de leucocitos, los cuales favorecen la liberación de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , la interleucina (IL)-1 y la IL-6. En la esteatosis hepática, se activa la síntesis de eicosanoides proinflamatorios derivados de AA y de citocinas producidas por las células del sistema inmunitario (González-Pérez et al., 2009). Se ha demostrado que una dieta enriquecida con EPA y DHA protege a las células hepáticas frente al daño genotóxico y estrés oxidativo. Estos efectos hepatoprotectores están asociados con una menor formación de eicosanoides derivados de ω -6 AA, y la generación de mediadores lipídicos bioactivos derivados de DHA llamados resolvinas y protectinas, las cuales son moléculas con acciones antiinflamatorias y antifibróticas potentes, capaces de detener la transmigración endotelial de los neutrófilos e inhibir la liberación del TNF- α en macrófagos, las principales células efectoras de los eventos inflamatorios que conducen a daño hepático. Por lo tanto, se ha demostrado que una dieta enriquecida con ω -3 (específicamente la protectina) reduce significativamente la expresión del RNAm de

ciclooxigenasa-2 (COX-2) y lipooxigenasas (LOX), responsables de la síntesis de ecosanoides en hígado, como protanglandinas (PGs) y leucotrienos (LTs), esto se ha visto en ratones tratados con TC (González-Pérez et al., 2009). Tales mecanismos hepatoprotectores e inhibitorios del TNF- α y agentes proinflamatorios podrían ejercer los efectos observados sobre los marcadores de daño colestático, necrótico y peroxidativo; específicamente la DC disminuyó la concentración plasmática de TNF- α aumentada por el TC y mantuvo normales o disminuidos las cantidades de TNF- α hepáticas. Resultados similares se observaron en un estudio realizado en ratas, donde el consumo de chía logró disminuir los niveles plasmáticos de TNF- α y de IL-6 (Ferreira et al., 2016). Iwami y cols. encontraron algo similar, pero en ese estudio utilizaron aceite de pescado rico en ω -3 (Iwami et al., 2011). El TNF- α es una citocina proinflamatoria, pronecrótica y procolestática, ya que inhibe a los transportadores de la membrana canalicular y aumentan la concentración de bilirrubinas no conjugadas, colesterol y ácidos biliares, con lo que se promueve la peroxidación lipídica y muerte celular por colestasis tal como ocurre en el modelo de daño por TC en roedores (Fernández-Martínez et al., 2007; DeCicco et al., 1998). Aunque se observó un incremento significativo en la concentración plasmática en el grupo TI+DC, éste no se replicó en hígado y tampoco se reflejó en los demás marcadores de daño donde, como se mencionó, la DC fue hepatoprotectora; es más, un incremento de TNF- α también puede inducir la regeneración de tejidos y la expresión de IL-10, citocina antiinflamatoria (Fernández-Martínez et al., 2006).

Otros compuestos bioactivos contenidos en la semilla de chía, son compuestos con actividad antioxidante potente. Entre los más importantes están los antioxidantes fenólicos, tales como ácido clorogénico y el ácido cafeico, flavonoles como miricetina, quercetina y kaempferol (Scapin et al., 2015). Estos compuestos son antioxidantes primarios y sinérgicos y hacen, proporcionalmente, una mayor contribución a la actividad antioxidante. La quercetina es un antioxidante potente capaz de prevenir la oxidación de las grasas, proteínas y ADN, atrapando radicales libres y metales, y estas propiedades antioxidantes son significativamente más eficaces que otros compuestos flavonoides. El ácido cafeico y el ácido clorogénico protegen contra los radicales libres e inhiben la peroxidación de las grasas. Estos compuestos presentes en la semilla tienen propiedades antioxidantes mucho más fuertes que los de ácido ferúlico, la vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina E (α -tocoferol) (Taga et al., 1984; Ayerza y Coates, 2005); por lo tanto, la chía podría

considerarse una semilla con alta capacidad antioxidante y fuente novedosa de isoflavonas que se puede incorporar en la dieta humana. Es interesante observar que la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de chía no están presentes en otras semillas oleaginosas (Martínez et al., 2014). Además el ácido cafeico es hepatoprotector e inhibe la síntesis de leucotrienos por la LOX (Fernández-Martínez et al., 2007). Esto explica el efecto protector de la DC sobre la disminución de lipoperoxidación, aumento de CAT y disminución de ALT y GGTP.

