



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA**

**TESIS DOCTORAL**

**Estudio mecanístico del efecto de la suplementación con semilla o aceite de  
chía (*Salvia hispanica* L.) sobre dislipidemia y esteatohepatitis en ratas  
Wistar no obesas**

Para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

PRESENTA

M. en C. José Antonio Estefes Duarte

Director

Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez

Codirectora

Dra. Nury Pérez Hernández

Pachuca de Soto, Hidalgo, México, febrero 2026



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Medical Sciences

Área Académica de Nutrición

Department of Nutrition

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., 30 enero 2026

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado

Directora de Administración Escolar

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al Mtro. JOSE ANTONIO ESTEFES DUARTE con número de cuenta 215302, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana ha terminado el trabajo de tesis titulado "Estudio mecanístico del efecto de la suplementación con semilla o aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre dislipidemia y esteatohepatitis en ratas Wistar no obesas", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento en extenso propuesto por el/la estudiante después de haber sido revisado, analizado y evaluado de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 73, VI del Reglamento General de Estudios de Posgrado. Lo anterior, en función de que, el/la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 8 de enero de 2026. Por tal motivo, solicitamos a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Directora de tesis

DRA. NURY PÉREZ HERNÁNDEZ

Codirectora de tesis

DR. RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

Integrante del comité tutorial

DR. JAVIER AÑORVE MORGÁ

Integrante del comité tutorial

Dr. José Antonio Hernández Vera  
Director del Instituto de Ciencias de la Salud  
Dean

ATENTAMENTE  
"Amor, Orden y Progreso"

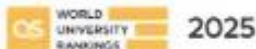


Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino  
Jefa del Área Académica de Nutrición  
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo  
Coordinadora de Posgrado del ICsA  
Director of Graduate Studies of ICsA

Circuito ex-Hacienda la Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P.42172  
Teléfono: 52(771)7172000 Ext. 41524 y 41528  
nutricion@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



uaeh.edu.mx

---

Un especial reconocimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada al alumno José Antonio Estefes Duarte (No. de CVU: 929116) para la realización del proyecto doctoral “Estudio mecanístico del efecto de la suplementación con semilla o aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre dislipidemia y esteatohepatitis en ratas Wistar no obesas”.

---

---

## Agradecimientos

A todas las personas que apoyaron este proyecto directa o indirectamente. A continuación, algunos nombres relevantes (no todos) sin ningún tipo de orden.

Al Dr. Eduardo Fernández Martínez, “el patrón”, por todas las facilidades otorgadas para cumplir este sueño, por confiar en mi como alumno, por impulsar mi carrera científica, y por su amistad.

A la Dra. Alicia Rodríguez Pastén, la vieja loca”, por apoyarme durante todo el tiempo que duró el modelo biológico, por su apoyo incondicional, y por su amistad.

A la Dra. Nury Pérez, por todas las facilidades otorgadas durante todo el doctorado, por soportarme, y por recibirme cálidamente durante la estancia en IPN. Muchas gracias Dra.

Al Dr. Ángel Bañuelos, por hacer del laboratorio un lugar tranquilo y agradable durante mi estancia, y por ofrecer siempre su amplio conocimiento al servicio de nosotros, los alumnos. ¡Aaah!, y por ayudarme a cargar el recirculador.

Al Dr. Fernando Gómez Chavez, por traumarme. No ya en serio, por su apoyo y facilidades brindadas, y por instruirme en temas de biología molecular.

Al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera, quien me ayudó genuinamente cuando las cosas se complicaron. Desde tiempos inmemoriales siendo un ejemplo de científico y de buen ser humano. Lo estimo mucho Dr. Muchas gracias por creer en mí.

Al Dr. Ruben Jiménez, por inspirarme, por creer en mí, y por su apoyo durante el proceso.

A mi amigo Josué, el Lic., el de batalla, el mejor amigo, por siempre estar para mí.

A mis alumnos Vicente, Isai, Marina, que fueron fundamentales para sacar a flote los análisis bioquímicos de los modelos animales. Muchas gracias shiavoos.

A Itzelita, Judith y mis hermanas, por ser parte de mi día a día, por soportarme, por apoyarme en todo en todo momento, y por inspirarme.

A mi bocina y mis audífonos, sin música yo no trabajo, se sabe.

---

---

## Dedicatoria

A mi madre, siempre a mi madre, Lucía Duarte Gutiérrez...

...pero también a mis hermanas, Merari y Lucy, que con existir me dan la fuerza que necesito...

...también a mi padre...

...y a toda la gente que, como yo, confía y reconoce que el conocimiento y saber hallarlo son las mejores herramientas que tenemos como humanidad para alumbrar nuestra existencia.

...y también, por supuesto, a mi cielo, Itzel...

---

---

*·Comprender más. para temer menos·*

*Marie Curie*

---

---

## Índice

<i>I. Resumen</i> .....	1
<i>II. Summary</i> .....	3
<i>1. Introducción</i> .....	5
<i>2. Marco teórico</i> .....	8
2.1 Dislipidemias.....	8
2.1.1 Definición y clasificación.....	8
2.1.2 Factores de riesgo, causas y consecuencias clínicas.....	8
2.1.3 Signos y síntomas .....	10
2.1.4 Epidemiología .....	10
2.1.5 Fundamentos del metabolismo lipídico.....	11
2.1.6 Fisiopatología de las dislipidemias .....	14
2.1.7 Diagnóstico de las dislipidemias .....	16
2.1.7.1 Colesterol.....	16
2.1.7.2 Triglicéridos .....	17
2.1.7.3 Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) .....	17
2.1.7.4 Lipoproteínas de baja densidad (LDL) .....	17
2.1.7.5 Lipoproteínas de alta densidad (HDL) .....	19
2.1.8 Tratamiento de las dislipidemias .....	20
2.1.9 Modelos experimentales de DLP en roedores .....	21
2.2 Relación entre dislipidemias y MASLD/MASH .....	22
2.3 Esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH).....	24
2.3.1 Definición y clasificación.....	24
2.3.2 Factores de riesgo, causas y consecuencias clínicas.....	25
2.3.3 Signos y síntomas .....	25
2.3.4 Epidemiología .....	27
2.3.5 Homeostasis hepática de los lípidos.....	27
2.3.6 Fisiopatología de la MASLD/MASH.....	28

---

---

2.3.7 Diagnóstico de MASLD/MASH.....	31
2.3.7.1 Estudios de imagen.....	31
2.3.7.2 Biopsia hepática .....	32
2.3.7.3 Scores .....	34
2.3.7.4 Biomarcadores de funcionalidad hepática.....	35
Bilirrubina .....	36
Transaminasas.....	36
Gama-glutamil transferasa .....	37
Fosfatasa alcalina .....	38
2.3.8 Tratamiento de la MASLD/MASH.....	38
2.3.9 Modelos experimentales de daño hepático en roedores.....	40
2.4 Medicina tradicional contra enfermedades metabólicas .....	43
2.5 Semilla de chía ( <i>Salvia hispánica</i> L.).....	50
2.5.1 Taxonomía y cultivo.....	50
2.5.2 Perfil nutricional de la semilla de chía.....	51
2.5.2.1 Composición química.....	51
2.5.2.2 Principales compuestos bioactivos.....	52
2.5.3 Efectos del consumo de chía en la salud.....	54
2.5.3.1 Efectos del consumo de chía en la salud metabólica .....	54
2.5.3.2 Efectos del consumo de chía sobre dislipidemia y MASLD/MASH .....	56
3. Planteamiento del problema .....	59
4. Objetivos .....	61
4.1 General .....	61
4.2 Específicos.....	61
5. Metodología.....	62
5.1 Material vegetal y reactivos.....	62
5.2 Preparación de dietas experimentales.....	62

---

---

5.3 Análisis químico de dietas experimentales.....	63
5.3.1 Composición química proximal.....	63
5.3.2 Perfil de ácidos grasos.....	63
5.3.3 Análisis por RMN <sup>1</sup> H.....	64
5.3.4 Capacidad antioxidante de las dietas experimentales.....	64
5.3.4.1 Obtención de extractos.....	64
5.3.4.2 Contenido fenólico total.....	65
5.3.4.3 Ensayo de inhibición del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)....	66
5.3.4.4 Ensayo de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.....	66
5.3.4.5 Ensayo de poder de reducción del ion férrico.....	67
5.4 Modelo animal.....	67
5.4.1 Determinación de las dosis.....	67
5.4.2 Desarrollo experimental.....	68
5.4.3 Sacrificio de los animales y muestreo.....	69
5.4.4 Tratamiento de residuos biológicos.....	70
5.4.5 Criterios de punto final y aspectos bioéticos.....	70
5.4.6 Determinación del efecto de la suplementación sobre DLP y MASH.....	71
5.4.6.1 Determinación del perfil lipídico y glucosa en plasma.....	72
5.4.6.2 Determinación de marcadores de daño hepático.....	72
Fosfatasa alcalina.....	72
Alanina aminotransferasa.....	72
Gamma-glutamil transpeptidasa.....	73
Glucógeno.....	73
Bilirrubina total.....	74
Bilirrubina directa.....	74
Lipoperoxidación.....	75
Catalasa.....	76
5.4.6.3 Histología.....	76
5.4.6.4 Análisis molecular.....	77

---

---

5.4.6.5 Lipidómica .....	78
5.4.6.6 Análisis estadístico.....	79
6. Resultados y discusión.....	82
6.1 Análisis de dietas experimentales .....	82
6.1.1 Composición química.....	82
6.1.2 Capacidad antioxidante .....	83
6.1.3 Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN- <sup>1</sup> H) .....	88
6.2 Estudio en animales.....	90
6.2.1 Efecto de la suplementación sobre la dislipidemia.....	90
6.2.1.1 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre el peso corporal.....	90
6.2.1.2 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre el peso del hígado .....	91
6.2.1.3 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre la glucosa y el perfil lipídico .....	93
6.2.1.4 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre marcadores de funcionalidad hepática .....	99
Colestasis – Bilirrubina, fosfatasa alcalina, gama-glutamil transpeptidasa .....	99
Necrosis – Alanina aminotransferasa .....	102
Estrés oxidativo – Lipoperoxidación y catalasa.....	103
Estrés fisiológico – Glucógeno .....	106
6.2.1.5 Efecto de la suplementación sobre el tejido hepático .....	108
6.2.1.6 Efectos de la suplementación sobre la expresión génica.....	111
6.2.1.7 Efectos de la suplementación sobre el lipidoma hepático .....	115
6.2.2 Efecto de la suplementación sobre la MASH.....	125
6.2.2.1 Efectos sobre el peso corporal, el consumo de alimento y el peso hepático .....	125
6.2.2.2 Efectos sobre la glucosa y el perfil lipídico.....	125
6.2.2.3 Efectos sobre los marcadores de funcionalidad hepática.....	129
Colestasis – Bilirrubina, fosfatasa alcalina y gama-glutamil transpeptidasa.....	129
Necrosis – Alanina aminotransferasa .....	132
Estrés oxidativo – Lipoperoxidación y catalasa.....	133
Estrés fisiológico – Glucógeno .....	134

---

---

6.2.2.4 Efectos de la suplementación sobre el tejido hepático .....	135
6.2.2.5 Efectos sobre la expresión génica .....	137
6.2.2.6 Efectos sobre el lipidoma hepático.....	139
7. Conclusiones.....	149
8. Referencias.....	151

---

## I. Resumen

Las dislipidemias (DLPs) y la esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH) son dos enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico. La farmacoterapia actual para ambas enfermedades enfrenta retos importantes como la pobre adherencia a los tratamientos, la gama de efectos secundarios, y la acumulación y/o interacción farmacológica en pacientes que dependen de la administración de múltiples medicamentos. Los aceites ricos en ácidos grasos esenciales omega 3 podrían ofrecer una alternativa no farmacológica para estas enfermedades debido a sus propiedades hipolipidémicas e antiinflamatorias. El aceite de pescado y la semilla de chía son las dos fuentes principales de omega-3, sin embargo, esta última ha sido mucho menos investigada. En línea con esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos biológicos preventivos de la ingesta de semilla o aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre DLP y MASH experimentales en ratas, e indagar en sus mecanismos de acción probables. Para lograrlo, se prepararon, analizaron y suplementaron cuatro tipos de dieta: 1) solución salina (1g/día p.o. [dieta SS, control -]); 2) aceite de pescado (1g/día p.o. [dieta AP, control +]) 3; semilla de chía integra (15% del peso de la dieta/día p.o. [dieta S-Chía]); o 4) aceite de chía (1g/día p.o. [dieta A-Chía]) durante 28 días, tras los cuales se realizó la inducción experimental de DLP o MASH con tiloxapol (i.p.) o CCl<sub>4</sub> (p.o.), según el caso. Los animales se sacrificaron éticamente y se evaluaron y compararon los efectos de la suplementación sobre el perfil lipídico (lípidos totales, triglicéridos [TGs], colesterol, LDL-c, HDL-c), y sobre diversos biomarcadores hepáticos y plasmáticos relacionados con la inflamación, la funcionalidad hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina [FA], gamma-glutamil transpeptidasa [GGTP], alanina aminotransferasa [ALT], etc.), y el estrés oxidativo (nivel de lipoperoxidación [TBARS] y catalasa) de 12 grupos experimentales de roedores (4 grupos control, 4 grupos de DLP y 4 grupos de MASH,  $n = 6-8$ ). También se estudiaron los efectos de ambas suplementaciones sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico (SREBP-1c, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ) y la inflamación (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) en ambas enfermedades (DLP y MASH). Por último, se realizó una aproximación lipídica de la fracción lipídica hepática de los animales de experimentación. Dentro de los principales resultados, la dieta S-Chía mostró alto contenido de proteína (24%) y bajo contenido de grasa (<5%). El contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico (omega-3) fue de 46% en S-Chía y 66% en A-Chía. En la DLP experimental, la dieta S-Chía mostró mayor capacidad antioxidante que el A-Chía y el AP en

todos los métodos analíticos realizados (contenido fenólico total, flavonoides, ABTS, DPPH, FRAP). La dieta S-Chía mejoró el perfil lipídico de ratas con DLP, el AP en algunas ocasiones lo agravó, y A-Chía mostró resultados positivos modestos. S-Chía mejoró también la lipoperoxidación y GGTP. Asimismo, la dieta S-Chía moduló mejor la expresión de SREBP-1c, PPAR- $\alpha$ , y NF- $\kappa$ B que A-Chía, y este último redujo los niveles de PPAR- $\gamma$ . El análisis lipidómico reveló que la suplementación con S-Chía incrementó la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y ralentizó la lipogénesis de *novo* en DLP. Por otro lado, en MASH, la suplementación con S-Chía o A-Chía no mostró efectos positivos sobre el perfil lipídico; sin embargo, A-Chía redujo los niveles de FA, GGTP y ALT, y S-Chía solo FA. Ambos redujeron la lipoperoxidación y mitigaron la depleción de glucógeno sin exhibir cambios en la actividad de la catalasa. A-Chía moduló mejor los niveles de ARNm de NF- $\kappa$ B TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y SREBP-1c que S-Chía. El análisis lipidómico mostró poca variabilidad biológica entre grupos suplementados e inducidos con MASH, sin embargo, se observó una firma lipídica particular en el grupo sano que permitió diferenciarlo de los grupos con MASH. La suplementación con ambas fracciones de chía, pero principalmente con A-Chía, pareció impactar sutil pero positivamente en vías metabólicas relacionadas con el recambio de fosfolípidos membranales como mecanismos protectores y preventivos principales contra la MASH. En conclusión, la suplementación con S-Chía fue mejor para prevenir los efectos deletéreos de la DLP mientras que el A-Chía fue mejor para mejorar la MASH experimental. Ambas suplementaciones mostraron un potencial nutracéutico real en las enfermedades objeto de estudio en este trabajo.

**Palabras clave:** aceite de chía, semilla de chía, dislipidemia, esteatohepatitis (MASH), hígado, lípidos, lipidómica, mecanismos de acción.

## II. Summary

Dyslipidemias (DLPs) and metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) are two diseases closely related to metabolic syndrome. Current pharmacotherapy for both diseases faces significant challenges, such as poor treatment adherence, a wide range of side effects, and drug accumulation and/or interactions in patients requiring multiple medications. Edible oils containing high levels of omega-3 essential fatty acids could offer a non-pharmacological alternative for these diseases due to their lipid-lowering and anti-inflammatory properties. Fish oil and chia seeds are the two main sources of omega-3; however, the latter has been much less researched. Therefore, the aim of this study was to evaluate the preventive biological effects of chia seed (*Salvia hispanica* L.) or chia oil supplementation on experimental DLP and MASH in rats, and to investigate their likely mechanisms of action. To achieve this, four types of diet were prepared, analyzed and supplemented: 1) saline solution (1g/day p.o. [SS diet, control -]); 2) fish oil (1g/day p.o. [AP diet, control +]); 3) whole chia seed (15% of diet weight/day p.o. [S-Chia diet]); or 4) chia oil (1g/day p.o. [A-Chia diet]) for 28 days, after which experimental induction of DLP or MASH was carried out with tyloxapol (i.p.) or CCl<sub>4</sub> (p.o.), as appropriate. The animals were ethically sacrificed and the effects of supplementation on the lipid profile (total lipids, triglycerides [TGs], cholesterol, LDL-c, HDL-c), and on various hepatic and plasma biomarkers related to inflammation, liver function (bilirubin, alkaline phosphatase [ALP], gamma-glutamyl transpeptidase [GGTP], alanine aminotransferase [ALT], etc.), and oxidative stress (lipoperoxidation level [TBARS] and catalase) of 12 experimental groups of rodents (4 control groups, 4 DLP groups and 4 MASH groups, n = 6-8) were evaluated and compared. The effects of both supplementations on the expression of lipid metabolism genes (SREBP-1c, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ) and inflammation (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) were also studied in both diseases (DLP and MASH). Finally, a lipidomic approach of the hepatic lipid fraction of the experimental animals was performed. Among the main results, the S-Chia diet showed a high protein content (24%) and a low-fat content (<5%). The  $\alpha$ -linolenic acid (omega-3) content was 46% in S-Chia and 66% in A-Chia. In experimental DLP, the S-Chia diet showed greater antioxidant capacity than A-Chia and AP in all the analytical methods performed (total phenolic content, flavonoids, ABTS, DPPH, FRAP). The S-Chia diet improved the lipid profile of rats with dyslipidemia (DLP), while the AP diet sometimes worsened it, and A-Chia showed modest positive results. S-Chia also improved

lipid peroxidation and GGTP levels. Furthermore, the S-Chia diet modulated the expression of SREBP-1c, PPAR- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B better than A-Chia, and the latter reduced PPAR- $\gamma$  levels. Lipidomic analysis revealed that S-Chia supplementation increased fatty acid  $\beta$ -oxidation and slowed *de novo* lipogenesis in DLP. On the other hand, in MASH, supplementation with either S-Chia or A-Chia showed no positive effects on the lipid profile; however, A-Chia reduced FA, GGTP, and ALT levels, while S-Chia only reduced FA. Both reduced lipid peroxidation and mitigated glycogen depletion without exhibiting changes in catalase activity. A-Chia modulated NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and SREBP-1c mRNA levels better than S-Chia. Lipidomic analysis showed little biological variability between the supplemented and MASH-induced groups; however, a particular lipid signature was observed in the healthy group, allowing it to be differentiated from the MASH groups. Supplementation with both chia fractions, but primarily with A-Chia, appeared to subtly but positively impact metabolic pathways related to membrane phospholipid turnover, which are key protective and preventive mechanisms against MASH. In conclusion, S-Chia supplementation was better at preventing the deleterious effects of DLP, while A-Chia was better at improving experimental MASH. Both supplementations showed real nutraceutical potential in the diseases studied in this work.

**Keywords:** chia oil, chia seed, dyslipidemia, steatohepatitis (MASH), liver, lipids, lipidomics, mechanisms of action.

## 1. Introducción

Las enfermedades metabólicas son patologías de alta prevalencia en México y en el mundo (Noubiap et al., 2026). El síndrome metabólico (también llamado síndrome X) (Oda, 2012), uno de los trastornos metabólicos más comunes, se presenta cuando una persona padece 3 o 4 factores de riesgo que incluyen obesidad abdominal ( $>102$  cm en hombres o  $>88$  cm en mujeres), cierto grado de resistencia a la insulina o diabetes (glucemia  $>110$  mg/dL), dislipidemia (triglicéridos [TGs]  $>1.69$  mmol/L y colesterol HDL  $<1.03$  mmol/L en hombres o  $<1.29$  mmol/L en mujeres), y/o hipertensión arterial ( $>130/85$  mmHg o bajo tratamiento con fármacos antihipertensivos) (Estefes-Duarte et al., 2026). Asimismo, aunque no forma parte de los criterios diagnósticos actuales, la enfermedad de hígado graso asociado a disfunción metabólica (MASLD, Metabolic-Associated Steatotic Liver Disease), antes llamada enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico (Radu et al., 2023).

Ahora bien, las dislipidemias (DLPs) y la MASLD son enfermedades bastante comunes que poseen rutas fisiopatológicas comunes, por lo que padecer cualquiera de ellas es un factor de riesgo para el desarrollo de la otra (Gurevitz & Rosenson, 2024). De esta manera, una persona que tiene elevación de triglicéridos (TGs) y colesterol posee también un riesgo más elevado de desarrollar MASLD; y, por el otro lado, el hígado graso modifica el metabolismo normal de los lípidos, lo cual puede causar un desbalance de lípidos plasmáticos, ocasionando DLPs. Aun así, la obesidad (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015) y la resistencia a la insulina se consideran los principales factores de riesgo para el desarrollo de ambas patologías (Gurevitz & Rosenson, 2024). Debido a que ambos padecimientos son de curso lento y generalmente asintomáticos (Gratacós-Ginès et al., 2025), las personas que cursan con estas enfermedades suelen ser diagnosticadas en etapas avanzadas de dichas patologías, lo cual compromete en mayor medida la salud de los pacientes (Dey, 2025). Una de las complicaciones más comunes de la MASLD es la enfermedad conocida como esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH, Metabolic-Associated Steatohepatitis) (Day & James, 1998; Miquilena Colina & García Monzón, 2011), la cual, además de la presencia excesiva de grasa hepática, cursa con inflamación lobulillar y necrosis en etapa inicial (García Monzón, 2001; Hagström et al., 2024; Moctezuma-Velázquez,

2018a; Targher et al., 2024). La desatención de esta enfermedad evoluciona hacia fibrosis hepática, elevando drásticamente el riesgo de desarrollar cirrosis hepática y hepatocarcinoma celular (Brunt et al., 1999).