IX CONCLUSIONES

La chía, contribuyó en el control de dislipidemia, daño hepático y esteatosis, quizá por su contenido de ω -3 que tienen propiedades antiinflamatorias, por su efecto sobre la expresión génica de algunos factores de transcripción que regulan enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, por modificar la fluidez y el espesor de las membranas celulares, por contribuir en la absorción más lenta de glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, la chía también posee una actividad antioxidante importante, ya que, sus compuestos flavonoides pueden prevenir la oxidación de las grasas, proteínas y ADN, atrapando radicales libres y metales, y sus compuestos fenólicos protegen contra los radicales libres e inhiben la peroxidación de las grasas, así como al daño por colestasis y necrosis. Falta investigar más sobre los mecanismos moleculares que los compuestos de la chía, como los omega 3, mucilago, antioxidantes, proteínas, fibra, tienen sobre dislipidemia, daño hepático y esteatosis, pues no están completamente dilucidados.

Actualmente no hay tratamientos definitivos para hígado graso no alcohólico y si hay tratamientos farmacológicos para el tratamiento de dislipidemias; sin embargo, se sugiere que se continúe la investigación de alimentos como la chía que puedan coadyuvar en su tratamiento. Los resultados presentados en esta investigación revelan que, la chía, puede funcionar como un alimento hepatoprotector e hipolipemiante, por lo tanto, se recomienda seguir realizando estudios sobre sus mecanismos de acción.

X BIBLIOGRAFÍA

Abe Chisato, Saiko Ikeda, Tomono Uchida, Kanae Yamashita, Tomio Ichikawa. Triton WR1339, an Inhibitor of Lipoprotein Lipase, Decreases Vitamin E Concentration in Some Tissues of Rats by Inhibiting Its Transport to Liver. *J Nutr.* 2007; 137(2):345-50.

Agnel Arul John, Soba N. Hepatoprotective activity of Brassica Juncea (L) Czern against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats. *Pharmacologyonline.* 2011; 3:609-621.

Almeida-Alvarado Sonia Lorena, Aguilar-López Tania, Hervert Hernández Deisy. La fibra y sus beneficios a la salud. *An Venez Nutr.* 2014; 27(1):73-76.

Álvarez-Martínez H, Montañó-Estrada L, Hernández-Cruz P, Pérez-Campos E. Mecanismos moleculares patogénicos en la esteatohepatitis no alcohólica. *Rev Gastroenterol Mex.* 2004; 69(3):176-183.

Aranceta J, Foz M, Gil B, Jover E. Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl.* 2003; 15(5):196-233.

Avendaño Ayala Claudia Jimena. Evaluación de los efectos fisiológicos y bioquímicos de una dextrana en roedores de laboratorio. [Tesis]. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias; 2010.

Ayala I, Cámara P, Fernández-Pardo J, Flores I, Cascales AI, Gutiérrez Panizo C, Valdés M, Castells MT, García Pérez B. Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. *An Vet.* 2008; 24:5-16.

Ayerza Ricardo y Coates Wayne. Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Ann Nutr Metab.* 2007; 51(1):27-34.

Ayerza Ricardo y Coates Wayne. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutr Res.* 2005; 25:995-100.

Ayerza Ricardo y Coates Wayne. Influence of environment on growing period and yield: protein, oil and alpha-linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) *Ind Crop Prod.* 2009; 30(2):321-324.

Ayerza Ricardo y Coates Wayne. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.) *Ind Crop Prod.* 2011; 34(2):1366-1371.

Baran B, Akyüz F. Non-alcoholic fatty liver disease: What has changed in the treatment since the beginning?. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(39):14219-14229.

Barquera S, Flores M, Olaiz-Fernández G, Monterrubio E, Villalpando S, González C, Rivera JA, Sepúlveda J. Dyslipidemias and obesity in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2007; 49(3):338-347.