El tratamiento de ambas enfermedades se centra en la reducción de factores de riesgo y la administración de fármacos orales como fibratos y estatinas para el caso de las DLPs; o ácido nicotínico y vitamina E para tratar el hígado graso (de Oliveira et al., 2024; Sanyal et al., 2010). Sin embargo, es común observar prescripciones médicas con fármacos adicionales a los anteriores, como metformina, glibenclamida, furosemida, losartán etc., los cuales se implementan con la finalidad de reducir otras comorbilidades como la resistencia a la insulina/diabetes o la hipertensión, padecimientos comunes que suelen acompañar a la DLP y la MASLD/MASH en personas con síndrome metabólico. Esto ocasiona, por un lado, un elevado gasto público en el tratamiento de los derechohabientes a los sistemas de salud públicos del país; y por otro, una acumulación de efectos secundarios y adversos en un mismo sujeto, producto de la administración simultánea de diversos fármacos (Muscarì et al., 2002; Simic & Reiner, 2015).

Considerando lo anterior, aunado al hecho de que los compuestos naturales administrados en cantidades adecuadas poseen perfiles de efectos secundarios menores documentados en comparación con los fármacos (Fatima et al., 2025), recientemente, mediante el lanzamiento de la Biblioteca Global de Medicina Tradicional, la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud han reconocido que la medicina tradicional (basada en compuestos naturales) debe retomarse en la actualidad, y debe formar parte esencial del tratamiento de las enfermedades metabólicas y no metabólicas, por lo que debe continuar siendo objeto prioritario de investigación científica y formación académica (PAHO, 2025). En relación con esto, los aceites comestibles como el aceite de pescado y los aceites de semillas son ricos en ácidos grasos poliinsaturados esenciales omega-3 (Harris, 2004; Saini & Keum, 2018), un tipo de lípidos funcionales cuya naturaleza bioquímica les permite intervenir y modular favorablemente diferentes aspectos fisiológicos como el estrés oxidativo (Lima Rocha et al., 2022), la inmunidad (Nishimoto et al., 2009), la inflamación y el metabolismo de los propios lípidos (Shearer et al., 2012). Los ácidos grasos omega-3 son los principales lípidos funcionales reconocidos en la literatura. Ahora bien, los tres principales omega-3 de la dieta son el ácido eicosapentaenoico

(EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA), y el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) (Saini & Keum, 2018). Los dos primeros se encuentran en fuentes dietéticas marinas como pescados azules y aceites de pescado, mientras que el ALA es el omega-3 vegetal (Sala-Vila et al., 2022). Ahora bien, aunque a nivel científico el aceite de pescado y sus principales ácidos grasos omega-3 han sido recurrentemente investigados bajo múltiples enfoques biomédicos (da Cunha de Sá et al., 2021; D'Alessandro et al., 2002; Dasilva et al., 2015; Ding et al., 2022; Feng et al., 2025; S. W. Kim et al., 2020; Lima Rocha et al., 2022; Majewski et al., 2020; Nishimoto et al., 2009; Popović et al., 2012; Shearer et al., 2012; Tan et al., 2024; Troesch et al., 2020; X. Yang et al., 2024), los efectos a la salud de otros aceites como el aceite de chía y la propia semilla de chía han sido menos investigados (Ayerza & Coates, 2005; Enes et al., 2020; Fernández-Martínez et al., 2019; Sachi et al., 2024); además de que los enfoques mecanísticos en torno a dicha fuente botánica son prácticamente inexistentes en la literatura biomédica actual.

Por ello, este trabajo de investigación se propuso estudiar y contrastar los efectos de la suplementación con aceite o semilla de chía sobre la dislipidemia y le esteatohepatitis experimentales, desde una perspectiva bioquímica y metabolómica/mecanística, a fin de contribuir con el cuerpo de evidencia actual que soporta el uso de la medicina tradicional en la prevención y el tratamiento de enfermedades metabólicas.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Dislipidemias

#### 2.1.1 Definición y clasificación

Las dislipidemias (DLPs) son patologías en las cuales las concentraciones de los lípidos sanguíneos se ven alterados. Generalmente, se manifiestan como elevaciones del colesterol total (CT), los triglicéridos (TGs), y/o las lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como una disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Purva et al., 2020). De este modo, la hipercolesterolemia (HCT) hace alusión a un tipo de DLP donde la elevación de los niveles de colesterol plasmático se da de forma aislada, mientras que la hipertrigliceridemia (HTG) se refiere a la elevación únicamente de TGs sanguíneos. Las DLPs representan un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) como la aterosclerosis, la isquemia y los infartos (Berberich & Hegele, 2022; Gurevitz & Rosenson, 2024; Pavía et al., 2020; Pirillo et al., 2021). La magnitud de este problema de salud exige una comprensión profunda de su distribución y determinantes tanto a nivel global como en el contexto específico de México. Según el patrón de lípidos alterados, la clasificación de Fredrickson-OMS distingue seis fenotipos de DLPs, los cuales se describen a detalle en la **Tabla 1**. Por otro lado, según el origen, las DLPs también pueden clasificarse como primarias o genéticas, y secundarias (Purva et al., 2020).

#### 2.1.2 Factores de riesgo, causas y consecuencias clínicas

Generalmente las dislipidemias primarias son causadas por una o múltiples mutaciones genéticas que dificultan la eliminación de triglicéridos y LDL, lo que incrementan la producción de lípidos en el hígado. Otras DLPs primarias también pueden ser el resultado de disminuciones en la producción de las HDL o aumento de su aclaramiento, ocasionando que distintos tipos de lípidos se acumulen en la sangre. Por otra parte, las dislipidemias secundarias son causadas por factores como el uso de alcohol, el sedentarismo, la baja actividad física, una ingesta dietética excesiva de grasas saturadas, trans y/o colesterol. Asimismo, algunas enfermedades como la diabetes o resistencia a la insulina, y las enfermedades hepáticas o renales, también pueden causar dislipidemias (Berberich & Hegele, 2022; Hirano, 2018; Purva et al., 2020).

**Tabla 1.**

Clasificación de Fredrickson-OMS.

Fenotipo	Lipoproteínas elevadas	Colesterol total sérico	Triglicéridos séricos	Apariencia del plasma	Actividad lipolítica post-heparina	Tolerancia a la glucosa	Inducibilidad por carbohidratos	Tolerancia a las grasas
<b>I</b>	Quilomicrones	Normal a ↑	↑	Creinoso	↓	Normal	Puede ser anormal	Marcadamente anormal
<b>IIa</b>	LDL	↑	Normal	Claro	Normal	Usualmente normal	Normal	Normal
<b>IIb</b>	LDL y VLDL	↑	↑	Claro o turbio	Normal	Usualmente normal	Normal	Normal
<b>III</b>	Remanentes de VLDL, quilomicrones	↑	↑	Claro, turbio o lechoso	Normal	Frecuentemente normal	Anormal	Ligeramente anormal
<b>IV</b>	VLDL	Normal a ↑	↑	Claro, turbio o lechoso	Normal	Usualmente normal	Usualmente anormal	Usualmente normal
<b>V</b>	Quilomicrones y VLDL	↑	↑	Creinoso	↓ o normal	Frecuentemente normal	Usualmente anormal	Anormal

(S. Wong et al., 2012)

Las DLPs incrementan los depósitos grasos en los vasos sanguíneos, promoviendo la aparición de enfermedades coronarias como aterosclerosis, aneurismas, gangrena, entre otros. Las DLPs también se han relacionado con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), ciertos cánceres, síndrome de ovario poliquístico trastornos mentales, e incluso hiperplasia prostática benigna (Purva et al., 2020).

### **2.1.3 Signos y síntomas**

Las DLPs leves rara vez suelen dar síntomas, sin embargo, elevaciones importantes de los niveles de lípidos en sangre pueden dar lugar a la aparición de confusión, disnea, mareos, hormigueo, pinchazos, ardor etc. Asimismo, está bien documentado que niveles cercanos a 1000 mg/dL de TGs en sangre pueden causar pancreatitis aguda, y niveles superiores a 2000 mg/dL pueden ocasionar que los vasos sanguíneos y el plasma adquieran una apariencia lechosa blanquecina (Purva et al., 2020). Por supuesto, la pancreatitis aguda ocasionada por la HTG y el hecho de que las DLPs pueden causar enfermedades cardiocoronarias hace que en ciertos casos extremos las DLPs indirectamente ocasionen síntomas asociados a estos padecimientos.

### **2.1.4 Epidemiología**

A escala global, la trascendencia de las dislipidemias es indiscutible. Las enfermedades cardiovasculares que causan las DLPs se han consolidado como la principal carga de enfermedad y mortalidad a nivel mundial, superando la mortalidad por causas infecciosas (Alcocer & García de León, 2013). Si bien las dislipidemias primarias o familiares de origen genético siguen constituyendo la causa primordial de los casos de DLP, las dislipidemias secundarias, es decir, aquellas que están directamente ligadas a factores de riesgo modificables son el tipo de DLPs que han tenido un repunte importante en las últimas décadas. A nivel global, la hipercolesterolemia es la forma más común DLP; sin embargo, en regiones como América Latina, se ha identificado una alta prevalencia del perfil conocido como dislipidemia aterogénica, caracterizado por la triada de c-HDL bajo, triglicéridos elevados y partículas de c-LDL pequeñas y densas (Ignacio Ponte-Negretti et al., 2017).

En el plano nacional, la epidemiología de las dislipidemias se alinea con la transición demográfica y nutricional que ha enfrentado el país, convirtiéndose en un problema de salud pública de

dimensiones crecientes. El perfil lipídico elevado es considerado uno de los ocho factores de riesgo más importantes para la mortalidad cardiovascular en el territorio nacional (Barquera & Campos, 2009; Soto-Estrada et al., 2016). Esta tendencia se ha documentado a través de las encuestas nacionales de salud y nutrición. Por ejemplo, los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) indican un aumento constante y alarmante en el diagnóstico de DLPs. Específicamente, la prevalencia de diagnóstico médico previo de hipercolesterolemia en la población adulta se disparó, pasando de un 8.6% en 2006 a un 30.6% en 2022 (Escamilla-Núñez et al., 2023). A diferencia de otras regiones, las formas predominantes de dislipidemia en la población mexicana son la hipoalfalipoproteinemia (c-HDL bajo) y la hipertrigliceridemia, perfil que, como se mencionó anteriormente, integra la dislipidemia aterogénica (Alcocer & García de León, 2013). Esta alteración se encuentra estrechamente vinculada a la también creciente epidemia de obesidad en el país. Un estudio reciente en pacientes con diagnóstico de obesidad reveló que una abrumadora mayoría de los participantes, el 77%, presentaba alguna forma de alteración lipídica, siendo la hipertrigliceridemia la más común (Vargas Alfaro et al., 2024). Además, la edad es un factor clave en su ocurrencia, y la coexistencia de la dislipidemia con otras comorbilidades crónicas, como la hipertensión arterial sistémica, es frecuente, exacerbando el riesgo de eventos cardiovasculares mayores en la población adulta (Escobedo-De La Peña et al., 2014).

Las DLPs tanto primarias como secundarias resultan de alteraciones del metabolismo lipídico a distintos niveles. Por ello, para entender mejor la fisiopatología de las DLPs, a continuación, se ofrece una descripción de los aspectos fundamentales que integran el metabolismo lipídico, con cierto grado de detalle.

### 2.1.5 Fundamentos del metabolismo lipídico

La **Figura 1** integra los procesos fundamentales del metabolismo de lipídico, el cual incluye la vía exógena (procesamiento de lípidos dietéticos), la vía endógena (distribución de lípidos sintetizados en el hígado) y el transporte reverso del colesterol (eliminación de colesterol excedente) (Purva et al., 2020). Primeramente, en el epitelio intestinal, los lípidos provenientes de la dieta, es decir, el colesterol libre, los triglicéridos y los ésteres de colesterol, son hidrolizados por lipasas pancreáticas e internalizados principalmente mediante los transportadores

membranales NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) y FAT/CD36 (Li et al., 2017), los cuales se encargan de la absorción de colesterol y ácidos grasos de cadena larga, respectivamente (Hussain, 2014). Los ácidos grasos de cadena media no necesitan transportadores membranales específicos y se absorben mediante mecanismos de difusión. Tras su entrada al interior de los enterocitos, estos lípidos son transferidos al retículo endoplásmico, donde la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTTP) cataliza la movilización de triglicéridos y ésteres de colesterol hacia ApoB-48, proceso esencial que permite la biogénesis de los quilomicrones (Hussain, 2014). Una vez formados los quilomicrones, la proteína SAR1B (Secretion-Associated Ras-Related GTPase 1B) permite el empaquetamiento y exportación de estas lipoproteínas junto con ApoB-48 desde el retículo endoplasmático de los enterocitos hacia el torrente sanguíneo.

En la circulación, los quilomicrones adquieren ApoC-2, ApoC-3 y ApoA-5, apoproteínas que modulan su interacción con la lipoproteína lipasa (LPL). La actividad de la LPL, anclada al endotelio a través del complejo LMF1–GPIHBP1, permite la hidrólisis de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos hacia tejidos periféricos, mientras que proteínas reguladoras como ANGPTL3 y ANGPTL4 inhiben la actividad de LPL en respuesta al estado energético del organismo (Mahley & Ji, 1999). La lipólisis progresiva convierte a los quilomicrones en remanentes de quilomicrones, los cuales están enriquecidos en colesterol y ApoE. Estos remanentes son captados principalmente por el hígado mediante la proteína 1 relacionada con el receptor de LDL (LRP1), a fin de reciclar sus componentes esenciales (colesterol, proteínas, fosfolípidos) y transformarlos en bilis, aminoácidos reutilizables o triglicéridos sintetizados de novo, respectivamente. Este mecanismo es central para la depuración de lípidos excedentes (Mahley & Ji, 1999).

Dentro del hepatocito, el colesterol suministrado por los remanentes de quilomicrones modula por retroalimentación negativa la actividad del factor transcripcional SREBP2, regulando a la baja la expresión de HMG-CoA reductasa (HMGCR), e incrementando la expresión del receptor de LDL (LDLR), mecanismos que reducen la colesterogénesis de novo e incrementan la degradación de colesterol, respectivamente (Brown & Goldstein, 2009). Paralelamente, el hígado sintetiza y secreta VLDL a partir de los triglicéridos de la dieta o de los TGs biosintetizados de novo, pero esta vez los ensambla con ApoB-100 como apolipoproteína estructural (Hussain, 2014). En el

espacio intravascular, la LPL y posteriormente la lipasa hepática (HL) transforman las VLDL en IDL y finalmente en LDL, partículas altamente enriquecidas en ésteres de colesterol (Mahley & Ji, 1999). Las LDL son internalizadas por tejidos periféricos y hepáticos mediante el receptor de LDL (LDL-R), con asistencia del complejo proteico adaptador 1 (LDLRAP1), que facilita su endocitosis, la cual es dependiente de clatrina (Brown & Goldstein, 2009). Dentro del metabolismo lipídico, tanto en hígado como en tejidos periféricos, la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), dirige al LDL-R hacia la degradación lisosomal en lugar del reciclaje, aumentando las concentraciones plasmáticas de LDL, mecanismo regulador central del metabolismo lipoproteico (Horton et al., 2009).

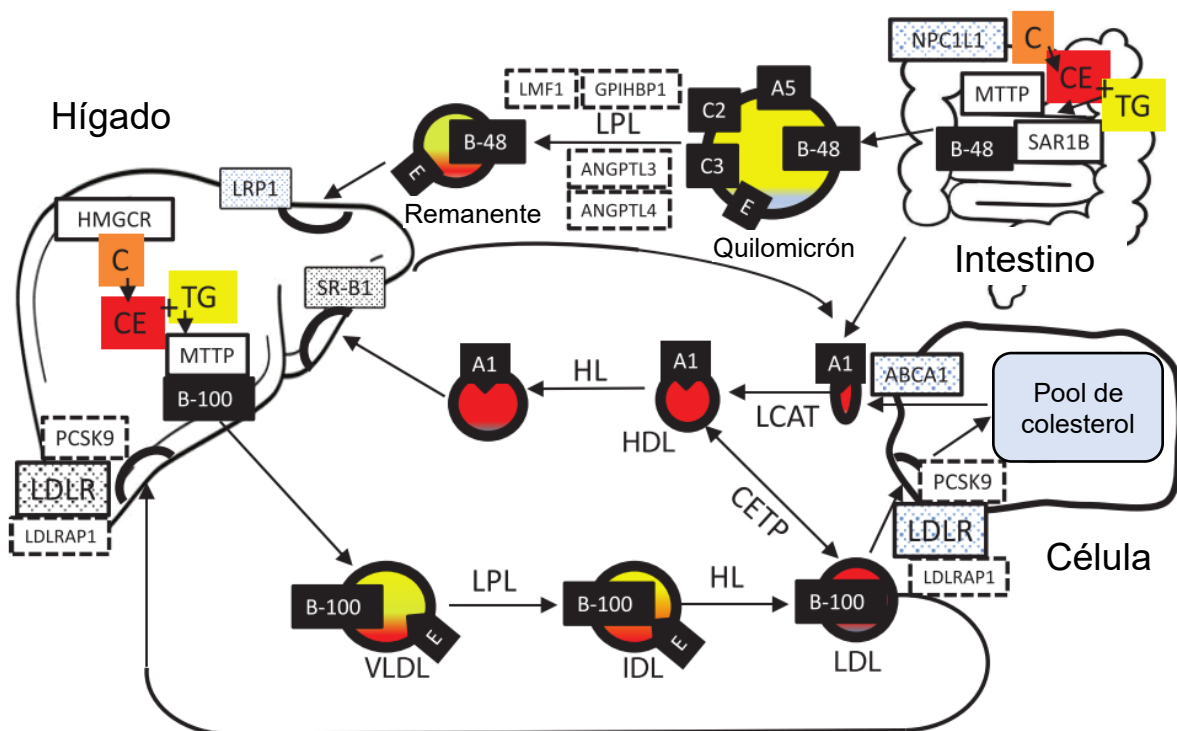


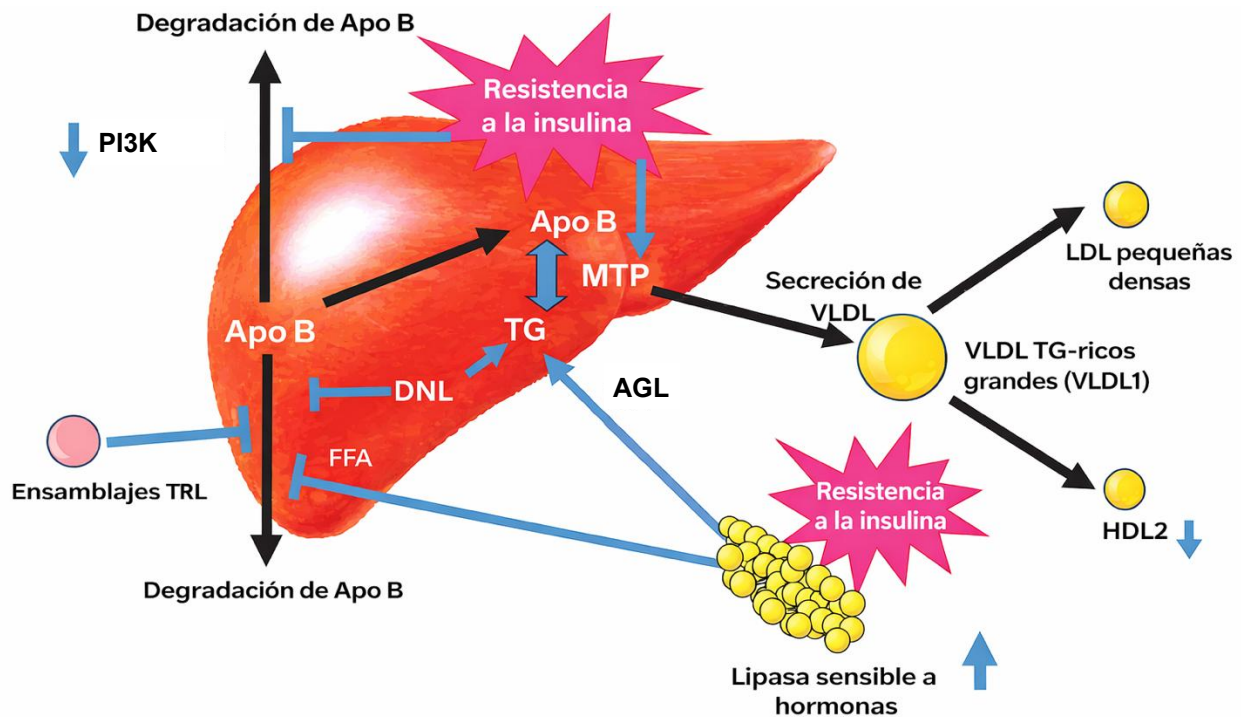
Figura 1. Metabolismo lipídico (Berberich & Hegele, 2022).

En paralelo con lo anterior opera el metabolismo de las HDL, las cuales son fundamentales para llevar a cabo un proceso vital de remoción de colesterol de los tejidos, el transporte reverso de colesterol (Figura 1). En este proceso, las partículas de HDL naciente formadas en el hígado e intestino y compuestas esencialmente por ApoA-1, adquieren fosfolípidos y colesterol a través del transportador ABCA1. Este paso se considera limitante para la formación de HDL (Tall, 1993). Después, la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) esterifica el colesterol libre,

permitiendo la conversión de HDL discoidal en partículas esféricas maduras (Tall, 1993). El colesterol esterificado puede ser transferido a lipoproteínas ricas en ApoB mediante la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), intercambiándose por triglicéridos, lo cual cambia la composición lipídica de las lipoproteínas (remodelación de lipoproteínas) (Tall, 1993). Alternativamente, las HDL entregan colesterol al hígado a través del receptor SR-B1, lo cual es esencial para la eliminación hepatobiliar del colesterol (Mahley & Ji, 1999).

### 2.1.6 Fisiopatología de las dislipidemias

Debido a que en el metabolismo lipídico están involucradas una gran cantidad de proteínas, hormonas, enzimas y factores transcripcionales, una única anomalía en cualquiera de ellos puede dar lugar a la aparición de DLPs (Purva et al., 2020). Además, los mecanismos fisiopatológicos que rigen la aparición de los diferentes tipos de DLPs varían enormemente. A continuación, se ofrece un enfoque fisiopatológico de la hipertrigliceridemia diabética (**Figura 2**), debido a que esta variante es uno de los principales tipos de DLP observados, dada la elevada tasa de resistencia a la insulina y DMT2 entre la población.



**Figura 2.** Efectos fisiopatológicos de la resistencia a la insulina sobre la producción de DLP, específicamente sobre la producción de lipoproteínas VLDL y HDL. (Hirano, 2018).

Cuando una persona padece resistencia a la insulina (RI) o DMT2, se produce un estado de hiperglucemia crónica debido a que la insulina no es capaz de disminuir la glucosa sanguínea a los niveles basales, y esto puede deberse a alteraciones en la producción, secreción y/o acción de la insulina en los tejidos insulino-dependientes. La hiperglucemia genera una hiperinsulinemia compensatoria, la cual a su vez impacta enormemente en los niveles de TGs circulantes, ya que, al perderse parte de la sensibilidad a la insulina, el efecto antilipolítico de esta hormona también se pierde, lo cual incrementa los niveles de ácidos grasos libres (AGL) provenientes del tejido adiposo. Esto a su vez aumenta el empaquetamiento de ácidos grasos en el hígado en triglicéridos y estos en VLDL, en un intento de acarrearlos a los tejidos para ser utilizados como energía y así normalizar los niveles. De esta manera, en personas con DMT2 la DLP diabética se debe a un incremento en la producción de TGs y VLDL (**Tabla 2**) (Hirano, 2018). Esto es diferente a lo que ocurre, por ejemplo, en pacientes con diabetes tipo 1, en donde la hipertrigliceridemia es consecuencia de defectos en la eliminación de TGs y VLDL y no del aumento en su producción (Hirano, 2018).

**Tabla 2.**

Papel de la insulina y efectos de la RI sobre el metabolismo de las VLDL (Hirano, 2018).

Alteraciones metabólicas	Insulina	RI	Impacto en el metabolismo de VLDL
Flujo de AGL al hígado	↓	↑	Aumento de la secreción de VLDL
Degradación intracelular de ApoB	↑	↓	Aumento de la secreción de VLDL
Lipogénesis de novo	↑	↑ *	Aumento del tamaño de VLDL
MTP	↓	↑	Estimulación del ensamblaje de VLDL
LPL	↑	↓	Disminución del catabolismo de VLDL
ApoC3	↓	↑	Disminución del catabolismo de VLDL

\*mecanismo indirecto

Ácidos grasos libres (AGL); Apolipoproteína C3 (ApoC3); Lipoproteína lipasa (LPL); Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP); Resistencia a la insulina (RI).

Las DLPs participan en la patogénesis de la aterosclerosis. En la dislipidemia, el exceso de colesterol principalmente en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL) tiende a infiltrarse en el endotelio vascular, donde sufre un proceso de oxidación. Este proceso estimula al endotelio a expresar moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1) y selectina endotelial (E-selectina). Estas

moléculas facilitan la adherencia de los monocitos a la pared de los vasos sanguíneos. Posteriormente, estos monocitos migran hacia el tejido subendotelial donde se diferencian en macrófagos, secretando proteínas proinflamatorias como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) además, secretan citocinas como la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6), las cuales favorecen la oxidación del colesterol. A medida que los macrófagos captan el colesterol oxidado, se transforman en células espumosas, que se acumulan progresivamente en la pared del vaso sanguíneo, originando la formación de placas ateroscleróticas. Estas placas obstruyen el flujo sanguíneo de manera gradual, contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis e incrementando el riesgo eventos cardiovasculares (Bereda, 2022).

### 2.1.7 Diagnóstico de las dislipidemias

En la clínica, el diagnóstico de DLPs suele realizarse mediante un perfil lipídico en sangre, el cual, en su forma más básica, incluye la determinación de los niveles de colesterol total, triglicéridos, LDL, y HDL. La **Tabla 3** muestra los valores deseables de lípidos sanguíneos para adultos sanos, según su nivel de riesgo cardiovascular.

Por otro lado, las DLPs genéticas o primarias, además de un perfil lipídico convencional, a menudo requieren diagnóstico molecular para poder ser identificadas. A continuación, se describe brevemente cada uno de los biomarcadores de DLP que integran un perfil lipídico convencional.

#### 2.1.7.1 Colesterol

El colesterol es una molécula lipídica compuesta por 27 átomos de carbono, indispensable para diversas funciones fisiológicas. Participa en la función, estructura y señalización de las membranas celulares, además de involucrarse en procesos como la digestión y absorción lipídica en el intestino, así como el equilibrio hidrosalino y el metabolismo de calcio y fósforo (Cortes et al., 2014). En humanos, el colesterol puede provenir de la dieta, de la síntesis de novo de colesterol a partir de Acetil-CoA, o bien, de la bilis. Los niveles de LDL y de colesterol total en circulación están positivamente correlacionados (Li et al., 2017).

### *2.1.7.2 Triglicéridos*

Los triglicéridos (TGs) son moléculas lipídicas formadas por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos mediante enlaces éster. Su función principal es el almacenamiento de energía, ya que representan la forma más eficiente para conservar calorías en el organismo. Aproximadamente el 85% de la energía almacenada en el cuerpo es en forma de TGs, y se encuentran principalmente en el tejido adiposo. Los TGs se transportan a través del torrente sanguíneo dentro de lipoproteínas, las cuales funcionan como acarreadores. Los principales órganos involucrados en su metabolismo son el hígado y el tejido adiposo. La regulación del metabolismo de los TGs ocurre mediante mecanismos alostéricos, transcripcionales y nutricionales, los cuales responden a las necesidades metabólicas del organismo y al balance energético (Karantonis et al., 2009).

### *2.1.7.3 Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)*

Las lipoproteínas de muy baja densidad, las cuales suelen denominarse VLDL como acrónimo de sus iniciales en inglés “Very Low-Density Lipoproteins”, son lipoproteínas grandes y poco densas cuya composición es rica en TGs y colesterol. Estructuralmente, las VLDL tienen una composición de apolipoproteínas similar a la de los quilomicrones con excepción de dos aspectos: no contienen ApoA-I y presentan la forma completa de ApoB (Apo B-100) debido a que, en el hígado, que es donde se sintetizan las VLDL, no se expresa la enzima que edita la ApoB. La Apo B-100 es la proteína estructural de las VLDL y de las lipoproteínas que se sintetizan a partir de estas (remanentes), es decir, IDL, LDL, y lipoproteína A (Errico et al., 2013). Las VLDL se encargan de realizar el transporte de lípidos desde el hígado hacia los tejidos extrahepáticos, principalmente músculo y tejido adiposo. Se cree que el principal estímulo para la formación de VLDL es la captación hepática de remanentes de quilomicrones (Errico et al., 2013). Son consideradas partículas aterogénicas, en especial aquellas que tienen menor tamaño y contenido en TGs, es decir, mayor contenido de colesterol (Argüeso Armesto et al., 2011).

### *2.1.7.4 Lipoproteínas de baja densidad (LDL)*

Las lipoproteínas de baja densidad o LDL (Low-Density Lipoproteins) se caracterizan por contener en su estructura la apoproteína ApoB-100 y ser ricas en ésteres de colesterol (Errico et

al., 2013). La función principal de las LDL es transportar y abastecer de colesterol a los tejidos, incluyendo el hígado. Para lograrlo la ApoB-100 y la ApoE de las LDL son reconocidas por el receptor de LDL (LDLR), lo cual activa la endocitosis mediada por clatrina, tras lo cual la LDL es hidrolizada para liberar su contenido, obteniendo colesterol y ácidos grasos de la hidrolisis de los ésteres de colesterilo, y aminoácidos a partir de la hidrolisis de las proteínas que conforman la LDL (Errico et al., 2013). Las LDL son el producto final del metabolismo de las VLDL y el fenotipo B de estas lipoproteínas, caracterizado por ser un tipo de lipoproteínas pequeñas y densas, se considera especialmente aterogénico (Argüeso Armesto et al., 2011).

### Tabla 3.

Perfil lipídico deseable para personas adultas según su nivel de riesgo cardiovascular.

Parámetro	Valores deseables en adultos
Colesterol total	< 200 mg/dL (5.17 mmol/L)
Colesterol-HDL	> 50 mg/dL mujeres (1.29 mmol/L) > 40 mg/dL hombres (1.03 mmol/L)
Colesterol no-HDL	Valores recomendados según el RCV: RCV muy alto: < 85 mg/dL (2.2 mmol/L) RCV alto: < 100 mg/dL (2.6 mmol/L) RCV moderado: < 130 mg/dL (3.4 mmol/L)
Colesterol LDL	Valores recomendados según el RCV: RCV muy alto: < 55 mg/dL (1.4 mmol/L) RCV alto: < 70 mg/dL (1.8 mmol/L) RCV moderado: < 100 mg/dL (2.6 mmol/L) RCV bajo: < 116 mg/dL (3 mmol/L)
Triglicéridos	< 150 mg/dL en ayunas (1.69 mmol/L) < 175 mg/dL no en ayunas (1.97 mmol/L)
Apolipoproteína B	Valores recomendados según el RCV: RCV muy alto: < 65 mg/dL (1.27 $\mu$ mol/L) RCV alto: < 80 mg/dL (1.56 $\mu$ mol/L) RCV moderado: < 100 mg/dL (1.95 $\mu$ mol/L)

---

Lipoproteína (a) < 50 mg/dL (105 nmol/L)

---

RCV: riesgo cardiovascular. HDL: lipoproteínas de alta densidad. LDL: lipoproteínas de baja densidad. Colesterol de partículas residuales: CT – c-LDL – c-HDL. Adaptado de Arrobas Veilla et al. (2023).

### 2.1.7.5 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las lipoproteínas de alta densidad o HDL (High-Density Lipoproteins) son lipoproteínas cuyos precursores se forman en el hígado y en el intestino. Estructuralmente se caracterizan por contener ApoA-1 y ser ricas en ésteres de colesterol. Las HDL pueden formarse a partir del catabolismo otras partículas lipoproteicas y su síntesis depende por un lado de la degradación de quilomicrones y VLDL y por otro de la síntesis de ApoA-1 por parte del hígado y del intestino (Errico et al., 2013). Estas lipoproteínas se encargan de realizar el transporte inverso del colesterol, es decir, el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado, para ser degradado y transformado en bilis, lo cual disminuye los depósitos de colesterol en los compartimentos corporales. Debido a estas funciones, las HDL se consideran partículas cardioprotectoras o antiaterogénicas (Argüeso Armesto et al., 2011). La **Tabla 4** muestra las principales clases de lipoproteínas, así como algunas de sus características más relevantes.

**Tabla 4.**

Clases de lipoproteínas y sus características principales (Feingold, 2022).

Lipoproteína	Densidad (g/mL)	Tamaño (nm)	Lípidos principales	Apolipoproteínas principales
QM	<0.930	75-1200	TGs	APO B-48, APO C, APO E, APO A-1, A-II, A-IV
QMr	0.930-1.006	30-80	TGs, COL	APO B-48, APO E
VLDL	0.930-1.006	30-80	TGs	APO B-100, APO E, APO C
IDL	1.006-1.019	25-35	TGs, COL	APO B-100, APO E, APO C
VLDLr	1.006-1.019	25-35	TGs, COL	APO B-100, APO E, APO C
LDL	1.019-1.063	18-25	COL	APO B-100
HDL	1.063-1.210	5-12	COL, FL	APO A-I, APO A-II, APO C, APO E
Lp (a)	1.055-1.085	~30	COL	APO B-100, APO (a)

Colesterol (COL); fosfolípidos (FL); lipoproteína a (Lp a); quilomicrones (QM); remanentes de quilomicrones (QMr); remanentes de VLDL (VLDLr); triglicéridos (TGs).

### 2.1.8 Tratamiento de las dislipidemias

El tratamiento farmacológico es el principal eje terapéutico de las DLPs (**Tabla 5**). Se enfoca en la reducción del riesgo cardiovascular mediante la disminución de las concentraciones plasmáticas de colesterol LDL, triglicéridos y en algunos casos, el aumento del colesterol HDL.

**Tabla 5.**

Principales tratamientos farmacológicos para las dislipidemias.

Grupo farmacológico	Fármaco	Mecanismo de acción	Efecto predominante
Estatinas	Atorvastatina	Inhiben la enzima HMG-CoA reductasa, disminuyendo la síntesis hepática del colesterol y aumentando la expresión de receptores LDL	↓LDL/TGs, ↑HDL
	Rosuvastatina,		
	Simvastatina		
Fibratos	Fenofibrato	Activa el receptor PPAR- $\alpha$ , aumentando la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de las VLDL	↓TGs, ↑HDL
	Gemfibrozil		
Inhibidores de la absorción de colesterol	Ezetimiba	Bloquea el transportador NPC1L1 en el intestino, reduciendo la absorción del colesterol dietético y biliar	↓LDL
Secuestradores de ácidos biliares	Colestiramina	Se unen a los ácidos biliares en el intestino, aumentando su excreción y el uso hepático del colesterol	↓LDL
	Colesevelam		
Inhibidores de PCSK9	Alirocumab	Inhiben la proteína PCSK9 aumentando el reciclaje de receptores hepáticos	↓LDL
	Evolocumab		
Ácidos grasos omega-3	EPA, DHA	Disminuyen la síntesis hepática de triglicéridos y la secreción de VLDL	↓TGs
Niacina	Niacina	Reduce la lipólisis en tejido adiposo y la síntesis hepática de VLDL	↑HDL, ↓TGs/LDL

(de Oliveira et al., 2024; Purva et al., 2020)

La elección del mejor tratamiento se relaciona directamente con el tipo de dislipidemia, el perfil lipídico del paciente, la presencia de comorbilidades, y el nivel de riesgo cardiovascular. Ahora bien, según sus mecanismos de acción, los fármacos pueden clasificarse en: 1) aquellos que

actúan como inhibidores de la síntesis hepática del colesterol; 2) los que disminuyen la absorción intestinal de lípidos; y 3) los que actúan aumentando el catabolismo de lipoproteínas aterogénicas. En la práctica clínica, las estatinas, cuyo mecanismo es la inhibición de la enzima HGM-CoA reductasa, fungen como tratamiento inicial, seguidas de una terapia complementaria como la administración de secuestradores de ácidos biliares. Otros fármacos incluyen a los fibratos, utilizados principalmente en la hipertrigliceridemia; la ezetimiba, que reduce la absorción intestinal del colesterol hasta un 70% (Li et al., 2017); y los inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9), los cuales son utilizados en pacientes de alto riesgo cardiovascular (Taher et al., 2024). La **Tabla 5** resume los principales tratamientos farmacológicos utilizados en la actualidad, sus mecanismos de acción, y sus efectos principales.

#### 2.1.9 Modelos experimentales de DLP en roedores

Como animales de experimentación, los roedores han aportado enormes contribuciones para la comprensión de la biología humana, derivado de la homología genética entre su especie y la de los humanos. Dentro de los modelos experimentales en roedores para inducir dislipidemia, se emplean diversos métodos que permiten hacer una simulación precisa del metabolismo lipídico bajo parámetros controlados. Estos modelos se clasifican en dietéticos, farmacológicos, genéticos y combinados; y cada uno presenta ventajas y también algunas limitantes. La elección adecuada de un modelo dependerá del objeto de estudio, el tiempo disponible, las interrogantes que se pretenden contestar, la disponibilidad de recursos, etc. Los modelos dietéticos destacan por su simplicidad, ya que al emplearse dietas hipercalóricas administradas de manera prolongada es posible simular los hábitos alimentarios de las personas. Este tipo de modelos replican muy bien la patogenia de las dislipidemias secundarias a hábitos dietéticos malos, ya que ocasionan un aumento de LDL y VLDL, y la disminución simultánea del HDL. Los modelos farmacológicos se destacan por inducir de forma más rápida y llevar un control más preciso. Ejemplo de estos modelos es el uso del polaxámero 407, un copolímero no iónico que causa una hiperlipidemia aguda. El mecanismo de acción del polaxámero 407 es la inhibición de la lipoproteína lipasa y de la lipasa hepática, enzimas clave en el catabolismo lipídico. Por consecuencia, esta inhibición tiende a marcar un aumento de triglicéridos y colesterol en el plasma sanguíneo, y especialmente en las fracciones VLDL y quilomicrones, en un periodo de 24 a 72 horas después de la

suministración (Hernandez-Baixauli et al., 2023). Otro modelo farmacológico para inducir dislipidemia es el uso de tiloxapol (Triton WR-1339). Este compuesto con propiedades surfactantes actúa inhibiendo la actividad de la lipoproteína lipasa, lo que impide la hidrólisis de triglicéridos en un lapso de 24 horas. Este modelo ocasiona un aumento súbito de los TGs principalmente, pero también de LDL y colesterol total. Los modelos genéticos son muy poco comunes por la complejidad y su alto costo, a pesar de su gran capacidad de reproducibilidad (Chalmeh et al., 2016) (Figura 3).

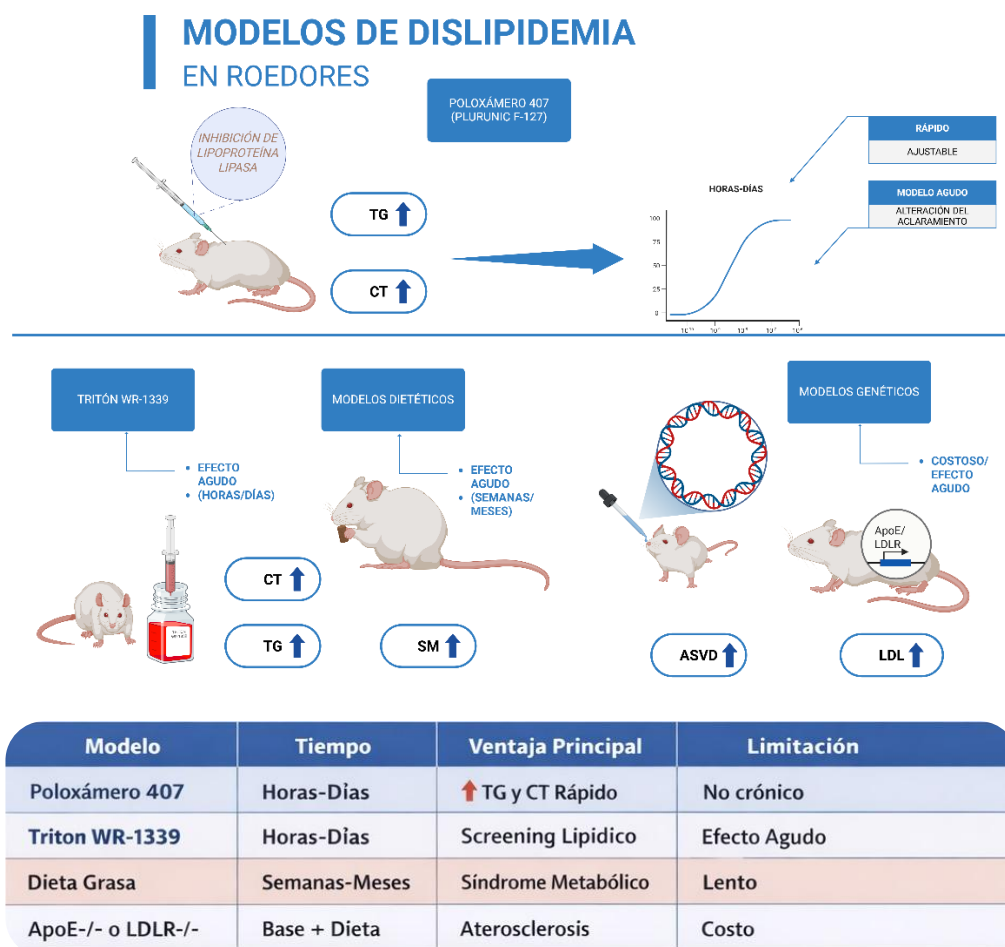


Figura 3. Algunos modelos experimentales de dislipidemia en roedores. Creada en <https://BioRender.com>

## 2.2 Relación entre dislipidemias y MASLD/MASH

La MASLD se asocia a alteraciones en el metabolismo lipídico, lo que genera un perfil dislipidémico. La progresión hacia la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH), donde su principal característica es la acumulación anormal de lípidos en el hígado, resulta en un

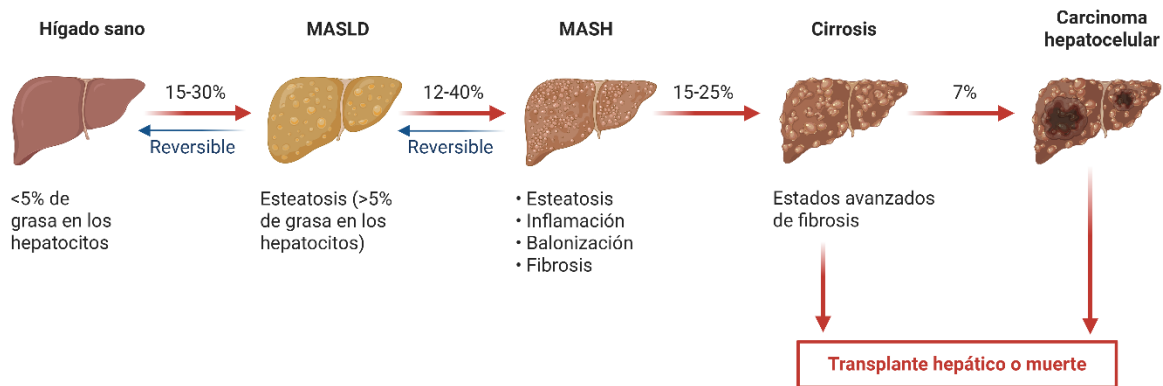
desequilibrio en diferentes rutas metabólicas, como incremento de la síntesis hepática de ácidos grasos (lipogénesis *de novo*), oxidación insuficiente de ácidos grasos, y una alteración en la exportación de lípidos mediante lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Gurevitz & Rosenson, 2024). La combinación de estos factores favorece a la acumulación hepática de triglicéridos y estimula la sobreproducción de VLDL, lo cual genera un perfil dislipidémico aterogénico, el cual se caracteriza por hipertrigliceridemia, incremento de LDL pequeñas y densas, y disminución de colesterol HDL (Martin et al., 2022).

Las lipoproteínas ricas en triglicéridos tienden a contener apolipoproteína C3 (ApoC3), las cuales activan a los receptores de tipo Toll (TLRs) 2 y 4, lo que induce la activación del inflamasoma NLRP3, encargado de la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 $\beta$ , la cual a su vez activa la vía IL1/IL6 /PCR. Esta vía se activa principalmente en pacientes con MASH (Martin et al., 2022).