Beltrán-Orozco MC, Romero MR. Chía, alimento milenario. *Rev Ind Alim.* 2003; 20-29.

Borensztajn J, Rone M S, Kotlar T J. The inhibition *in vivo* of lipoprotein lipase (clearing-factor lipase) activity by triton WR-1339. *Biochem J.* 1976; 156(3):539-543.

Briones CN, Cartes-Velásquez R, Jara CC. Dislipidemias en comunidades pehuenches de Alto Biobio chileno. *Rev Chil Cardiol.* 2012; 31(2):102-107.

Buque X, Aspichueta P, Ochoa B. Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008; 100(9): 565-578.

Caichompoo W, Zhang QY, Hou TT, Gao HJ, Qin LP, Zhou XJ. Optimization of extraction and purification of active fractions from *Schisandra chinensis* (Turcz.) and its osteoblastic proliferation stimulating activity. *Phytother Res.* 2009; 23(2):289-92.

Capitani Marianela Ivana. Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas; 2013.

Carrillo ER, Muciño BJ. Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. *Rev Fac Med UNAM.* 2011; 54(3):29-45.

Cave, María Pía de la Maza. Dislipidemias: Normas técnicas. Fritzsche Ed. 2000.

Chatrath H, Vuppalanchi R, Chalasani N. Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2012; 32(1):22-29.

Chávez Tapia NC, Téllez Ávila FI, García Leiva J. Aspectos terapéuticos en la esteatohepatitis no alcohólica. *Rev Gastroenterol Mex.* 2006; 71(4):487-495.

Chicco AG, D'Alessandro ME, Hein GJ, Oliva ME, Lombardo YB. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *Br J Nutr.* 2009; 101(1):41-50.

Coelho MS y Salas-Mellado MM. Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for Use in Food Products. *J Food Nutr Res.* 2014; 2(5):263-26.

Coronado HM, Vega LS, Gutiérrez TR, García FB, Díaz GG. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *REB.* 2006; 25(3):72-79.

Corthésy-Theulaz I, Den Dunnen JT, Ferré P, Geurts JM, Müller M, Van Belzen N, van Ommen B. Nutrigenomics: the impact of biomimics technology on nutrition research. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2005; 49(6):355-365.

Da Silva BP, Dias DM, de Castro Moreira ME, Toledo RC, da Matta SL, Lucia CM, Martino HS, Pinheiro-Sant'Ana HM. Chia Seed Shows Good Protein Quality, Hypoglycemic Effect and Improves the Lipid Profile and Liver and Intestinal Morphology of Wistar Rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2016; 71(3):225-30.

DeCicco LA, Rikans LE, Tutor CG, Hornbrook KR. Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta following administration of carbon tetrachloride to male rats. *Toxicol Lett*. 1998; 98(1-2):115-21.

Di Sapio OA, Bueno M, Busilacchi H, Severin C. *Rev Pub Fac Cs Agrarias*. 2008; 24:11-13.

EFSA, European Food Safety Authority. Opinion on the safety of “Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds” as a food ingredient. *EFSA J*. 2009; 996:1-26.

Espinosa A, Valenzuela R, González-Mañán D, D'Espessailles A, Guillermo Gormaz J, Barrera C, Tapia G. Prevention of liver steatosis through fish oil supplementation: correlation of oxidative stress with insulin resistance and liver fatty acid content. *Arch Latinoam Nutr*. 2013; 63(1):29-36.

Fargion S, Porzio M., Fracanzani AL. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(37): 13306-13324.

Fernández-Martínez E, Bobadilla RA, Morales-Ríos MS, Muriel P, Pérez-Alvarez VM. Trans-3-phenyl-2-propenoic acid (cinnamic acid) derivatives: structure-activity relationship as hepatoprotective agents. *Med Chem*. 2007; 3(5):475-9.

Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*. 2006; 58(1):49–58.

Ferreira de Castro Karina, Martínez Baraldi Artoni Silvana, Pacheco Maria Rita. Serum lipid levels of rats treated with surfactant. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2012; 49(3): 193-201.

Ferreira MR, Alvarez SM, Illesca P, Giménez MS, Lombardo YB. Dietary Salba (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Eur J Nutr*. 2016:1–12.