## 2.3 Esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH)

### 2.3.1 Definición y clasificación

La enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés Metabolic-Associated Fatty Liver Disease) comprende un espectro de enfermedades hepáticas que va desde la esteatosis hepática o hígado graso, la esteatohepatitis, la fibrosis, la cirrosis, y el hepatocarcinoma (Yuan et al., 2025) (**Figura 4**). La definición de hígado graso, recién renombrado MASLD, se caracteriza por la acumulación en exceso de lípidos en los hepatocitos. Este nuevo término fue propuesto en el año 2023 para sustituir al término NAFLD (Non-alcoholic Fatty Liver Disease), usado con anterioridad. Al cambiar los criterios cardiometabólicos específicos, se facilita la identificación de pacientes con riesgo real de la presencia crónica de la enfermedad.



**Figura 4.** Espectro del hígado graso asociado a disfunción metabólica (MASLD). Creado en <https://BioRender.com>

Ahora bien, dentro de este espectro, la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH, Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis) representa una forma avanzada de la MASLD, la cual se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado acompañada de inflamación y daño hepatocelular (Targher et al., 2024). Esta condición puede progresar hacia fibrosis e incluso cirrosis y cáncer hepático (**Figura 4**). Algo que caracteriza a este espectro de enfermedades hepáticas, es que puede presentarse aún sin el consumo excesivo del alcohol (Pouwels et al., 2022). La MASH es la complicación necroinflamatoria de una esteatosis hepática persistente, formando la principal vía por la cual la esteatosis hepática puede progresar a cirrosis (García Monzón, 2001; Hagström et al., 2024; Moctezuma-Velázquez, 2018b).

### 2.3.2 Factores de riesgo, causas y consecuencias clínicas

Las causas tanto de MASLD/MASH se dividen en dos tipos principales: anormalidades metabólicas adquiridas o congénitas; y 2) drogas y toxinas (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015). La **Tabla 6** recoge las causas potenciales de MASLD. Por otro lado, la MASLD se asocia directamente con una amplia variedad de situaciones clínicas como el riesgo de síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus y la dislipidemia; pero sin duda, la obesidad se considera el principal factor etiológico (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015). La obesidad, en específico la obesidad visceral, inicialmente favorece la presencia de resistencia a la insulina y esto a su vez promueve la acumulación de TGs en los hepatocitos (Hagström et al., 2024). Además, factores como la edad avanzada, el género masculino, la ascendencia hispana, la presencia de infecciones crónicas, ciertas medicaciones, y el estilo de vida poco saludable, se relacionan con una mayor prevalencia de MASLD/MASH, lo cual incrementa el desarrollo de complicaciones graves y un mayor riesgo de eventos que ponen en peligro la vida (Gerges et al., 2021). Por otro lado, en un principio se creía que la MASH derivaba del abuso crónico de alcohol y se terminó acuñando en nombre de esteatohepatitis no alcohólica para los casos de esteatosis hepática con signos inflamatorios en pacientes que no consumen alcohol (García Monzón, 2001); sin embargo, ahora se reconoce a la MASLD como el principal factor de riesgo para el desarrollo de MASH.

### 2.3.3 Signos y síntomas

En sus etapas iniciales, tanto MASLD como MASH suelen ser asintomáticas, y solo a medida que la presencia de la enfermedad se hace crónica, los hallazgos clínicos reflejan un daño hepático importante que causa sintomatología (Gratacós-Ginès et al., 2025). Al inicio, las manifestaciones clínicas estas pueden ser inespecíficas; por ejemplo, los pacientes pueden experimentar la presencia de una fatiga excesiva, la disminución de la energía, aunado a un dolor agudo en el cuadrante superior derecho del abdomen. A medida que la inflamación del hígado se vuelve más significativa, los síntomas se vuelven más alarmantes, pudiendo haber la presencia de ictericia, una coloración amarillenta de la piel y los ojos consecuencia de la alteración metabólica de la bilirrubina. En ocasiones, esta coloración puede acompañarse de prurito de la piel de moderado a intenso (Farrugia et al., 2025).

**Tabla 6**

Potenciales causas de MASLD.

Trastornos metabólicos adquiridos	Fármacos citotóxicos y citostáticos	Otros fármacos y toxinas	Metales	Errores congénitos del metabolismo	Procedimientos quirúrgicos	Afecciones diversas
DMT2	L-asparaginasa	Amiodarona	Antimonio	Abeta-lipoproteinemia	Derivación biliopancreática	Exposición industrial a petroquímicos
Dislipidemia	Azacidina	4,4'-dietilamino-etoxihexestrol	Sales de bario	Hepatoesteatosis familiar	Resección intestinal	Enfermedad inflamatoria intestinal
Kwashiorkor y marasmo	Azaserina	Dicloroetileno	Cromatos	Galactosemia	Bypass gástrico	Lipodistrofia parcial
Obesidad	Bleomicina	Etionina	Fósforo	Enfermedad por almacenamiento de glucógeno	Bypass yeyunoileal	Diverticulosis yeyunal
Inanición	Metotrexato	Bromuro de etilo	Compuestos de talio	Intolerancia a la fructosa		Anemia grave
	Puromicina	Estrógenos	Compuestos de uranio	Homocistinuria		Nutrición parenteral total
	Tetraciclina	Glucocorticoides		Deficiencia sistémica de carnitina		
		Terapia antirretroviral		Tirosinemia		
		Hidrazina		Síndrome de Weber-Christian		
		Hipoglicina		Enfermedad de Wilson		
		Orotato Safrol Tamoxifeno				

Adaptada de (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015).

### 2.3.4 Epidemiología

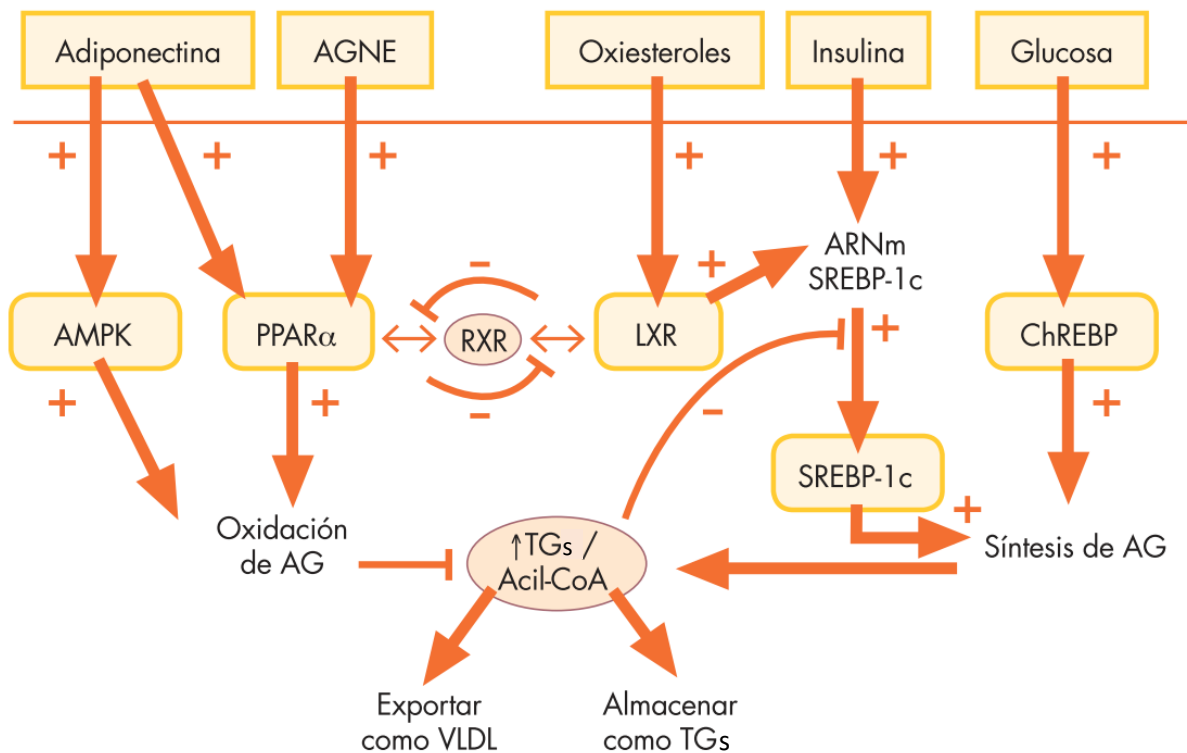
Se considera que la globalización, los ritmos de vida actuales, la obesidad y la diabetes forman parte de los factores etiológicos que ocasionan las altas cifras de MASLD y MASH que se observan en la actualidad a nivel mundial. Actualmente, el 38 % de los adultos y entre el 7% y el 14% de los niños y adolescentes presentan MASLD. Peor aún, para el año 2040 se estima que la prevalencia de MASLD en adultos incrementa hasta 55% en el mundo (Younossi et al., 2025).

Por otro lado, a nivel global, la MASH ya no se comporta como una enfermedad emergente, si no una epidemia establecida que avanza en paralelo a la diabetes y la obesidad, teniendo cifras del 5% de la población adulta y proyectando una estimación de 350 millones de casos de MASH en el mundo para el año 2030 (Cusi et al., 2025).

### 2.3.5 Homeostasis hepática de los lípidos

La homeostasis de los lípidos tiene lugar a nivel molecular. Entre los múltiples cometidos que cumple el hígado, una buena parte de ellos se centra en el control del metabolismo lipídico. Para mantener un balance en los lípidos corporales, el hígado detecta señales provenientes de hormonas como la adiponectina y la insulina y de moléculas diversas como ácidos grasos, oxisteroles, o la propia glucosa. Según el estímulo que reciba, el hígado es capaz de incrementar o disminuir la oxidación de ácidos grasos, o bien, aumentar o reducir la síntesis de lípidos como TGs, colesterol y partículas de ensamblaje de lípidos como las VLDL. Por ejemplo, la adiponectina es una hormona producida por el tejido adiposo cuyos niveles se correlacionan inversamente con la adiposidad. Esta hormona activa las cinasas dependientes de AMP (AMPK) y a los receptores nucleares PPAR- $\alpha$ , lo cual incrementa la tasa metabólica y promueve la oxidación de ácidos grasos (Rühl & Landrier, 2016). Por otro lado, los receptores PPAR- $\alpha$  hepáticos son activados por ácidos grasos libres (Han et al., 2017a), de tal manera que cuando hay incremento de ácidos grasos libres o no esterificados (AGNE) los PPAR- $\alpha$  hepáticos igualmente promueven la oxidación de ácidos grasos, previniendo la acumulación de estos en forma de TGs y acil-CoA dentro de los hepatocitos y en la sangre (Li et al., 2017). Por otro lado, el hígado a través de los receptores LXR censa los niveles de colesterol en sangre. Los LXR son activados por oxisteroles, principalmente derivados de la oxidación del colesterol. La activación de LXR incrementa la transcripción de sus genes diana, siendo el principal SREBP-1c (Estefes-Duarte et al., 2024). A su vez, los SREBPs

incrementan la transcripción de genes lipogénicos y colesterogénicos (Shimano & Sato, 2017). SREBP-1c controla genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que SREBP-2 activa genes del metabolismo del colesterol (Li et al., 2017). La insulina igualmente incrementa la expresión de SREBP-1c, promoviendo de igual manera la biosíntesis de ácidos grasos. La glucosa por su parte incrementa la síntesis de ácidos grasos al activar a la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) (DeBose-Boyd & Ye, 2018). Dada la compleja regulación de lípidos en el hígado, una sola anomalía como la resistencia a la insulina o el exceso de carbohidratos dietéticos promueve la aparición de problemas en el metabolismo lipídico, siendo la DLP y el hígado graso las manifestaciones más tempranas de dichos desbalances fisiológicos. La **Figura 5** esquematiza la compleja regulación molecular de los lípidos en el hígado.

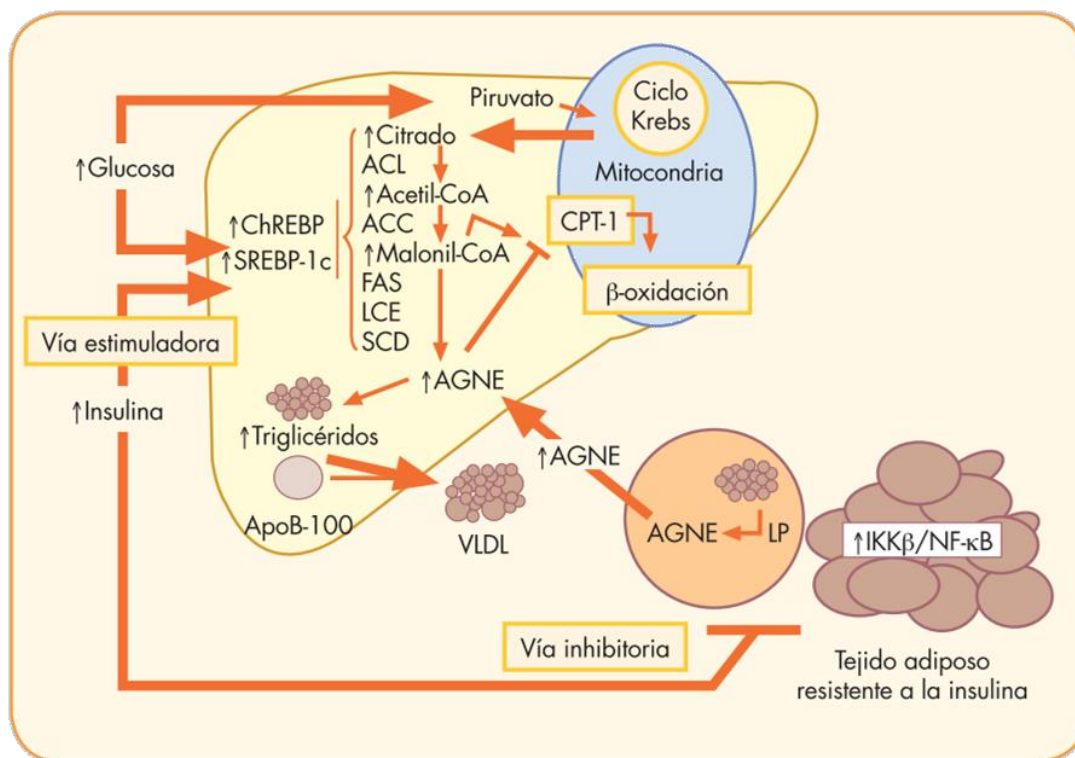


**Figura 5.** Homeostasis hepática de los lípidos. AGNE: ácidos grasos no esterificados; AMPK: cinasas activadas por adenosinmonofosfato; ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; LXR: receptor X del hígado; PPARγ: receptor gamma de los ligandos de la proliferación peroxisomal; RXR: receptor X retinoide; SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroles; TGs: triglicéridos. (Miquilena Colina & García Monzón, 2011).

### 2.3.6 Fisiopatología de la MASLD/MASH

La teoría del doble impacto (*double hit*) por puesta por Day & James (1998) es una de las más aceptadas para explicar la progresión de la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica

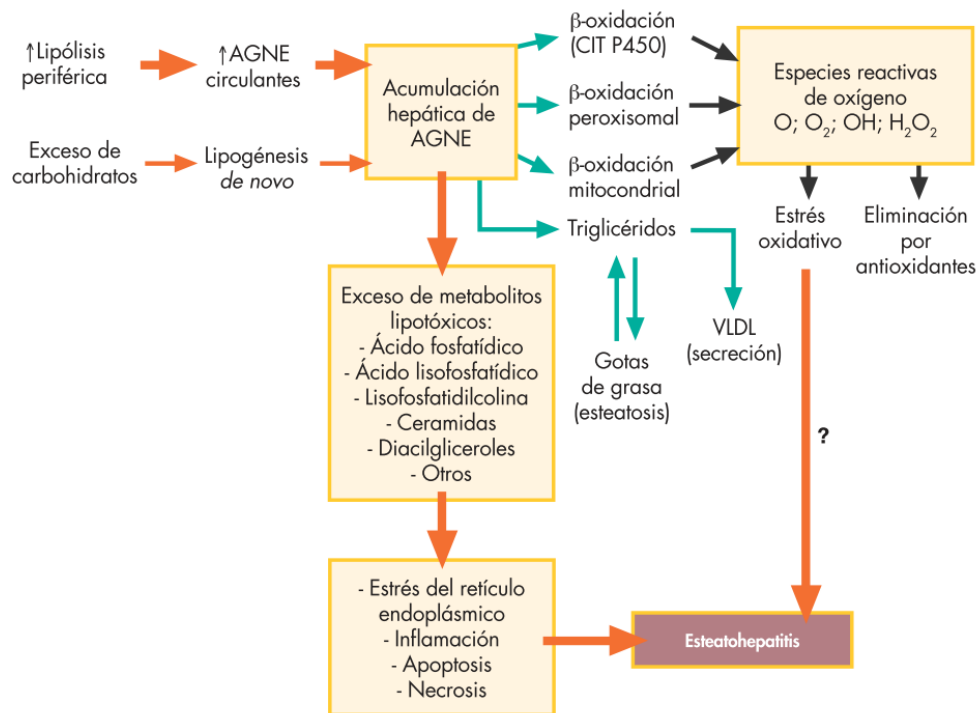
(MASH) (Gerges et al., 2021). El primer impacto consiste en la acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos (MASLD), asociada principalmente a la resistencia a la insulina (Figura 6). El segundo impacto (Figura 7) está relacionado con el estrés oxidativo, el cual se caracteriza por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, lo cual provoca inflamación, lipotoxicidad y daño celular, favoreciendo la progresión de la MASH (Pouwels, 2022).



**Figura 6.** Primer impacto: Patogénesis de la MASLD. En la teoría del doble impacto, la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos, ocasionada principalmente por la resistencia a la insulina, se considera el primer impacto. ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACL: ATP citrato liasa; AGNE: ácidos grasos no esterificados; ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-1; FAS: sintasa de ácidos grasos; IKKβ: cinasa beta del inhibidor κB; LCE: elongasa de ácidos grasos de cadena larga; LP: lipasa insulinosensible; NF-κB: factor nuclear kappa B; SCD: estearoil-CoA desaturasa; SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. (Miquilena Colina & García Monzón, 2011).

La resistencia a la insulina representa el primer impacto en la fisiopatología de la MASH. La insulina es una hormona anabólica que promueve el almacenamiento de energía en forma de TGs en los adipocitos, evitando la lipólisis (efecto antilipolítico). En la teoría del doble impacto, la RI secundaria a la obesidad ocasiona 2 fenómenos principales: 1) que el efecto antilipolítico de la insulina se pierda, lo cual ocasiona un incremento en la liberación de ácidos grasos libres a partir de los TGs en el tejido adiposo, producto de una activación sostenida de la lipasa sensible a insulina (también llamada lipasa sensible a hormonas, HSL); y 2) promueve la hiper producción

de la misma insulina, a fin de normalizar los niveles de glucosa en sangre. Después, la RI causa disminución en la producción energética a partir de carbohidratos, lo cual incrementa la gluconeogénesis hepática compensatoria. En conjunto, tanto la hiperinsulinemia como la glucosa excesiva (producto de la gluconeogénesis y el mal metabolismo de esta) activan la lipogénesis al estimular a los factores SREBP-1c y ChREBP, respectivamente (Petersen & Shulman, 2018). La inducción de estos dos factores en el hígado promueve un incremento en la transcripción de genes lipogénicos y colesterogénicos como ACL (ATP citrato liasa), ACC (acetil-CoA carboxilasa), FAS (sintasa de ácidos grasos), SCD (estearoil-CoA desaturasa), LCE (elongasa de ácidos grasos de cadena larga), entre otros. Además, el exceso en la lipogénesis *de novo* incrementa la exportación de lípidos hacia los tejidos en forma de VLDL (Miquilena Colina & García Monzón, 2011) (Figura 6), lo cual tiene estrecha relación con la DLP. Además, el exceso de insulina inhibe la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de ácidos grasos debido a que la insulina activa la producción de malonil-CoA por la ACC, que a su vez es activada por SREBP-1c inducido por la insulina (Miquilena Colina & García Monzón, 2011) (Figura 6).



**Figura 7.** Segundo impacto: Patogénesis de la MASH inducida por lipotoxicidad. En la teoría del doble impacto, la lipotoxicidad secundaria a la esteatosis se considera el segundo impacto. Las flechas verdes representan las vías de eliminación de los AGNE que contribuyen a disminuir el potencial lipotóxico y las flechas naranjas indican las vías que generan lipotoxicidad. CIT P450: citocromo P450. Tomada de Miquilena Colina & García Monzón (2011).

En el segundo impacto, la lipotoxicidad promueve la transición de MASLD a MASH (Gerges et al., 2021). En el primer impacto de la teoría propuesta por Day & James (1998), el incremento en la lipólisis periférica y el exceso de carbohidratos circulantes producto de la resistencia a la insulina generan un aumento en la acumulación de gotas de grasa dentro de los hepatocitos. En el segundo impacto, conocido como “teoría lipotóxica” en algunas obras científicas, el exceso de ácidos grasos no esterificados (AGNE) puede producir 2 escenarios relacionados directamente con el daño hepático: 1) la generación de metabolitos lipotóxicos como el ácido fosfatídico, el ácido lisofosfatídico, la lisofosfatidilcolina, las ceramidas, los diacilgliceroles etc., que generan estrés al retículo endoplásmico de los hepatocitos y promueven la activación de vías inflamatorias, necróticas y apoptóticas; y 2) el exceso de AGNE incrementa las diferentes versiones de la  $\beta$ -oxidación tanto en el citocromo P450 como a nivel peroxisomal y mitocondrial, lo cual incrementa sustancialmente la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales, si no son eficientemente eliminadas por el sistema antioxidante endógeno del sujeto, activan vías inflamatorias que generan esteatohepatitis (Miquilena Colina & García Monzón, 2011) (**Figura 7**). Es pertinente mencionar que, debido a que el incremento en la producción de EROS derivadas de la  $\beta$ -oxidación la mayoría de las veces puede ser eficientemente neutralizada por los sujetos, se considera que esta no es la causa principal de la lipotoxicidad. Más bien, la generación de metabolitos lipotóxicos que activan la inflamación y la necrosis se acepta como la vía patogénica primordial que genera MASH (Miquilena Colina & García Monzón, 2011).

### **2.3.7 Diagnóstico de MASLD/MASH**

El diagnóstico de MASLD se realiza con base en datos clínicos, bioquímicos e incluso histológicos cuando la situación lo demanda. Normalmente los pacientes son diagnosticados a partir de niveles elevados de marcadores hepáticos en estudios bioquímicos. La historia clínica en conjunto con análisis de sangre y pruebas de imagen son comúnmente utilizados en el diagnóstico de MASLD o MASH (Gerges et al., 2021).

#### **2.3.7.1 Estudios de imagen**

La identificación del hígado graso y sus consecuencias sobre la arquitectura hepática no es una tarea fácil. Los cambios ocasionados por la acumulación anormal de grasa en el parénquima hepático ofrecen características radiológicas que permiten realizar el diagnóstico de la

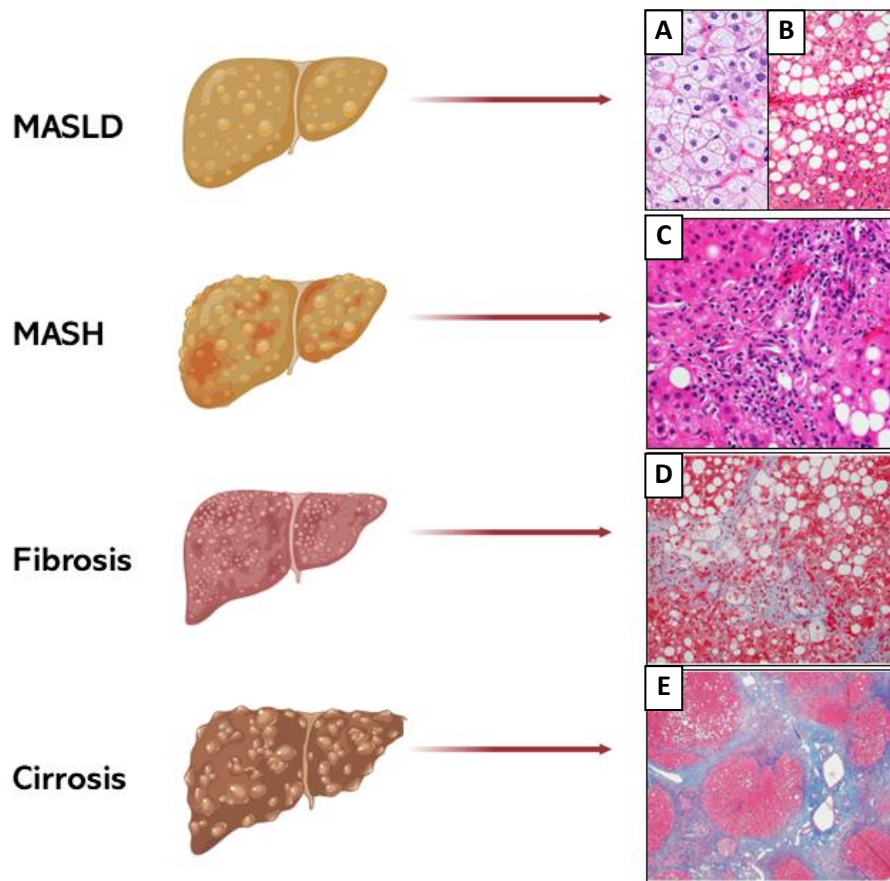
enfermedad. En este sentido, es común observar patrones difusos y acumulación de grasa homogéneamente, en puntos focales, o una mezcla de ambos. Los hallazgos más comunes de observar, y también los más fáciles de identificar, son los patrones homogéneos de distribución de grasa hepática, ya que cuando se observan patrones heterogéneos de acumulación de lípidos se podría estar frente a enfermedades hepáticas diferentes a MASLD/MASH como pueden ser enfermedades de perfusión, lesiones nodulares o crecimiento de masas anormales. Bajo este panorama, la imagenología cumple un papel fundamental no solo en el diagnóstico normal, sino también en el diagnóstico diferencial de MASLD/MASH (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015). Los estudios de imagen comúnmente utilizados para el diagnóstico de MASLD/MASH incluyen la ultrasonografía, la tomografía computarizada, la imagen y la espectroscopía por resonancia magnética. Sin embargo, una radiografía simple no tiene utilidad en el diagnóstico de estos padecimientos (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015). Entre estas pruebas la imagen por resonancia magnética es más sensible que la tomografía computarizada para la evaluación de patología hepática, sin embargo, su costo suele ser elevado; no obstante, cuando se quiere detectar fibrosis la espectroscopía por resonancia magnética es la opción definitiva. Por otro lado, debido a que la TC utiliza radiación ionizante, su uso en niños no está recomendado, mucho menos para propósitos de investigación. En su lugar se recomienda la implementación de otros métodos (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015).

#### *2.3.7.2 Biopsia hepática*

La biopsia hepática se considera el estándar de oro para el diagnóstico de MASLD/MASH, ya que permite cuantificar el daño hepático, confirmar o descartar la presencia de MASLD/ MASH con una alta precisión. Para realizar el diagnóstico de MASLD por este método se debe confirmar la presencia de esteatosis macrovesicular (**Figura 8B**), ya que en la esteatosis microvesicular (**Figura 8A**) solo se observa una o unas pocas gotas de grasa dentro de los hepatocitos afectados. Por otro lado, para el diagnóstico de MASH mediante biopsia se necesitan encontrar una serie de hallazgos histológicos que en conjunto confirman la enfermedad. Entre ellos se encuentran la esteatosis, la inflamación tanto lobulillar como portal, y la lesión hepática por balonización (**Figura 8C**). Ahora bien, si durante la biopsia se observan alteraciones importantes en la arquitectura hepática, así como un exceso de matriz extracelular, se confirma el diagnóstico de fibrosis (**Figura**

**8D).** Aunque es común encontrar eosinófilos y cuerpos de Mallory en los pacientes con MASH, la presencia de estos dos hallazgos no se considera indispensable para realizar el diagnóstico (Gerges et al., 2021).

A pesar de su alto poder diagnóstico, la biopsia hepática no está indicada para todos los pacientes, y, de hecho, la gran mayoría de los casos no se diagnostican mediante biopsia por tratarse de un método invasivo, el cual se relaciona con complicaciones serias a la salud. Únicamente se recurre a este método cuando los otros métodos no invasivos no permiten hacer un diagnóstico diferencial de la enfermedad, o en etapas avanzadas del daño hepático para cuantificar el daño (Gerges et al., 2021). Sin embargo, a nivel experimental, los modelos animales permiten obtener fácilmente muestras histológicas para determinar el grado de daño o la respuesta a un tratamiento.



**Figura 8.** Principales características histológicas de la MASLD. Figura (A) esteatosis microvesicular; Figura (B) esteatosis macrovesicular; Figura (C) un caso de MASH con inflamación portal leve afectando focalmente la placa limitante. (400×); Figura (D) Fibrosis perisinusoidal avanzada (200×); Figura (E) Cirrosis establecida (40x). Figuras 7A, 7B obtenidas y modificadas de Yeh & Brunt (2008). Figuras 7C, 7D, y 7E obtenidas y modificadas de Kleiner & Makhlouf (2016). Creado en <https://BioRender.com>.

### 2.3.7.3 Scores

El diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la MASH dependen de la clasificación o estratificación de la enfermedad. Por ello, en 1999, Brunt et al. describieron el primer sistema estandarizado de estadificación y clasificación histopatológica de la MASLD. Este esquema, con base en el nivel de esteatosis hepática, el grado de degeneración balonzante de los hepatocitos, y la intensidad de la inflamación lobulillar y portal, propone una graduación de la severidad de la enfermedad de tres niveles: leve (grado 1), moderada (grado 2), y severa (grado 3) (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015) (Tabla 7).

**Tabla 7**

Esquema de clasificación de MASH de Brunt.

Severa	Moderada	Leve	
Típicamente > 66% (panacinar); comúnmente esteatosis mixta	Cualquier grado y generalmente mixto macrovesicular y microvesicular	Predominantemente macrovesicular; afecta <33%-66% de los lobulillos	Esteatosis
Predominantemente zona 3; marcada	Obvia y presente en la zona 3	Ocasionalmente se observa en hepatocitos de la zona 3	Balonización
Inflamación aguda y crónica dispersa; los polimorfos pueden aparecer concentrados en áreas de la zona 3 con abombamiento y fibrosis perisinusoidal.	Se pueden observar polimorfos asociados con hepatocitos abultados, fibrosis pericelular; puede observarse inflamación crónica leve.	Inflamación aguda leve y dispersa (polimorfos) e inflamación crónica ocasional (células mononucleares)	Inflamación lobulillar
Leve o moderada	Leve o moderada	Ninguna o leve	Inflamación portal

(Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015)

Posteriormente, la Red de Investigación Clínica de la NASH (NASH Clinical Research Network), bajo el auspicio del Comité de Patología del Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades

Digestivas y Renales, preservó los elementos estructurales y criterios diagnósticos fundamentales del sistema de Brunt para realizar la clasificación de la MASLD desde la perspectiva histológica (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015). Dicha clasificación se encuentra en la **Tabla 8**.

Existen otros métodos que mediante “scores” o puntajes basados en diferentes biomarcadores y pruebas comunes permiten establecer el grado de la enfermedad hepática. Por ejemplo, el índice de hígado graso se vale de los niveles séricos de TGs, la circunferencia de cintura y el IMC para obtener un puntaje que permite diagnosticar la MASLD. También es posible cuantizar el riesgo de MASH y la progresión a fibrosis en pacientes diabéticos mediante un método validado que integra el valor de IMC, la circunferencia de cintura, y los niveles sanguíneos de albumina, aminotransferasas y hemoglobina glicosilada. Por último, la proporción AST/ALT y una prueba llamada puntaje de fibrosis-4 en combinación con los niveles de transaminasas y la edad, permiten predecir el nivel de fibrosis hepática (Gerges et al., 2021).

**Tabla 8**

Puntuación de actividad de la MASLD.

Puntaje	Esteatosis
0	< 5%
1	5%-33%
2	> 33%-66%
3	> 66%
Inflamación lobulillar (contado en campos 20 ×)	
1	< 2 focos
2	2-4 focos
3	> 4 focos
Balonización	
1	Poca
2	Mucha

(Abd El-Kader &amp; El-Den Ashmawy, 2015)

#### **2.3.7.4 Biomarcadores de funcionalidad hepática**

Por otro lado, el diagnóstico bioquímico del daño hepático suele realizarse a nivel clínico mediante un hepatograma, el cual consiste en la determinación de diversos marcadores en sangre relacionados con distintos aspectos del funcionamiento hepático. A continuación, se describen brevemente los componentes principales de un hepatograma habitual y su significancia clínica.

## Bilirrubina

La bilirrubina es un producto final del catabolismo del grupo hemo de las hemoproteínas, principalmente hemoglobina, la cual se produce en el sistema reticuloendotelial. Esta bilirrubina se conoce como bilirrubina no conjugada (BNC) o indirecta, y es poco soluble en agua, por lo que debe unirse a la albumina para ser transportada al hígado. Una vez en los hepatocitos, la bilirrubina es acarreada al retículo endoplásmico, donde es conjugado con ácido glucurónico por la enzima glucuronosil transferasa difosfato 1A1 (UGT1A1). Esta conjugación vuelve más polar y por tanto más soluble a la hemoglobina en el plasma sanguíneo, facilitando también su excreción en la bilis. Esta bilirrubina, conocida como bilirrubina conjugada (BC) o directa (BD), es secretada en forma de diglucurónido de bilirrubina hacia los canalículos biliares a través de transportadores membranales de la familia ABC (ABCC2). Después, la bilis es excretada desde la vesícula biliar hacia el intestino durante la digestión de las grasas. Una vez en el intestino, la BC es transformada en urobilinógenos, los cuales se oxidan casi por completo en urobilinas en el colon y se excretan en las heces, a las cuales le confieren su color (Carvajal, 2019). A nivel laboratorio, la determinación de BC y bilirrubina total (BT), la cual es la suma de BC/BD + BNC, forma parte de un panel básico para la determinación de la funcionalidad hepática. Específicamente, un incremento marcado de BNC sugiere hemólisis, un aumento de circulación enterohepática de BNC, o un defecto de conjugación. Por el contrario, un aumento de BC sugiere colestasis por causas hepáticas como alteraciones en el flujo biliar intrahepático o daño estructural de los canalículos biliares etc.; o extrahepáticas, como tumores, cálculos biliares o alteraciones estructurales de la vía biliar (Carvajal, 2019).

## Transaminasas

Las transaminasas, también conocidas como aminotransferasas, son enzimas que catalizan reacciones de transaminación, un proceso clave del metabolismo de los aminoácidos mediante el cual se transfiere un grupo amino desde un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoácido, permitiendo la interconversión de aminoácidos y la integración de su metabolismo con rutas energéticas. Las dos principales de interés clínico son la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST). La AST es una enzima presente tanto en el citosol como en la mitocondria y se distribuye en tejidos como el hígado, el corazón, el músculo y el riñón. En

contraste, la ALT, también llamada transaminasa glutámico-pirúvica, se localiza únicamente en el citoplasma y se encuentra predominantemente en el hígado y el riñón, con concentraciones menores en músculo y tejido cardíaco, lo que le confiere mayor especificidad hepática. Sin embargo, ninguna de las dos es exclusiva del hígado. Los rangos considerados normales de estas aminotransferasas están influenciados por factores como la edad, el sexo, el origen étnico y el índice de masa corporal (Fernández, 2012).

Tanto la ALT como la AST participan en reacciones de transaminación al transferir grupos  $\alpha$ -amino desde la alanina y el aspartato hacia el grupo  $\alpha$ -ceto del  $\alpha$ -cetoglutarato, generando piruvato y oxalacetato, respectivamente (Kew, 2000; Senior, 2012). Cuando ocurre lesión celular hepática o alteración de la integridad de la membrana de los hepatocitos, estas enzimas se liberan al torrente sanguíneo, lo que permite su detección en suero (Kew, 2000).

Debido a su alta concentración intracelular, especialmente en hepatocitos, su elevación en suero se utiliza ampliamente como marcador bioquímico de daño hepatocelular (Kew, 2000). Por otro lado, a pesar de su baja sensibilidad, las transaminasas suelen ser biomarcadores clásicos de enfermedad hepática, ya que hasta el 80% de personas diagnosticadas con MASH presentan niveles elevados de estas enzimas hepáticas (Gerges et al., 2021). Las aminotransferasas séricas se incrementan en la mayoría de las patologías hepáticas, aunque la magnitud de este aumento varía según la etiología. Elevaciones marcadamente altas, que pueden oscilar entre 500 y 20 000 U/L, son características de cuadros como la hepatitis aguda de origen viral, tóxico o farmacológico, así como del daño hepático isquémico asociado a estados de choque o falla circulatoria y a situaciones de hipertermia severa, como el golpe de calor (Kew, 2000). Además, la elevación de ALT se observa en enfermedad de Wilson, en esteatosis hepática y esteatohepatitis (Kasarala & Tillmann, 2016; U. Sharma et al., 2014). La magnitud de su elevación sérica no siempre refleja la gravedad del daño hepático, ya que los incrementos más marcados suelen observarse en contextos como hepatitis viral, isquemia hepática y toxicidad medicamentosa o química (Fernández, 2012).

### **Gama-glutamil transferasa**

La gamma-glutamil transpeptidasa o gamma-glutamil transferasa (GGTP) es una enzima membranal presente en muchos tejidos, particularmente el hígado, los conductos biliares y los

riñones (Kasarala & Tillmann, 2016), de ahí que sea considerado como un marcador estándar de procesos colestáticos. Cataliza la transferencia de un residuo de glutamilo, unido a través del ácido gamma carboxílico del glutamato a una amina o a otro aminoácido, a un aceptor que puede ser un aminoácido, un péptido o una molécula de agua. El sustrato más abundante para GGTP es el glutati6n, un potente antioxidante end6geno (Mistry & Stockley, 2010). De este modo, la GGTP, mediante su intervenci6n en el metabolismo del glutati6n, protege a las c6lulas contra el daño por radicales libres, particularmente en regiones de inflamaci6n; y participa en eventos que modifican las interacciones receptor-ligando en la membrana celular (Whitfield, 2001). GGTP es un marcador sensible pero poco especifiko para el diagn6stico de enfermedades hepáticas. Aun as6, se han observado elevaciones en casi todos los pacientes con esteatohepatitis no alcoh6lica (Whitfield, 2001).

### Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina (FA) integra una familia de enzimas dim6ricas ancladas a las membranas celulares del h6gado y el hueso principalmente. Su funci6n principal es catalizar la hidrolisis de 6steres de monofosfato en condiciones alcalinas, liberando fosfato inorgánico como producto de reacci6n (U. Sharma et al., 2014). La FA es un biomarcador s6rico de gran relevancia, puesto que su elevaci6n se ha relacionado con la presencia de enfermedades 6seas o hepáticas principalmente. Con respecto a padecimientos hepáticos, elevaciones s6ricas de FA sugieren obstrucci6n de los conductos biliares (colestasis) (Kasarala & Tillmann, 2016; U. Sharma et al., 2014). En este caso, el incremento s6rico de FA se debe a la s6ntesis de *novo* y al desprendimiento de FA de las membranas epiteliales de los hepatocitos y las v6as biliares (Fernandez & Kidney, 2007). Adem6s de la obstrucci6n hepatobiliar, se han reportado aumentos de FA en hepatitis cr6nica, necrosis hepática, neoplasia, hipoxia y lipidosis hepáticas; e incluso padecimientos pancreáticos (Fernandez & Kidney, 2007).

### 2.3.8 Tratamiento de la MASLD/MASH

Dependiendo del grado de la enfermedad hepática metab6lica, el tratamiento convencional actual incluye cambios en el estilo de vida y la administraci6n de f6rmacos terapéuticos (Chalasani et al., 2017; Ferenci et al., 2014). Sin embargo, aunque la ciencia m6dica actual ha avanzado enormemente en el 6ltimo siglo, aun en 2025 no existe un tratamiento farmacol6gico

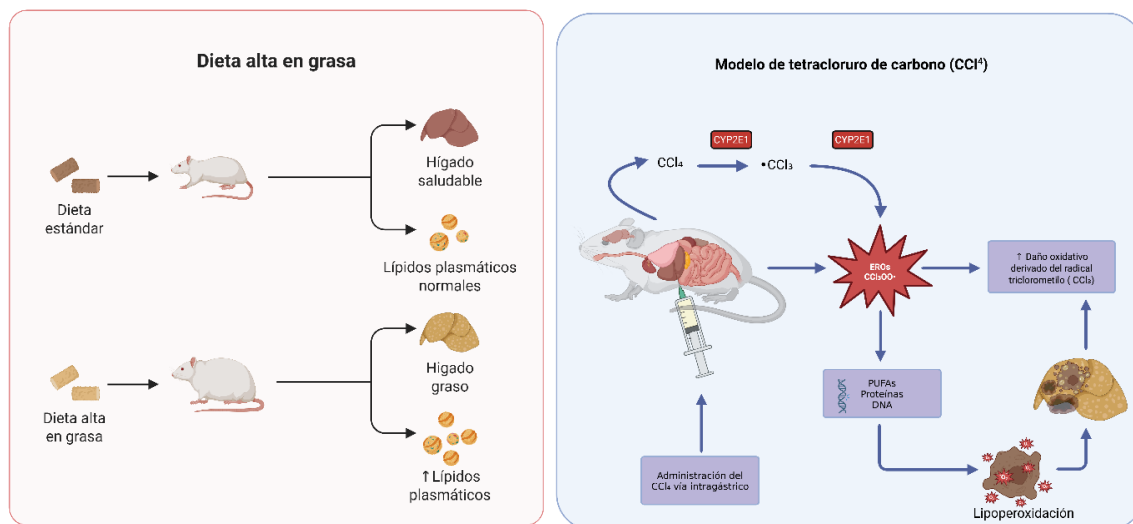
estandarizado para tratar la MASLD. El abordaje clínico suele ser sumamente heterogéneo entre profesionales sanitarios y se basa casi por completo en la experiencia y criterio del profesional que atiende la enfermedad y en los hallazgos clínicos. En este sentido, los tres ejes terapéuticos encaminados a la prevención secundaria y terciaria tanto de la MASLD como de la MASH son: 1) el tratamiento de comorbilidades metabólicas como la obesidad o la DMT2; 2) la mejora de la sensibilidad a la insulina; y 3) la protección contra la lipotoxicidad y la fibrosis (Ferenci et al., 2014). Asimismo, la dieta y el ejercicio son pilares fundamentales en la terapia conservadora de la enfermedad hepática metabólica. La pérdida de 5-10% del peso con dieta saludable basada en una restricción calórica moderada del 25% de las calorías totales, una reducción del consumo de grasas trans y fructosa, y un incremento en el consumo de omega-3 y 6, son recomendaciones efectivas para mejorar la MASLD. Sin embargo, cuando los pacientes tienen obesidad mórbida, la cirugía bariátrica puede ser una buena opción, aunque en etapas avanzadas de enfermedad hepática como la cirrosis, ni esta ni alguna otra cirugía son viables. En cuanto al ejercicio, se recomienda un programa de ejercicio moderado de 3-4 días por semana que permita a la persona elevar su ritmo cardíaco un 65-75% de su frecuencia cardíaca máxima de una manera segura para su edad y condiciones particulares (Ferenci et al., 2014).

Con respecto al tratamiento farmacológico, algunos de los principales fármacos que se prescriben diariamente para tratar la MASLD en sus diferentes etapas son los sensibilizadores de insulina como la metformina, tiazolidinedionas, análogos de GLP-1, vitamina E, ácido ursodesoxicólico, ácidos grasos esenciales omega-3, etc. (Chalasanani et al., 2017). Otros compuestos como la taurina por sus posibles efectos lipotrópicos, la betaina como un factor hepatoprotector, y el losartán por su capacidad de bloquear los receptores de angiotensina implicados en la generación de fibrosis, también son comunes en el tratamiento actual de la MASDL/MASH. Es destacable el hecho de que ninguno de estos fármacos está encaminado en reducir directamente la grasa o la inflamación en el hígado, sino más bien en reducir los factores desencadenantes como la resistencia a la insulina, la DMT2, o la obesidad. Y aunque el uso de vitamina E (como un antioxidante que protege contra la lipotoxicidad hepática) y pentoxifilina (en etapas avanzadas de la MASH) son prácticas médicas comunes (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015), su uso en algunos países no está autorizado ni su efectividad validada (Ferenci et al., 2014). La falta de fármacos aprobados

universalmente para el tratamiento de MASLD/MASH se debe en parte a la dificultad de replicación de estas patologías a nivel experimental.