González JE, Aguilar CMJ, García GCJ, García LPA, Álvarez FJ, Padilla LCA. [Prevalence of nutritional overweight and obesity and hypertension as well as their

relationship with anthropometric indicators in a population of students in Granada and its provinces]. *Nutr Hosp*. 2011; 26(5):1004-10.

González-Mañán D. Bioconversion of α -linolenic acid to n-3 LCPUFA and expression of PPAR-alpha, acyl Coenzyme A oxidase 1 and carnitine acyl transferase I are incremented after feeding rats with α -linolenic acid-rich oils. *Food Funct*. 2012; 3(7):765-72.

González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*. 2009; 23(6):1946-5.

Green CJ, Hodson L. The influence of dietary fat on liver fat accumulation. *Nutrients*. 2014; 6(11):5018-33.

Guevara-Cruz M, Tovar AR, Aguilar-Salinas CA, Medina-Vera I, Gil-Zenteno L, Hernández-Viveros I, López-Romero P, Ordaz-Nava G, Canizales-Quinteros S, Guillen Pineda LE, Torres N. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J Nutr*. 2012; 142(1):64–69.

Guiotto Estefania N. Aplicación de subproductos de chía (*Salvia hispánica* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) en alimentos [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ingeniería; 2014.

Gusdon AM, Song KX, Qu S. Nonalcoholic Fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria-centric perspective. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:637027.

Hirano T. [Hypertriglyceridemia: concept and clinical significance]. *Nihon Rinsho*. 2013; 71(9):1519-27.

Ide T, Kobayashi H, Ashakumary L, Rouyer I, Takahashi Y, Aoyama T, Hashimoto T, Mizugaki M. Comparative effects of perilla oil and fish oil on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1485(1):23-35.

Iwami D, Nonomura K, Shirasugi N, Niimi M. Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(3):384-9.

Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorno V, Mateo CM, Maestri DM, Diehl BW, Nolasco SM, Tomás M C. Characterization of Chía (*Salvia hispánica* L.) Crude Seed Oils Obtained by Pressing and Solvent Extraction. *J Food Compos Anal*. 2011; 24:166-174.

Jiménez P, Paula, Masson S, Lilia, & Quitral R, Vilma. (2013). Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Rev. chil. nutr.* 2013; 40(2): 155-160. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000200010>

Jin F, Nieman DC, Sha W, et al. Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 67:105-110.

Kim H.K., Choi H. Dietary alpha-linolenic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids.* 2001; 36:1131-1136.

Li J, Li FR, Wei D, Jia W, Kang JX, Stefanovic-Racic M, Dau Y, Zhao AZ. Endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *Mol Endocrinol.* 2014; 28(8):1316-28

Lin KY, Daniel JD, Whistler RL. Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydr Polym.* 1994; 23:13-18.

Lombardo Yolanda B, Chicco Adriana G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(1):1-13.

Manlhiot C, Larsson P, Gurofsky RC, Smith RW, Fillingham C, Clarizia NA, Chahal N, Clarke JT, McCrindle BW Pediatrics. Spectrum and management of hypertriglyceridemia among children in clinical practice. *Pediatrics.* 2009; 123(2):458-65.

Martínez-Hernández, Antonio F, Chávez-Aguirre R. Prevalencia y comorbilidad de dislipidemias en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2007; 45(5):469-475.

Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Uribe M. [An update on non-alcoholic fatty liver disease]. *Rev Invest Clin.* 2004;56(1):72-82.

Miguel S, Pedro E. Dislipidemias. *ACIMED.* 2009; 20(6):265-273.

Millar JS, Cromley DA, McCoy MG, Rader DJ, Billheimer JT.. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. *J Lipid Res.* 2005; 46(9):2023-8.

Miquilena Colina M.E., García Monzón C. Obesidad y enfermedad hepática. *Gastroenterol Hepatol.* 2010; 33(8):591-604.

Mohd Ali N, Yeap SK, Ho WY, Beh BK, Tan SW, Tan SG. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2:171956.

Muñoz LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng.* 2012; 108: 216-224.