### 2.3.9 Modelos experimentales de daño hepático en roedores

Existen modelos que simulan de forma eficaz la patogénesis de enfermedades metabólicas. Entre ellos se encuentran modelos que implementan dietas que imitan un consumo excesivo de calorías, dietas ricas en grasa, como la dieta conocida en las ciencias biomédicas como dieta HFD (High-fat diet), o dietas conocidas como dietas occidentales, que se caracterizan por un aporte excesivo de azúcares y grasas (Kottaisamy et al., 2021). El principal inconveniente de este tipo de modelos que inducen daño hepático por dieta es el tiempo que tarda en desarrollarse la enfermedad en los roedores, pudiendo ser de varios meses de duración en algunos casos. Asimismo, el alto grado de fracaso en la instauración de las enfermedades hepáticas así como la heterogeneidad de los patrones patológicos observados entre individuos dificulta el análisis e interpretación de los resultados observados. Además, las dietas con calorías excesivas a partir de grasas o fructosa ocasionan daños en múltiples órganos, no solo en el hígado, lo cual resulta poco útil en estudios mecanísticos que pretenden estudiar vías patogénicas o terapéuticas exclusivamente hepáticas, ya que este tipo de modelos resulta difícil discernir cuales de los efectos observados son esencialmente hepáticos y cuales son secundarios a desbalances en otros órganos y tejidos. Algunos otros modelos utilizan tratamientos químicos para inducir esteatohepatitis o fibrosis de manera acelerada. Este tipo de tratamientos químicos pueden realizarse de manera aislada o en combinación con dietas desbalanceadas. El modelo de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) consiste en la administración de un agente químico hepatotóxico, que, administrado crónicamente, provoca un daño directo en el hígado, simulando la MASH. En este modelo, el daño hepático se genera cuando el  $\text{CCl}_4$  es metabolizado por las enzimas hepáticas, generando radicales libres, principalmente triclorometilo ( $\cdot\text{CCl}_3$ ), el cual es altamente reactivo ya que, al perder un átomo de cloro durante el procesamiento hepático, el carbono que une a los 3 átomos de cloro exhibe un electrón desapareado que induce peroxidación lipídica y necrosis de los hepatocitos (Kottaisamy et al., 2021). La **Figura 9** esquematiza los principales modelos animales empleados en la replicación del daño hepático así como algunas de sus especificaciones experimentales.



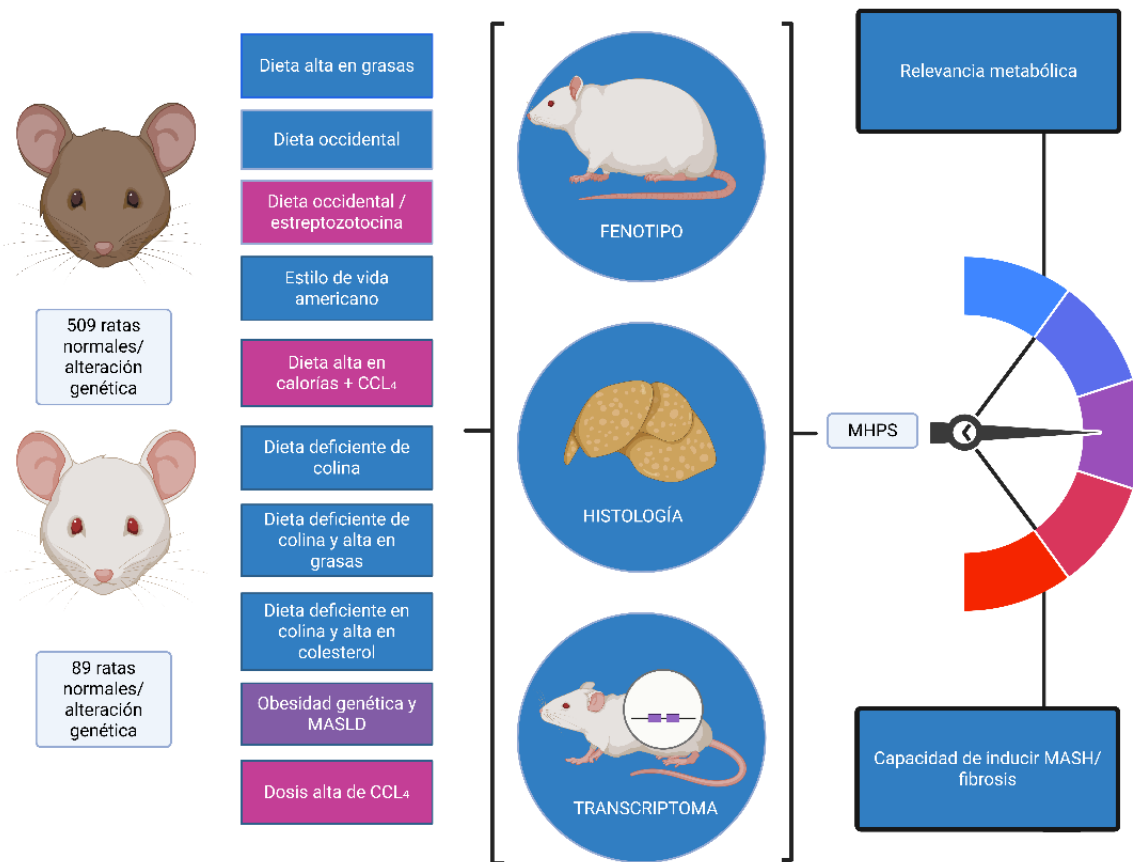
**Figura 9.** Modelo experimental de inducción de MASLD mediante dieta alta en grasa y modelo de MASH/fibrosis de  $\text{CCl}_4$ . Creado en <https://BioRender.com>.

Ahora bien, aunque actualmente existen algunos modelos experimentales bien establecidos de MASLD/MASH, los cuales son bastante aceptados y utilizados a nivel científico, la fisiopatología de la esteatohepatitis en seres humanos aún es de una comprensión limitada debido a la falta de modelos que repliquen con exactitud los aspectos fisiopatológicos naturales que ocurren en humanos. En este sentido, en 2024, un grupo de científicos del grupo de histopatología LITMUS ('Liver Investigation: Testing Marker Utility in Steatohepatitis' Consortium) publicaron en la revista "Nature Metabolism" un ranking de los mejores modelos de roedores para simular MASLD/MASH/fibrosis, según su capacidad de replicar la enfermedad hepática humana (Vacca et al., 2024). El diseño de este interesante estudio se observa en la **Figura 10**. En este estudio retrospectivo con enfoque bioinformático, se analizaron datos retrospectivos de 598 roedores, de los cuales 509 fueron ratones normales (wildtype [WT]) o con alteraciones genéticas (GA), y 89 fueron ratas WT o GA también. De los 598 animales, 336 fueron sometidos a tratamiento (315 sometidos a condiciones para inducir MASLD y 21 animales fueron tratados con  $\text{CCl}_4$ ) y 262 fungieron como controles (247 sometidos a condiciones para inducir MASLD y 15 animales fueron tratados con  $\text{CCl}_4$ ). De ellos se obtuvieron 39 modelos destinados a modelar y reproducir MASLD, MASH o fibrosis independiente de MASH, y de todos los estudios se dispuso de información fenotípica, información histopatológica y datos transcriptómicos hepáticos. Según su relevancia metabólica o su capacidad para inducir MASH/fibrosis, se les asignó una puntuación

binaria imparcial denominada “Puntuación de proximidad humana de MASLD” MHPS (MASLD ‘Human Proximity Score’) (**Figura 10**).

Dentro de las conclusiones de estos autores, en primer lugar, se describe que el uso de ratas como modelos animales experimentales de enfermedad hepática brinda mejores circunstancias experimentales y ventajas sobre el uso de ratones (Vacca et al., 2024). Asimismo, los autores observaron que aquellos modelos basados en dietas que contenían alto contenido en grasas y carbohidratos, específicamente 2% de colesterol y glucosa y fructosa combinadas, replicaban eficazmente los diferentes estadios de la MASLD, incluso la fibrosis, siempre y cuando la duración de la inducción de la enfermedad se prolongara durante 40 semanas o más. El modelo mejor puntuado fue el GAN-C2 administrado a ratones C57BL6/NTac u ob/ob. El modelo GAN-C2 consiste en la administración crónica de una dieta GAN (Gubra Amylin NASH) hipercalórica, rica en grasas, colesterol y fructosa, combinada con agua adicionada con fructosa/glucosa, lo que induce obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia y un entorno inflamatorio sistémico. Este modelo permite llevar la enfermedad hepática hasta lesiones preneoplásicas sin la necesidad de utilizar agentes químicos carcinogénicos; sin embargo, es de una duración muy prolongada.

Por otro lado, este estudio también encontró que las dietas occidentales, los patrones de estilo de vida Americanos, y los modelos que incluían altas dosis de azúcares en la bebida de los roedores + dosis bajas de CCl<sub>4</sub> fueron los modelos más completos a la hora de mimetizar MASLD/MASH, incluso en periodos cortos de 8 semanas, destacando la eficacia del CCl<sub>4</sub> como inductor experimental de la enfermedad hepática acelerada, lo cual resulta particularmente útil cuando se desea estudiar un gran número de grupos experimentales, ya que acorta significativamente la duración del estudio.



**Figura 10.** Clasificación de los mejores modelos de roedores para simular MASLD y MASH, según Vacca et al. (2024). MHPS: Puntuación binaria imparcial que clasifica los modelos en términos de su relevancia metabólica y capacidad para inducir fibrosis/MASH (MASLD 'human proximity score'). Tomado y adaptado de Vacca et al. (2024). Creado en <https://BioRender.com>.

## 2.4 Medicina tradicional contra enfermedades metabólicas

La medicina tradicional ha mostrado un repunte en las últimas décadas probablemente debido al incremento acelerado de enfermedades principalmente metabólicas, el cual se visualiza imposible de mitigar únicamente con terapias farmacológicas convencionales por varias razones (Nyakudya et al., 2020). Y es que el uso de la farmacoterapia como única estrategia terapéutica o profiláctica presenta ciertas desventajas. Por ejemplo, los fármacos a menudo son costosos en la mayoría de los países, y los pacientes frecuentemente muestran poca adherencia a sus tratamientos, lo cual dificulta el manejo de las enfermedades. Además, muchos fármacos requieren ser utilizados perpetuamente o por tiempo prolongado, lo cual incrementa el desarrollo de efectos secundarios extensos y diversos para cada grupo de fármacos. Otro inconveniente resulta del hecho que la gran mayoría de ellos son monoterapéuticos, por lo que las personas que cursan con diversos

padecimientos, como aquellos que padecen el síndrome metabólico, requieren de la coadministración de múltiples fármacos, lo cual está lejos de ser una práctica saludable (Nyakudya et al., 2020). En este mismo contexto, la gran mayoría de fármacos son procesados y biotransformados en el hígado, lo cual también resulta inconveniente para personas con enfermedades hepáticas o metabólicas crónicas como la esteatohepatitis.

Sin embargo, aunque la farmacoterapia se ha convertido en la principal práctica médica en la actualidad, aún existe una gran cantidad de practicantes fehacientes de la medicina tradicional que apoyan y promueven su uso, principalmente en países en desarrollo como aquellos pertenecientes al continente africano (Nyakudya et al., 2020). Países orientales como China y Japón, aunque no son países en vías de desarrollo, son de los principales practicantes de la medicina tradicional a nivel mundial. El uso de plantas medicinales es una tradición arraigada y ejercida desde hace muchos siglos en prácticamente todos los países del mundo. Por ejemplo, la medicina tradicional China es un excelente ejemplo de medicina tradicional complementaria con una larga historia que se remonta hace más de dos milenios, y que contiene una gran variedad de remedios herbales basados en una única teoría regente (Yin et al., 2008). Por ello, la medicina tradicional ha recibido reconocimiento mundial.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó oficialmente la Biblioteca Global de Medicina Tradicional de la OMS (The WHO Traditional Medicine Global Library), durante la 2° Cumbre Global de Medicina Tradicional de la OMS, celebrada en diciembre de 2025 en Nueva Delhi, India. Esta biblioteca fue desarrollada por el Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud (BIREME), perteneciente a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en coordinación con el Centro Mundial de Medicina Tradicional de la OMS. Es un recurso mundial que busca reconocer y fortalecer los conocimientos y la práctica de la medicina tradicional, integrando los conocimientos tradicionales, la evidencia científica, y la transformación digital para respaldar políticas públicas que permitan fortalecer los sistemas de salud (PAHO, 2025). En esta y otras bases de datos científicas es posible encontrar evidencia científica actual que respalda el uso de plantas medicinales y remedios naturales como tratamiento complementario en el combate de todo tipo de enfermedades, desde infecciosas, hasta enfermedades crónicas no transmisibles, incluyendo los padecimientos metabólicos como

DLPs y MASLD/MASH. En línea con esto, la **Tabla 9** recopila una serie de estudios científicos recientes que prueban la efectividad de la medicina tradicional en contextos de enfermedades metabólicas estrechamente relacionadas con las DLPs y la MASLD/MASH, como la DMT2 y el síndrome metabólico. Algunos de estos recursos fueron obtenidos a través de “The WHO Traditional Medicine Global Library” ([www.tmgf.org](http://www.tmgf.org)). Al observar la **Tabla 9** es posible notar que los extractos ricos en fitoquímicos y los aceites vegetales de diferentes fuentes son de los principales compuestos bioactivos que se han estudiado en torno a sus efectos sobre la salud metabólica.

En este sentido, entre los enfoques dietéticos dirigidos a mejorar los perfiles lipídicos y la salud hepática, la selección de grasas alimentarias saludables ha cobrado importancia tanto en la nutrición clínica moderna como en prácticas tradicionales de medicina complementaria. Diversos aceites vegetales y semillas oleosas, ricos en ácidos grasos insaturados como los omega-3 y compuestos bioactivos, han mostrado efectos beneficiosos sobre las DLPs y la progresión de la MASLD. Estudios experimentales y algunos ensayos clínicos han señalado que sustituir grasas saturadas por fuentes de grasas poliinsaturadas de origen vegetal puede atenuar la esteatosis y los perfiles lipídicos alterados característicos de estas enfermedades, probablemente debido a la modulación de lípidos sanguíneos y procesos inflamatorios subyacentes a nivel celular y molecular. Dentro de este marco, tanto las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) como su aceite han sido utilizadas tradicionalmente en diversas culturas como alimento funcional. El interés científico que inspiró el desarrollo de este trabajo de investigación deriva del hecho que las semillas de chía son una fuente especialmente rica en ácido  $\alpha$ -linolénico (un ácido graso omega-3 esencial) y fitoquímicos con potencial terapéutico cardiometabólico. Diferentes intervenciones con chía han demostrado mejoras en marcadores de DLP y reversión de la MASLD en sujetos humanos, además de evidenciar efectos hipolipemiantes y hepatoprotectores en modelos animales, sugiriendo un valor tanto nutricional como terapéutico en el manejo de estas alteraciones metabólicas desde el enfoque de la medicina tradicional o complementaria.

**Tabla 9**

Estudios relevantes que sustentan la efectividad de la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades metabólicas.

Compuestos	Individuos	Patología	Resultados Principales	Referencias
Extracto acuoso de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	Ratas Wistar macho con daño hepático inducido químicamente	Cáncer hepático inducido por DEN y 2-AAF	↓ Desarrollo de tumores hepáticos ↓ Mortalidad inducida por daño químico Sin cambios en marcadores de función hepática ↓ Expresión de TGFB1, CAT y SOD	(Sánchez Orozco et al., 2025)
Aceite esencial de jengibre	Modelo murino con MASH inducida por HFD	MASH	↓ ALT plasmática ↓ Citocinas proinflamatorias hepáticas ↑ Catalasa, glutatión reductasa y glutatión ↓ Inflamación hepática vía inhibición de NLRP3 y TLR4 ↓ Activación de la vía LPS/TLR4/NF-κB	(Panyod et al., 2024)
Extracto hidroalcohólico de lavanda	Ratas Wistar macho con HFD	Dislipidemia y MASH	↓ Triglicéridos (TGs) y colesterol total (TC) ↓ Relación LDL/HDL ↓ ALP, ALT y AST ↓ Aumento de peso inducido por HFD Efecto dosis-dependiente asociado a la capacidad antioxidante	(Davari_Sani et al., 2024)
Aceite de aguacate	Ratas Wistar macho	Dislipidemia inducida genéticamente	↓ VLDL ↓ Triglicéridos ↑ HDL	(Domínguez-Avila et al., 2024)

Aceite de linaza	Pacientes clínicos con MASLD (grado 1, 2 y 3)	MASLD	<p>↓ AST, ↓ ALT, ↓ ALP</p> <p>↓ Glucosa en ayuno</p> <p>↓ Bilirrubina total</p> <p>Mejora de parámetros hepáticos</p>	(Namdar et al., 2024)
Fórmula enteral modificada (harina de tempeh, ñame, semilla de girasol)	Ratas Wistar con hiperglucemia inducida por STZ	Daño pancreático inducido por hiperglucemia	<p>↓ Daño histopatológico de células pancreáticas</p> <p>Reparación significativa de células de los islotes de Langerhans sin cambios en el número ni diámetro de los islotes de Langerhans</p>	(Wijayanti et al., 2023)
Extracto de canela	Ratas diabéticas inducidas dietéticamente	Cardiomiopatía diabética	<p>↓ Glucosa en ayuno</p> <p>↓ CK-MB, ↓ AST, ↓ LDH, ↓ MDA, ↑ SOD, ↑ CAT</p> <p>↓ Inflamación cardíaca</p> <p>↓ Fibrosis miocárdica</p> <p>↓ Expresión génica de AT1, ANP, <math>\beta</math>-MHC y BNP.</p>	(Farazandeh et al., 2022)
Curcumina	Ratas Wistar alimentadas con dieta occidental, HFD, sacarosa, fructosa + CCl <sub>4</sub>	MASH/fibrosis	<p>↓ Inflamación hepática</p> <p>↓ AST sérica</p> <p>↓ Col1a1 (fibrosis)</p> <p>↓ TNF-<math>\alpha</math>, SPP1</p> <p>↑ Glutación hepático.</p>	(Cunningham et al., 2018)
Extracto acuoso de nopal	Ratas con DMT2 inducida por HFD + STZ	DMT2	<p>↓ AST</p> <p>↓ ALT</p> <p>↓ Colesterol total</p> <p>↓ LDL</p>	(Hwang et al., 2017)

Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Estudios in vitro	Síndrome metabólico	<p>↓ Glucemia y ↑ sensibilidad a la insulina</p> <p>↓ Dislipidemia (↓ CT, TGs, LDL-C; ↑ HDL-C)</p> <p>↓ Inflamación sistémica</p> <p>↓ Estrés oxidativo (↑ Capacidad antioxidante)</p> <p>↓ Presión arterial</p> <p>↓ Riesgo aterosclerótico y trombótico</p> <p>Efectos hepatoprotectores</p> <p>Modulación de vías inflamatorias y metabólicas</p>	(Hassani et al., 2016)
Extracto de cáscara de tomate	Ratas Wistar macho con diabetes tipo 2 inducida por una dieta alta en grasa + STZ	DMT2	<p>↓ Glucosa en ayuno</p> <p>↑ Sensibilidad a la insulina</p> <p>↓ Índice HOMA-IR</p> <p>Efecto dosis dependiente del extracto.</p> <p>Mejora del control gluc(Firani &amp; Adi, 2017)puestos antioxidantes</p>	(Firani & Adi, 2017)
Extracto acuoso liofilizado de <i>Opuntia xocconostle</i>	Ratas Wistar macho sanas y diabéticas inducidas por STZ (40 mg/kg)	DMT2	<p>↓ Glucosa sanguínea en ratas sanas y diabéticas</p> <p>Mayor efecto hipoglucemiante con mesocarpio</p> <p>Colesterol total y HDL sin cambios significativos entre grupos</p> <p>↓ Triglicéridos solo en ratas sanas</p> <p>Efecto hipoglucemiante sostenido durante 12 semanas</p>	(Cassiana Paiz et al., 2010)

Efecto de la suplementación con chía sobre DLP y MASH en ratas Wistar

---

Extracto etanólico de semillas de cilantro	Ratas diabéticas inducidas con STZ	DMT2	↓ Glucosa sérica ↓ Glucosa sérica a 1.5, 3 y 5 h postratamiento ↑ Actividad secretora de insulina en células $\beta$ pancreáticas Recuperación parcial del daño funcional de células $\beta$ inducido por estreptozotocina	(Eidi et al., 2009)
Extracto etanólico de flores de <i>Hibiscus rosasinensis</i>	Ratas diabéticas inducidas por aloxano	DMT2	↓ Glucosa sérica en fase aguda (1, 3 y 5 h) ↓ Glucosa sérica en fase subaguda (1-7 días) Efecto hipoglucemiante significativo dependiente de la dosis	(Venkatesh et al., 2008)

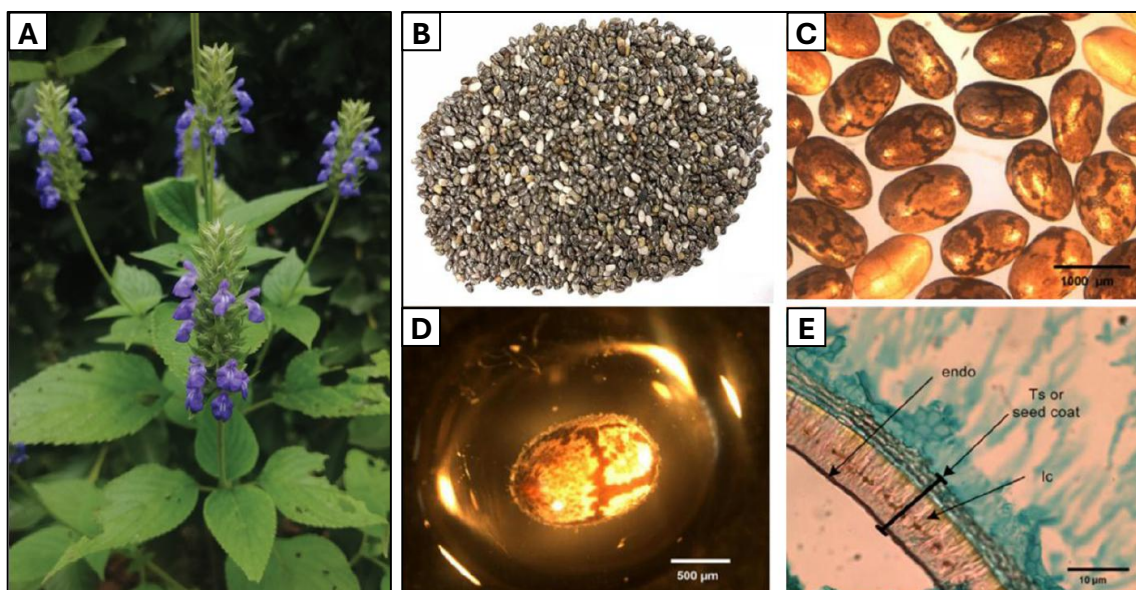
---

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2; HFD: Dieta alta en grasa (high-fat diet); STZ: estreptozotocina

## 2.5 Semilla de chía (*Salvia hispánica* L.)

### 2.5.1 Taxonomía y cultivo

*Salvia hispánica* L., denominada comúnmente como “Chía”, es una especie herbácea de la familia *Lamiaceae* originaria del norte de México y Guatemala. Taxonómicamente se ubica dentro del orden Lamiales y género *Salvia* (Hrnčič et al., 2020). La chía es una planta de floración anual y puede alcanzar hasta 1 metro de altura (**Figura 11A**). Las semillas presentan forma ovalada, con una coloración gris con manchas negras y un tamaño aproximado de 2 milímetros de largo, 1 a 1.5 milímetros de ancho y menos de un milímetro de grosor (Hrnčič et al., 2020; W. Khalid et al., 2023) (**Figura 11B-E**). Históricamente la semilla de chía fue ampliamente utilizada por las culturas mesoamericanas, especialmente aztecas y mayas, en la elaboración de alimentos y medicinas tradicionales. En la actualidad, su cultivo se ha expandido más allá de México, alcanzando diversas regiones de Europa y Norteamérica (Hrnčič et al., 2020). La semilla de chía destaca por su contenido de proteína vegetal, lípidos, carbohidratos y fibra dietética. Estudios recientes demuestran que posee propiedades beneficiosas para la salud y un perfil nutricional sobresaliente, con efectos positivos en la mejora del perfil lipídico en la sangre (W. Khalid et al., 2023).