Muriel P, Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Lara-Ochoa F, Ponce S, García J, Shibayama M, Tsutsumi V. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 15(9):951-7.

Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int*. 2009; 3(4):526-536.

Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol*. 1998; 56(6):773-779.

Murillo, Roxana Vicente, Leyes, Eduardo A. Rodríguez, Canavaciolo, Víctor L. González. Características preliminares del aceite de semillas de *Salvia hispanica* L. cultivadas en Cuba. *Rev Cubana Plant Med*. 2013;18(1):3-9.

Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010; 52(1).

Nakamura Y, Chang CC, Mori T, Sato K, Ohtsuki K, Upham BL, Trosko JE. Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells. *Carcinog Compr Surv*. 2005; 26(3):665-71.

Navarrete Briones C, Cartes-Velásquez R, Carrasco JC. Dislipidemias en comunidades pehuenches de Alto Biobio chileno. *Rev Chil Cardiol*. 2012; 31(2): 102–107.

Nieman DC, Cayea EJ, Austin MD, Henson DA, McAnulty SR, Jin F. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutr Res*. 2009; 29(6):414–418.

Nobili V, Alisi A, Della Corte C, Rise P, Galli C, Agostoni C, et al. Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: randomised controlled trial in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23(11).

Nobili V, Bedogni G, Alisi A, Pietrobattista A, Rise P, Galli C, et al. Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial. *Arch Dis Child*. 2011; 96(4):350–3.

NOM-037-SSA2-2012. Norma Oficial Mexicana. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. 2012.

Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Nakajima A. [Pathophysiology of NASH/NAFLD associated with high levels of serum triglycerides]. *Nihon Rinsho*. 2013; 71(9):1623-1629.

Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B.. Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) seed rich in alpha-linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013; 89(5), 279-289.

Olivos-Lugo BL, Valdivia-López MÁ, Tecante A. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Sci Technol Int*. 2010; 16(1):89-96.

Otero W, Sierra F. El hígado en cirugía. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2003; 18(4):230-238.

Otway S, Robinson DS. 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. *J Physiol*. 1967; 190(2):321–332.

Panchal SK, Poudyal H, Brown L. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr*. 2012; 142(6):1026-32.

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(39):14205-18.

Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012; 56(4):944–51.

Pérez-Aguilar, S. Benlloch, M. Berenguer, B. Beltrán and J. Berenguer. Non-alcoholic statohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004; 96(9):628-648.

Pérido C, Cases M, Bueno M, Di Sapio O, Busilacchi H, Severin C. Caracterización de harinas de “chía” (*Salvia hispanica* L.) comercializadas en Rosario (Santa Fe, Argentina). *Dominguezia*. 2011; 27(2):21-26.

Pérez AG. Efectos protectores de los ácidos grasos omega 3 en el hígado y en el tejido adiposo. [Tesis doctoral]. Barcelon: Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina; 2009.

Pettinelli P, Obregón AM, Videla LA. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp*. 2011; 26(3):441-50.

Planas Ramón y Salmerón Javier. *Manual de Enfermedades Hepáticas*. Ed Permanyer Asociación Española para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas; 2007.

Popescu LA, Virgolici B, Lixandru D., Miricescu D, Condrut E, Timnea O, Zagrean L. Effect of diet and omega-3 fatty acids in NAFLD. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 54(3):785-790.

Poudyal H, Panchal S, Waanders J, Ward L and Brown L. 2011. Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J Nutr Biochem*. 2012; 23(2):153-62.

Rincón-Cervera MÁ, Valenzuela R, Hernandez-Rodas MC, Barrera C, Espinosa A, Marambio M, Valenzuela A. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016; 111:25-35.

Rivero G, Uzcátegui L, Gómez P, Uzcátegui E, Baptista T, Martínez D. Frecuencia de hígado graso no alcohólico en pacientes con síndrome metabólico. *MedULA*. 2012; 21:18-25.

Rodríguez Vallejo, J. Historia de la agricultura y de la fitopatología, con referencia especial a México. México: Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 1992

Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, Del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios. *Rev Invest Clin*. 2005; 57(3):457-472.