**Figura 11.** Chía (*Salvia hispanica* L.). **(A)** Planta; **(B)** Semillas de chía; **(C)** Acercamiento de las semillas enteras y secas; **(D)** Semilla entera hidratada con cápsula mucilaginosa alrededor; **(E)** Partes morfológicas de la semilla: se observan las tres capas de células rectangulares que forman la cáscara de la semilla; endo: capa del endocarpo; lc: capa de esclereidas. Figura 9A obtenida y modificada de Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez (2025); figuras 9B-E obtenidas de (Grancieri et al., 2019).

## 2.5.2 Perfil nutricional de la semilla de chía

### 2.5.2.1 Composición química

Las semillas de chía destacan por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 (Fernandes et al., 2019). Los ácidos grasos  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-9,12,15, omega-3) y linoleico (18:2 n-9,12, omega-6) son esenciales para múltiples funciones orgánicas y han demostrado beneficios en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades metabólicas e inmunitarias. Aunque su principal fuente suelen ser los pescados grasos de agua fría, también se encuentran en ciertos aceites vegetales, siendo la semilla y el aceite de chía las fuentes botánicas con mayor contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico (omega-3) reportada hasta el momento. Marineli et al. (2014) determinaron la composición de ácidos grasos del aceite de chía mediante cromatografía de gases. Los resultados mostraron que el componente principal es el ácido  $\alpha$ -linolénico, con una proporción de 62.8%, seguido de los ácidos linoleico (omega-6), oleico (omega-9), y en menores cantidades palmítico y esteárico.

Las semillas de chía son buena fuente de fibra y proteínas. La chía presenta un contenido de fibra de aproximadamente 34-40 g por cada 100 g, de los cuales, del 85-95% corresponde a fibra insoluble y del 7-15% es fibra soluble. Dentro del contenido proteico, las semillas de chía presentan un 17% aproximadamente, siendo dicho contenido superior a cereales como el maíz, el arroz, y el trigo (Hrnčič et al., 2020). Dentro del contenido proteico se encuentran los péptidos, que son compuestos formados por cadenas de 2 a 50 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Estas moléculas de bajo peso molecular se absorben con mayor facilidad que las proteínas y participan en la regulación de diversos sistemas del organismo. La semilla de chía destaca tanto por su contenido proteico como por su perfil de aminoácidos, lo que la convierte en una buena fuente de péptidos funcionales tras su procesamiento biotecnológico. Los péptidos obtenidos de la proteína de chía han demostrado capacidad para inhibir la dipeptidil-peptidasa IV, la enzima convertidora de angiotensina, así como poseer efectos antioxidantes (W. Khalid et al., 2023).

La semilla de chía también contiene vitaminas y minerales, que son micronutrientes esenciales para el adecuado funcionamiento y mantenimiento de la salud. Dado que el cuerpo no puede sintetizar la mayoría de ellas, es necesario obtenerlos de forma exógena en la dieta. Las semillas

de chía son una buena fuente de vitaminas del complejo B, entre ellas niacina, ácido fólico, tiamina y riboflavina. Además, contienen vitamina E en forma de tocoferoles, principalmente  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. Además, su alto contenido de ácidos grasos como el omega-3 y el omega-6 favorecen la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E, K), lo que incrementa su valor nutricional (W. Khalid et al., 2023). En cuanto a los minerales, las semillas de chía destacan por su elevado contenido de magnesio, calcio, fósforo, cobre, manganeso y hierro, los cuales se requieren en cantidades pequeñas para el correcto funcionamiento del organismo, ya que participan en diversas funciones esenciales como la formación y mantenimiento de los huesos y la transmisión de impulsos nerviosos (W. Khalid et al., 2023).

#### *2.5.2.2 Principales compuestos bioactivos*

La chía también es rica en compuestos fitoquímicos, estos están presentes en alimentos de origen vegetal y se reconocen por sus efectos benéficos a la salud. Entre ellos destacan los antioxidantes y los compuestos fenólicos, los cuales actúan inhibiendo el proceso de oxidación causado por radicales libres. La semilla de chía es una fuente importante de estos fitoquímicos, destacando la presencia de ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina y kaempferol (W. Khalid et al., 2023).

La **Tabla 10** resume la composición nutricional de las semillas de chía y la comparación con algunos cereales y pseudocereales comunes como el arroz, el maíz, el trigo, la quinoa, y el amaranto.

**Tabla 10.**

Comparación de la composición nutricional de las semillas de chía y otras semillas (100 g)

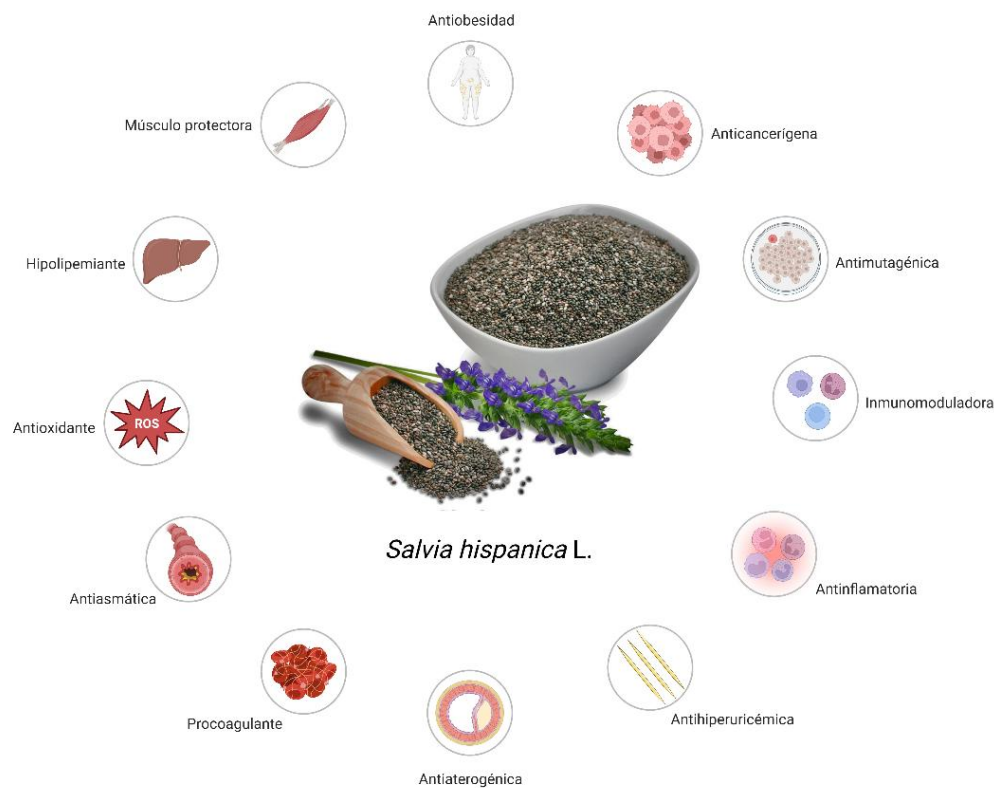
<b>Nutriente</b>	<b>Chía</b>	<b>Arroz</b>	<b>Maíz</b>	<b>Trigo</b>	<b>Quinoa</b>	<b>Amaranto</b>
Carbohidratos (g)	42	80	74	71	64.2	71
Proteína (g)	17	6.5	9.94	12.6	14.1	12.6
Grasa (g)	31	0.5	4.2	1.5	1.92	1.5
<b>Minerales (mg)</b>						
Magnesio	335	25	127	126	197	126
Fósforo	860	115	210	288	457	288
Calcio	631	28	7	29	29	29
Potasio	407	115	287	363	563	363
Sodio	16	/	/	/	/	/
<b>Vitaminas (mg)</b>						
Vitamina A	54 µg	0	214	9	0	n.d.
Vitamina E	0.5	0.11	0.49	1.01	0.63	1.19
Vitamina C	1.6	0	0	0	0	4.2
Tiamina (B1)	0.62	0.07	0.39	0.30	0.11	0.12
Riboflavina (B2)	0.17	0.05	0.20	0.12	0.11	0.2
Niacina (B3)	8.83	1.6	3.63	5.46	0.412	0.92
<b>Ácidos grasos (%)</b>						
Ácido linolénico (C18:3, ω3)	63.79	2.1	1	0.08	6.7	1.01
Ácido linoleico (C18:2, ω-6)	18.89	39.7	52	0.68	56.4	0.35
Ácido oleico (C18:1, ω-9)	7.3	35.1	31	0.24	20.4	22.69
Ácido palmítico (C16:1)	0.03	/	/	/	n.d.	0.08
Ácido eicosenoico (20:1)	n.d.	/	/	0.005	n.d.	1.49
Ácido palmítico (C16:0)	7.04	20.8	13	3.02	9.7	18.59
<b>Compuestos fenólicos (µg)</b>						
Ácido cafeico	27	n.d.	26	40	37	0.90
Quercetina	0.17	/	/	30.1	43.3	/
Kaempfenol	0.013	/	/	/	36.7	/
Daidzina	6.6	/	/	/	/	/
Glicitina	1.4	/	/	/	/	/
Genisteina	3.4	/	/	/	/	/

(Hrnčič et al., 2020). n.d. No detectado.

### 2.5.3 Efectos del consumo de chía en la salud

#### 2.5.3.1 Efectos del consumo de chía en la salud metabólica

Los beneficios de la semilla de chía se han reportado reiteradas veces en múltiples organismos vivos incluyendo los humanos (Grancieri et al., 2019). Esto se debe a que las semillas de chía se distinguen por su elevado contenido de macronutrientes, principalmente proteínas (15-25%) y lípidos (15-35%), además de aportar vitaminas, minerales, y compuestos antioxidantes (Katunzi-Kilewela et al., 2021). La riqueza de estos compuestos contribuye en su capacidad de reducir el riesgo de diferentes enfermedades crónicas (**Figura 12**) (W. Khalid et al., 2023).



**Figura 12.** Actividades biológicas asociadas al consumo de semilla de chía. Creado en <https://BioRender.com>

Por ejemplo, el consumo de chía se ha relacionado con la reducción de parámetros antropométricos como la adiposidad, el peso, la circunferencia de cintura y el consumo de alimento. En un estudio reciente Grancieri et al. (2022) evaluaron el efecto de proteínas digeridas de semilla de chía sobre la adipogénesis y la inflamación del tejido adiposo en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. La suplementación con proteínas digeridas de chía fue de 40mg/kg al día por 9 semanas. Los resultados obtenidos se asociaron con una reducción de los niveles plasmáticos del colesterol total, LDL, triglicéridos, así como una disminución del

porcentaje de grasa corporal y circunferencia de cintura. Asimismo, se observó una reducción de tamaño de los adipocitos y reducción de los niveles de ARNm de NF- $\kappa$ B, PPAR- $\gamma$ , SREBP-1 y TNF- $\alpha$ , junto con un aumento de adiponectina en el tejido adiposo. En conjunto, estos resultados demuestran que las proteínas digeridas de la chía poseen un efecto antiinflamatorio y antiadipogénico, contribuyendo a la prevención de la obesidad y de la inflamación asociada.

La riqueza en compuestos antioxidantes como los polifenoles y vitaminas le otorgan a la semilla de chía alto poder antioxidante, el cual se traduce en la inhibición de procesos inflamatorios y carcinogénicos (Grancieri et al., 2019). En un estudio en ratas con obesidad inducida por dieta rica en grasas y fructosa, Marineli et al. (2015) evaluaron los efectos del consumo de semillas y aceite de chía durante 6 a 12 semanas. Ambos tratamientos aumentaron los niveles de tiores, y la actividad plasmática de la catalasa y glutatión peroxidasa. Asimismo, redujeron los niveles plasmáticos de lipoperoxidación y  $\beta$ -isoprostano, aunque no modificaron la peroxidación lipídica hepática. En conjunto, los resultados indican que tanto la semilla como el aceite de chía lograron una reducción del estrés oxidativo.

De igual manera, la fibra y los compuestos bioactivos de la semilla de chía entera se han relacionado con importantes efectos hipoglucemiantes (Grancieri et al., 2019). En un estudio experimental en ratas Wistar, da Silva et al. (2016) evaluaron la calidad proteica de la chía y su impacto sobre la homeostasis glucídica y lipídica, así como la integridad hepática e intestinal. Los animales fueron alimentados diariamente con dietas suplementadas con semilla y harina de chía durante 14 días. Los resultados mostraron que la suplementación con chía se asoció con una disminución significativa de los niveles de glucosa plasmática, triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y colesterol LDL, junto con un aumento en los niveles de colesterol HDL. Estos resultados indican que el consumo de chía presenta una adecuada digestibilidad proteica, un efecto hipoglucemiante y contribuye a la mejora de un perfil lipídico.

La investigación en torno a la obtención de péptidos bioactivos antihipertensivos a partir de la proteína de la chía ha mostrado resultados prometedores. En un ensayo clínico aleatorizado con adultos con DMT2, los cuales fueron suplementados diariamente con 40 g/día de semilla de chía durante un periodo de 12 semanas, se observaron reducciones significativas de la presión arterial sistólica (10 mmHg), sin evidencia de resultados prometedores en algún otro parámetro evaluado.

Aunque en este estudio no se realizó una aproximación mecanística experimental, los autores sugieren que compuestos propios de la semilla de chía como la fibra y los ácidos grasos omega-3 pueden haber participado en la reducción de la presión a través de mecanismos que inhiben directa o indirectamente a la enzima convertidora de angiotensina.

### *2.5.3.2 Efectos del consumo de chía sobre dislipidemia y MASLD/MASH*

El contenido de fibra y ácidos grasos polinsaturados omega-3 le confieren a la semilla de chía propiedades hipocolesterolemiantes e hipolipidemiantes (Grancieri et al., 2019). En un estudio experimental llevado a cabo por nuestro equipo de investigación Fernández-Martínez et al. (2019) analizaron los efectos hipolipidemiantes y hepatoprotectores del consumo de semillas de chía en ratas no obesas con dislipidemia aguda inducida por tiloxapol y con esteatohepatitis aguda inducida por CCl<sub>4</sub>. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar para roedores, suplementada al 15% con harina de chía durante un periodo de 4 semanas. Los resultados mostraron que la ingesta de chía permitió prevenir de manera parcial el desarrollo de esteatohepatitis, además de disminuir los niveles de lípidos en grupos con dislipidemia. Estos efectos se atribuyeron principalmente al elevado contenido de ácido  $\alpha$ -linoleico (omega-3) presente en la chía. En otro estudio (Kothari & Jeyaraj, 2017) evaluaron el efecto de la suplementación con semillas de chía en mujeres con hipercolesterolemia. Las mujeres consumieron 12.5 g de semillas de chía 2 veces al día durante 60 días. Los resultados mostraron reducciones significativas en las medidas antropométricas y en el índice de masa corporal, así como una mejora en el perfil lipídico sérico, particularmente destacaron la disminución de las lipoproteínas de muy baja densidad y de TGs, los cuales mostraron reducciones aproximadas del 14.7% y 20.7%, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que semilla de chía puede considerarse un agente hipolipidemiante eficaz.

El estudio en torno a los efectos hepatoprotectores del consumo de semilla de chía entera o su fracción lipídica aún está en desarrollo. Sin embargo, en un reciente estudio, Arefhosseini et al. (2025) evaluaron los efectos de la suplementación de 40g de chía sobre parámetros metabólicos y la función hepática de pacientes adultos con sobrepeso y MASLD diagnosticado por ultrasonido. Los resultados mostraron que la suplementación mejoró el puntaje de fibrosis

asociado a MASLD, los niveles de las aminotransferasas ALT y AST, así como la proporción AST/ALT, lo cual sustenta los efectos hepatoprotectores de la semilla de chía sobre la MASLD.

En un estudio experimental en ratas, Sachi et al. (2024) evaluaron el efecto de un extracto de semillas de chía sobre la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub>, el perfil hematológico, y la inflamación inducida por carragenina. El extracto se administró en dosis 200 y 400 mg/kg por día con el objetivo de comparar el efecto protector. Los resultados mostraron una reducción dosis-dependiente en los niveles séricos de AST y ALT. Asimismo, el deterioro agudo de los hepatocitos y el parénquima hepático inducido por el CCl<sub>4</sub> fue significativamente atenuado tras el tratamiento del extracto de chía. De igual manera, se observó una mejora significativa en parámetros hematológicos y una reducción significativa en la infiltración de células inflamatorias. En conjunto estos resultados respaldan el potencial hematoprotector, hepatoprotector y antiinflamatorio de las semillas de chía.

La **Tabla 11** resume otros estudios relevantes recientes en torno a los efectos del consumo de chía y sus fracciones sobre la DLP, la MASLD/MASH, y enfermedades relacionadas.

**Tabla 11.**

Antecedentes relevantes en torno al estudio del efecto de la chía sobre el espectro del síndrome metabólico.

Compuestos	Individuos	Patología	Resultados principales		Referencia
Semilla y aceite de chía	Ratas Wistar con obesidad inducida por dieta	Fibrosis hepática Síndrome metabólico	↓ Dislipidemia ↓ Adiposidad ↓ RI	↓ Hidroxiprolina ↓ MASLD ↑ PPAR $\alpha$	(Oliva et al., 2021)
Semilla de chía	Ratones macho alimentados con dieta alta en grasa	Hepatocarcinoma	↓ Mortalidad ↓ Peso ↓ Carga tumoral	↓ Mieloperoxidasa ↓ MASH → fibrosis	(Llopis et al., 2020)
Semilla y aceite de chía	Ratas Wistar con obesidad inducida por dieta	Diabetes RI	↓ Adiposidad ↑ AMPK ↑ ARNm INSR	↑ FOXO1 ↑ Enzimas glucolíticas	(Enes et al., 2020)
Compuestos bioactivos de harina de chía	Ratones hiperglicémicos con dieta alta en grasa	Hiperglicemia	↓ RI (HOMA) ↑ TGs (Plasma)	↑ TNF- $\alpha$ (Hepático) ↑ IL-6 (Hepática)	(Selma-Gracia et al., 2021)
Semilla de chía	Humanos con MASLD IMC $\approx$ 30kg/m <sup>2</sup>	MASLD	↓ Grasa visceral ↓ Peso corporal ↓ Colesterol	↓ LDL ↓ AGL circulantes ↓ MASLD	(Medina-Urrutia et al., 2020)
Semilla de chía	Ratas Wistar no obesas	DLP, MASH	↓ Peso corporal ↓ MASH	↓ Lípidos séricos ↓ TNF- $\alpha$	(Fernández-Martínez et al., 2019)
Semilla de chía	Humanos IMC 25 - 40 kg/m <sup>2</sup>	Obesidad, diabetes	↓ Peso ↓ CC	↓ Proteína C reactiva ↑ Adiponectina	(Vuksan et al., 2017)

ALA: Ácido  $\alpha$ -linolénico – CC: Circunferencia de Cintura - DLP: Dislipidemia – AGL: Ácidos Grasos Libres - MASLD: Esteatosis hepática no alcohólica – NASH: esteatohepatitis no alcohólica - RI: Resistencia a la insulina – TGs: triglicéridos

### 3. Planteamiento del problema

Según Gallegos Garza et al. (2024), The Lancet (Riazi et al., 2022), y predicciones importantes basadas en ENSANUT 2018-2019 (Ruiz-Manriquez et al., 2022), la enfermedad del hígado graso asociada a la disfunción metabólica (MASLD), anteriormente conocida como esteatosis hepática no alcohólica (Gallegos Garza et al., 2024), es la enfermedad hepática crónica más común en México (casi 50%) y en el mundo, situación que se relaciona con la alta prevalencia de, resistencia a la insulina/diabetes, y síndrome metabólico (Radu et al., 2023). Es una condición clínico-patológica caracterizada por la acumulación de lípidos en el hígado que genera daños similares a los producidos por el consumo de alcohol, pero en individuos sin historial de consumo crónico. Histológicamente se caracteriza por una acumulación de lípidos, macro o microvesicular, mayor a 5% del peso total del hígado. La esteatosis hepática simple tiene pocas complicaciones; sin embargo, si no es tratada puede progresar a esteatohepatitis (MASH, Metabolic-Disfunction Associated Steatohepatitis), la cual a su vez si no es controlada, puede progresar a fibrosis y ser un factor de riesgo alto para cirrosis y cáncer hepático (Abd El-Kader & El-Den Ashmawy, 2015; Chalasani et al., 2017; Yeh & Brunt, 2008). Por su parte, las dislipidemias (DLPs) son enfermedades comunes caracterizadas por la elevación de componentes lipídicos en el plasma sanguíneo, siendo la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia las formas más prevalentes de DLP (Berberich & Hegele, 2022; Bereda, 2022; Pirillo et al., 2021). Tanto la MASLD como las DLPs son factores de riesgo una de la otra, y, en buena parte, comparten una compleja fisiopatología que se produce cuando existe un desbalance en la adquisición y remoción de los triglicéridos, el colesterol y otros lípidos en el hígado y en la sangre (Gurevitz & Rosenson, 2024). El tratamiento farmacológico actual para ambas enfermedades consiste en la administración oral de fármacos como fibratos y estatinas (de Oliveira et al., 2024; Purva et al., 2020), los cuales pueden ser insuficientes e incluso producir efectos indeseables (Muscarì et al., 2002; Simic & Reiner, 2015). En este sentido, la investigación y búsqueda de productos naturales que puedan emplearse como tratamiento complementario de enfermedades crónicas, incluyendo MASLD y DLP, ha adquirido relevancia actual. La semilla de chía (*S. hispánica* L.) es un alimento natural empleado en la medicina tradicional que posee diversos beneficios para la salud (da Silva et al., 2016; Grancieri et al., 2019, 2022; Marineli et al., 2015; Moreira et al., 2022). Sus efectos benéficos en el

tratamiento de enfermedades se han relacionado con su riqueza en ácidos grasos esenciales (Fernandes et al., 2019; Hrnčič et al., 2020) y fitoquímicos antioxidantes (W. Khalid et al., 2023). Aunque existen algunos antecedentes sobre el efecto del consumo de chía sobre enfermedades crónicas y la asociación entre su consumo y la mejora de dislipidemias e hígado graso, un estudio que contraste los efectos del consumo de chía y el consumo de aceite de chía sobre MASLD y DLP, así como los posibles mecanismos celulares relacionados con sus efectos deseables a la salud, hasta ahora no ha sido publicado. Debido a ello, este trabajo de investigación busca evaluar el efecto de la ingesta de semilla de chía y aceite de chía sobre MASLD y DLP en un modelo agudo de ratas Wistar, así como los posibles mecanismos implicados en sus efectos terapéuticos. Este trabajo desea contribuir con el sustento científico disponible acerca de los efectos biológicos del consumo de chía y aceite de chía sobre MASLD y DLP; así como la comprensión de los mecanismos celulares implicados en la reducción de MASLD y DLP. Por otra parte, esta investigación busca explorar la forma de consumo de chía más efectiva para el tratamiento de estas patologías. Además, el conocimiento obtenido en este proyecto pretende promover el consumo de chía y aceite de chía entre la población a fin de mitigar, retrasar y/o evitar los efectos negativos de la esteatosis hepática y DLP. Por último, esta investigación científica busca ampliar el acervo de tratamientos complementarios disponibles para MASLD y DLPs, y con ello impulsar la mejora colectiva de la salud de las personas.