Rossi AS, Oliva ME, Ferreira MR, Chicco A, Lombardo YB. Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats. *Br J Nutr*. 2013; 109(9):1617-1627.

Rossi AS, Oliva ME, Ferreira MR, Chicco A, Lombardo YB. La semilla de Salba (*Salvia hispánica* L.) dietaria previene la esteatosis hepática y dislipidemia inducida en ratas normales por una dieta rica en sacarosa. *Rev FABICIB*. 2011; 15:47-59.

Rupflin, DIA. Caracterización de la Semilla Del Chan (*Salvia hispánica* L.) y diseño de un producto funcional que la contiene como ingrediente. *Revista UVG*. 2011; 43-49.

Sahagún B. Historia general de las cosas de Nueva España (Codex Florentino). Eds. A.M. Garibay, 1989. Editorial Porrúa, DF, México.1579.

Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. Recent advances in pharmacotherapy for hypertriglyceridemia. *Prog Lipid Res*. 2014; 56:47-66.

Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspect of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011; 26(1):30-46.

Sala Xavier Pintó. Protocolos: hipertrigliceridemias: Sociedad Española de Medicina Interna. 2008.

Scapin, G, Schimdt, MM, Prestes RC, Ferreira S, Silva, AFC da Rosa CS. Effect of extract of chia seed (*Salvia hispánica*) as an antioxidant in fresh pork sausage. *IFRJ*. 2015; 22(3):1195-1202.

Shimano H. SREBP-1c and TFE3, energy transcription factors that regulate hepatic insulin signaling. *J Mol Med (Berl)*. 2007; 85(5):437-44.

Stoldt AK, Mielenz M, Nürnberg G, Sauerwein H, Esatbeyoglu T, Wagner AE, Rimbach G, Starke A, Wolfram S, Metges CC. Effects of a six-week intraduodenal supplementation with quercetin on liver lipid metabolism and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Anim Sci*. 2016; 94(5):1913-23.

Taga MS, Miller EE, Pratt DE. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Agric Food Chem*. 1984; 61:928-931.

Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. Animal models of fulminant hepatic failure. *Nutr Hosp*. 2007; 22(2):199-209.

Tziomalos K. Lipid-lowering agents in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2014; 6(10):738-744.

Ugaz-Soto L, Zafra-Tanaka JH, Tapia V, María E. Efecto de *Gentianella Alborosea* en esteatosis hepática no alcohólica inducida por dieta hiperlipídica en ratas holtzman hembras. *CIMEL*. 2012; 17(1):18-23.

Vázquez FR, Reyes GJ, Fernández VLC, Anaya RM, Rizzoli CA. Silimarina, ácido alfa-lipoico y seleniometionina en el tratamiento de hígado graso: revisión sistemática de la literatura. *An Med (Mex)*. 2013; 58 (1): 37-46.

Vergani L. Lipid lowering effects of iodothyronines: *In vivo* and *in vitro* studies on rat liver. *World J Hepatol*. 2014; 6(4):169-177.

Vieira SC, Oliveira LC, Galvão BPL, Medeiros APR, Arrais RF, Campos PLF. Association between dyslipidemia and anthropometric indicators in adolescents. *Nutr Hosp*. 2011; 26(2):304-10.

Vuksan V, Jenkins AL, Dias AG, Lee AS, Jovanovski E, Rogovik AL, Hanna A. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64(4):436-8.

Watson G. Nahuatl word in American English. *American Speech*. 1938; 13:108-121.

WGO Practice Guideline. Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica. 2012.

Woodman. Assessment of Hepatic Function and Damage in Animal Species. *J Appl Toxicol*. 1988; 8(4):249-54.

Xi-Xi He, Xiao-Li Wu, Ren-Pin Chen, Chao Chen, Xiao-Gang Liu, Bin-Jiao Wu, Zhi-Ming Huang. Effectiveness of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2016; 11(10).

Yamilé Jaramillo Garcés: La chía (*Salvia hispanica* L.), una fuente de nutrientes para el desarrollo de alimentos saludables. [Tesis de especialidad]. Caldas-Antioquia. Facultad de Ingenierías; 2013.

Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003; 33(2):105-36.