## 4. Objetivos

### 4.1 General

- Evaluar los efectos biológicos preventivos de la suplementación de semilla o aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre DLP y MASH experimentales en modelos agudos de ratas Wistar no obesas, mediante técnicas químicas, bioquímicas, y moleculares, a fin de evidenciar posibles mecanismos de acción terapéuticos.

### 4.2 Específicos

- Preparar las dietas experimentales mediante 1) la integración parcial de harina de chía negra al alimento estándar para roedores Purina Rodent Chow 5001 (DE); y 2) la adquisición del aceite de semilla de chía (A-Chía) para su administración posterior, lo cual permita emular el consumo de chía en una dieta típica occidental.
- Analizar la composición química-nutricional de las dietas experimentales mediante la determinación de la composición química proximal, el perfil de ácidos grasos, el espectro de RMN, el contenido fenólico total, flavonoides y actividad antioxidante (DPPH•, ABTS•+ y FRAP), a fin de relacionar sus efectos biológicos con su composición.
- Realizar la inducción de DLP y MASH sobre los animales de experimentación mediante la administración de tiloxapol y CCl<sub>4</sub> (respectivamente), para probar los efectos biológicos de la semilla y el aceite de chía sobre tales padecimientos.
- Contrastar los efectos de la suplementación de S-Chía y A-Chía sobre DLP y MASH experimentales, mediante la comparación de los niveles de diversos biomarcadores de los grupos experimentales con los grupos control, con el fin de conocer la forma de consumo de chía más eficiente para prevenir estas enfermedades.
- Identificar los efectos de la suplementación con semilla y aceite de chía sobre la expresión de genes y sobre el lipidoma, empleando técnicas de biología molecular (RT-PCR) y metabolómica (lipidómica), a fin de evidenciar posibles mecanismos de acción implicados en sus efectos preventivos.

## 5. Metodología

### 5.1 Material vegetal y reactivos

Para este estudio se emplearon semillas de chía negra (*S. hispanica* L.) cultivadas en el estado de Jalisco, México, por la empresa Mister Natural (Mister Alimentos, México), las cuales se obtuvieron de una popular tienda de autoservicio. Para asegurar la calidad del estudio, se realizó una única compra de todas las semillas necesarias para todo el experimento.

El aceite de chía (A-Chía) se adquirió de un establecimiento comercial online y se seleccionó con base en las siguientes características: el aceite debía ser grado comestible, extra virgen, extraído bajo un método de prensado en frío, libre de aditivos, conservadores, antioxidantes u otros componentes que comprometieran la veracidad de los resultados. Igualmente, se adquirieron varias botellas de 250 mL en una sola compra para asegurar la administración de un aceite con composición estándar a lo largo de todo el experimento.

Debido a los efectos bien conocidos del aceite de pescado (AP), en este estudio, se utilizaron cápsulas de aceite de salmón como un control positivo (C+), las cuales se adquirieron igualmente de un establecimiento comercial online de la marca B-Life (Puebla, México). Esta marca se seleccionó de entre otras muchas opciones debido a que en su composición únicamente se encontraban ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), gelatina y agua. Además, las cápsulas fueron la presentación idónea para este estudio puesto que el material de cubierta protege los ácidos grasos del pescado de la degradación.

La mayoría de los reactivos de grado analítico, incluyendo el reactivo tiloxapol (Triton WR1339) para causar dislipidemia, se compraron en Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EUA); y la mayoría de los solventes y el tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) para inducir esteatohepatitis se adquirieron de J.T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EUA).

### 5.2 Preparación de dietas experimentales

Las dietas experimentales que se administraron en este proyecto fueron 4: dieta estándar para roedores (DE) (control negativo [C-]), DE + suplementación con aceite de pescado (DE + AP) (control positivo [C+]), alimento parcialmente sustituido con semilla de chía (DE + S-Chía), y DE + suplementación con aceite de chía (DE + A-Chía).

La dieta estándar para roedores (DE) se adquirió de la marca Purina Rodent Chow 5001 (LabDiet®, Agribands Purina, México). La suplementación de los aceites de pescado (AP) y chía (A-Chía) se llevó a cabo directamente del recipiente contenedor, por lo que no fue necesario realizar ninguna preparación previa. Para la suplementación de la semilla de chía, tanto las semillas de chía negra como los pellets de la dieta estándar se molieron por separado en un molino de granos durante 1 minuto para obtener harinas. Después, se mezcló un 85% de harina de la DE con un 15% de harina de semilla de chía y con ayuda de agua purificada (10% w/v) se reformularon pellets de 3-4g aproximadamente. Los pellets recién formados se colocaron sobre charolas perforadas y se llevaron a secado en horno convencional a 35°C durante 48 h en oscuridad. Cuando los pellets reformulados estuvieron secos, se colocaron en un desecador cubierto con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. La elaboración de los pellets se llevó a cabo cada 4 días para evitar la degradación de los compuestos bioactivos sensibles de la semilla de chía.

### 5.3 Análisis químico de dietas experimentales

#### 5.3.1 Composición química proximal

La semilla de chía integra (SCI), la dieta estándar (DE) y la dieta reformulada con semilla de chía (S-Chía) fueron analizados mediante un análisis proximal que incluyó la determinación de humedad (934.01), cenizas (942.05), proteína (2001.11), grasa (920.39), fibra cruda (962.09), carbohidratos (por diferencia) y energía (suma aritmética) con base en los métodos analíticos de la Association of Official Analytical Chemists (2000). Se evaluaron dos lotes de cada muestra en diferentes momentos del estudio a fin de asegurar uniformidad en la composición química de las dietas experimentales suplementadas a lo largo del estudio.

#### 5.3.2 Perfil de ácidos grasos

La SCI, la DE, el aceite de chía (A-Chía) y la dieta reformulada con semilla de chía (S-Chía), fueron sometidos a un análisis del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases, según los métodos analíticos 963.22 y 969.33 de la (Association of Official Analytical Chemists, 2000). Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases GC1290 (Drawell, Chongqing, China) fueron las siguientes: fase móvil Helio; fase estacionaria columna ZB-WAX (Zebron Company); temperatura de columna 120-190°C; temperatura del inyector

225°C; rampa 12°C/min; detector FID a 250°C; cantidad de muestra 20 µL; y tiempo de corrida de 60 minutos. La cantidad de omega 3, 6 y 9, así como la proporción omega 3:6 se obtuvieron por calculo aritmético.

### 5.3.3 Análisis por RMN<sup>1</sup>H

La presencia del principal compuesto bioactivo de la chía, el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), así como de otros ácidos grasos y componentes esenciales, fue monitoreada en el A-Chía mediante un análisis por resonancia magnética nuclear de protón de hidrógeno (RMN<sup>1</sup>H). Para ello, se tomaron 20 µL del aceite A-Chía y se disolvieron en 0.7 mL de cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) de grado analítico, se homogenizaron bien y se depositaron en tubos para resonancia Wilmad® (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA) de 5 mm de diámetro con ayuda de micro embudos de vidrio previamente cargados con 100 mg de sulfato de sodio. Los tubos se colocaron en el receptáculo de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear cargado con un imán de 7 Tesla, para producir una frecuencia de 300.08 MHz. Los análisis se llevaron a cabo a una temperatura de 3.0°C, se utilizó una sonda asw3099 y se aplicó un ancho de pulso de 8.100. Se realizaron 40 escaneos. Los datos de resonancia obtenidos se analizaron en el software de RMN Mestrelab (Mestrelab Research, SLU) versión 14.3.3.

### 5.3.4 Capacidad antioxidante de las dietas experimentales

#### 5.3.4.1 Obtención de extractos

Para determinar el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de las dietas experimentales primero se obtuvieron extractos. La DE, la SCI y la dieta S-Chía se procesaron de la siguiente manera: se tomaron 50 g de cada muestra y se molieron en un molino de granos durante dos minutos hasta obtener un polvo fino. Después se tomaron 10g de cada muestra molida y se mezclaron con 100 mL de metanol al 80% (v/v). La mezcla se homogenizo con un homogeneizador Ultra-Turrax® T 25 digital (IKA, Staufen, Alemania) durante 5 min a 3000 rpm y la mezcla se dejó macerando con agitación a temperatura ambiente durante 36 h en oscuridad. Después, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C el sobrenadante se colectó de tubos de centrifuga y se filtró con ayuda de un

embudo Büchner y un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío (Buchi®, Suiza). El extracto filtrado se almacenó en viales ámbar y se ultracongeló a 70°C hasta la realización de las determinaciones de antioxidantes posteriores. A fin de estimar el nivel de contribución de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos al poder antioxidante total de las muestras, se desarrolló un segundo método donde previamente las muestras fueron desgrasadas mediante Soxhlet. Al final, los resultados de las muestras desgrasadas se compararon con las muestras no desgrasadas (ND).

Por otro lado, por tratarse de muestras oleosas, los extractos de los aceites de chía (A-Chía) y pescado (AP) se obtuvieron de una manera diferente. Brevemente, se tomó 1 mL de AP o A-Chía y se mezcló con 4 mL de hexano y 1 mL de metanol al 60% (v/v). Cada muestra se agitó vigorosamente durante 5 minutos en un Vórtex y después se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. Al observar la separación de fases, se retiró en hexano con pipeta Pasteur de vidrio y se colectó la fracción metanólica. El proceso se repitió una vez más a fin de incrementar el rendimiento de antioxidantes en el extracto. La fracción metanólica se aforó a 10 mL y se guardó en ultracongelación a -70°C hasta la determinación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

#### *5.3.4.2 Contenido fenólico total*

El contenido fenólico total de la semilla de chía integra (SCI), la dieta estándar para roedores (DE), el alimento reformulado con harina de chía (S-Chía), el aceite de chía (AP) y el aceite de pescado (AP) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, según la técnica descrita por Singleton & Rossi (1965). Brevemente, en tubos esmerilados se colocaron 0.5 mL de extracto de cada muestra (obtenidos previamente) y 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA) diluido 1:10 con agua bidestilada. La mezcla se dejó en oscuridad durante 10 min y se agregaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7% p/v). Los tubos se agitaron suavemente y se dejaron en oscuridad durante 90 minutos. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro UV-Vis JENWAY 6715 (Cole-Parmer Instrument Company, EUA) a 760 nm y los resultados se interpolaron en una curva patrón de ácido gálico previamente elaborada (0-500 ppm).

#### *5.3.4.3 Ensayo de inhibición del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)*

El ensayo de inhibición del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El ABTS se convierte en el catión radical azul ABTS<sup>•+</sup> por la adición de persulfato de potasio. Cuando el radical catión ABTS<sup>•+</sup> reacciona con antioxidantes como fenoles, tioles y vitamina C, se convierte de nuevo a su forma neutra incolora, por lo tanto, se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad de disminuir la concentración del radical (Re et al., 1999). A un volumen de 980 µL de ABTS<sup>•+</sup> previamente ajustado con solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hasta obtener una absorbancia a 734 nm de 0.7 +/- 0.02, se agregaron 20 µL de extracto, la mezcla se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se monitoreo el cambio de coloración por espectrofotometría (Re et al., 1999). Los valores se extrapolaron en una curva de calibración con ácido gálico y se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra.

#### *5.3.4.4 Ensayo de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil*

El ensayo de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), comúnmente usado para medir la capacidad antioxidante de una sustancia, se basa en la estabilidad del radical 1,1-fenil-2-picrihidrazil (DPPH<sup>•</sup>), la cual se atribuye a una deslocalización del electrón desapareado que como consecuencia le otorga una coloración violeta. Cuando una disolución de DPPH<sup>•</sup> entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R que ocasiona el decaimiento de la absorbancia o, dicho de otro modo, la pérdida de color violeta (O. P. Sharma & Bhat, 2009).

Esta determinación se llevó a cabo por el método desarrollado por (Brand-Williams et al., 1995). Se mezclaron 200 µL de muestra y 1 mL de DPPH<sup>•</sup> al 7.5%, y se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Los cambios en la coloración fueron medidos a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Vis JENWAY 6715 (Cole-Parmer Instrument Company, EUA). Se construyó una curva de calibración con reactivo de Trolox Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EUA) para extrapolar los valores obtenidos de cada extracto que se expresaron como mg equivalentes de Trolox (ET)/100 g de extracto.

#### *5.3.4.5 Ensayo de poder de reducción del ion férrico*

El ensayo FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) se realizó de acuerdo con el método de (Benzie & Strain, 1996), con algunas modificaciones. El método FRAP se basa en la formación de un complejo de color (tripiridiltriaina ferroso) por la reducción del ión férrico a ferroso a pH bajo. Las soluciones stock que se utilizaron fueron: buffer de acetato 300 mM (3.1 g  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  y 16 mL de  $C_2H_4O_2$ ) a pH 3.6, TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) 10 mM, solución de HCl 40 mM y solución de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  mM. Se preparó una solución mezclando 25 mL de buffer de acetato, 2.5 mL de solución TPTZ y 2.5 mL de solución  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  y se calentó a 37 °C antes de su uso. 0.15 mL de los extractos se pusieron a reaccionar con 2.85 mL de la solución FRAP durante 30 minutos en la oscuridad. Se tomaron lecturas a 593 nm comparando en una curva de calibración con Trolox. Los resultados se expresaron en mM ET/100 g de extracto.

### 5.4 Modelo animal

#### 5.4.1 Determinación de las dosis

Se realizó una amplia revisión de la literatura disponible en bases de datos académicas como Google Scholar, PubMed, Web of Science, SCOPUS-Elsevier, etc, y se seleccionaron diferentes estudios experimentales estrechamente relacionados con la presente investigación, con la finalidad de encontrar una “dosis común” tanto de A-Chía como de AP (Tabla 12).

La mayoría de los estudios que observaron efectos significativos suplementaron de 0.8 a 1.0 mL/kg de peso por día o superior. En este estudio, con la finalidad de 1) enfatizar los posibles efectos biológicos, 2) igualar la ingesta de grasa del grupo control (DE, 5%) y 3) igualar la ingesta de omega-3; se estableció una dosis de 1g de AP o A-Chía por rata por día, equivalente a 500 mg de omega-3 para el caso del pescado (300 mg de EPA + 200 mg de DHA) y a 500 mg de ALA en el A-Chía. Para el caso de la suplementación con semilla de chía, la cantidad de semilla de chía que se mezcló con la dieta estándar (DE) se calculó con base en la cantidad de lípidos totales presentes en la semilla y en la ingesta promedio de alimento de los roedores (10% de su peso aproximadamente).

**Tabla 12.**

Determinación de la dosis de suplementación con aceite de pescado y aceite de chía

Dosis	Tipo de muestra	Referencia
200 µl AP/día (45 mg EPA y 30 mg DHA)	Cápsulas	(Popović et al., 2012)
0.8 mL de aceite/kg/semana	Comercial	(Dasilva et al., 2015)
A-Chía: 4%. S-Chía: 14.7%	Extracción manual	(Enes et al., 2020)
10% aceite pescado del total de la dieta	Comercial	(G. Yuan et al., 2015)
2.5 mL aceite chía/kg/día	Extracción manual	(Ahmed et al., 2021)
7 g AP/kg de dieta	Comercial	(Majewski et al., 2020)
15 % semillas de chía o 5% aceite de chía	Comercial	(Ayerza & Coates, 2005)
13.3% de semilla o 4% aceite de chía	Comercial	(Marineli et al., 2015)
14.7% de harina de chía o 4% aceite de chía	Extracción manual	(Moreira et al., 2022)
0.8 mL aceite/kg peso/semana	Comercial	(Lluís et al., 2013)
Dosis oral semanal de 0.8mL AP/kg peso	Comercial	(Méndez et al., 2013)
1 g AP/animal/día (310 mg omega-3)	Cápsulas	(Lima Rocha et al., 2022)

AP: aceite de pescado

#### 5.4.2 Desarrollo experimental

Se utilizaron ratas Wistar normopeso, las cuales han sido previamente utilizadas en estudios semejantes. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico a una temperatura de 18 a 25 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con acceso libre al agua purificada. La masa corporal y el consumo de alimento fueron monitoreados semanalmente. En cuanto a la alimentación de los roedores, para las ratas suplementadas con A-Chía se dió un volumen promedio de 1 mL/rata/día, de acuerdo con las referencias consultadas (**Tabla 12**). Para la dieta S-Chía, la dieta estándar Purina Rodent Chow 5001 se modificó sustituyendo el 15% de la masa del pellet por harina de chía obtenida por molienda seca común. Tanto el A-Chía como la dieta S-Chía se administraron a los animales de experimentación de acuerdo con el siguiente diseño metodológico: un total de 88 ratas de laboratorio se integraron en 12 grupos experimentales y durante 28 días fueron alimentados o tratados con: 1) dieta estándar para roedores (DE) *ad libitum* (control negativo [C-]); 2) DE *ad libitum* + aceite de

pescado (AP) p.o. (control positivo [C+]); 3) dieta estándar parcialmente sustituida con semilla de chía (S-Chía) *ad libitum*; 4) + DE *ad libitum* + aceite de chía (A-Chía) p.o.

Después de 28 días de tratamiento, 4 grupos experimentales (grupos 5-8) (**Tabla 13**) fueron inducidos con DLP mediante la administración i.p. de 2.5 mL/kg de tiloxapol (TI), disuelto en solución salina como vehículo (VTI); 4 grupos (grupos 9-12) fueron administrados p.o. con 400 mg/kg de CCl<sub>4</sub> (TC), disuelto 1:1 en aceite mineral como vehículo (VTC) para inducir MASH; los 4 grupos restantes (grupos 1-4) fueron considerados como grupos control. De manera más detallada, los grupos experimentales se integraron tal como lo muestra la **Tabla 13**. La *n*=6 de los grupos 1-4 se estableció considerando que son grupos control y la *n* de los grupos 5-12 es mayor considerando que serán animales con inducción de daño. Para la administración p.o. se utilizó una cánula de laboratorio curva metálica, y para la administración i.p. se utilizaron jeringas de 3 mL.

**Tabla 13.**

Distribución de grupos experimentales

Dieta	Controles	DLP	MASH
DE + SS	<b>Grupo 1</b> VTI+VTC+DE <i>n</i> = 6	<b>Grupo 5</b> TI+VTC+DE <i>n</i> = 8	<b>Grupo 9</b> VTI+TC+DE <i>n</i> = 8
DE + AP	<b>Grupo 2</b> VTI+VTC+ AP <i>n</i> = 6	<b>Grupo 6</b> TI+VTC+ AP <i>n</i> = 8	<b>Grupo 10</b> VTI+TC+ AP <i>n</i> = 8
DE + S-Chía	<b>Grupo 3</b> VTI+VTC+S-Chía <i>n</i> = 6	<b>Grupo 7</b> TI+VTC+ S-Chía <i>n</i> = 8	<b>Grupo 11</b> VTI+TC+ S-Chía <i>n</i> = 8
DE + A-Chía	<b>Grupo 4</b> VTI+VTC+A-Chía <i>n</i> = 6	<b>Grupo 8</b> TI+VTC+A-Chía <i>n</i> = 8	<b>Grupo 12</b> VTI+TC+A-Chía <i>n</i> = 8

#### 5.4.3 Sacrificio de los animales y muestreo

Una vez transcurridas 24 h desde la administración de CCl<sub>4</sub> (para inducir MASH) o Tiloxapol (para inducir DLP), los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (28 mg/kg) en una cámara de anestesia. Después de revisar que los animales se encontraban en un estado total de inconsciencia, es decir, con ausencia de reflejos nociceptivos o de reacción

a estímulos como el sonido o el movimiento, se realizó una incisión torácica comenzando desde la parte abdominal y subiendo hasta el esternón. Se libraron las capas de la piel y la capa muscular y se procedió a cortar las costillas a fin de dejar expuesto el corazón. Una vez localizado el corazón, se realizó una punción cardiaca con una jeringa previamente heparinizada (1000 U/mL) a la altura del ventrículo derecho y cerca del seno coronario. Se extrajo con cuidado la mayor cantidad de sangre de cada animal evitando la hemólisis de esta. Después de la extracción de entre 6-12 mL de sangre, la muerte de los animales ocurrió por choque hipovolémico debido a la exanguinación. La sangre fue depositada en tubos de centrifuga de 15 mL mantenidos todo el tiempo en hielo triturado (2-8 °C) y sometidos a centrifugación a 3500 rpm por 10 min a 4°C para la obtención del plasma sanguíneo, el cual fue empleado para la determinación de los marcadores bioquímicos descritos más adelante. Inmediatamente después de la muerte de cada animal, se realizó la extracción del hígado completo empleando pinzas y bisturí quirúrgicos. Al extraerse, cada hígado recibió dos lavados con solución salina a fin de retirar los restos sanguíneos y posibles coágulos formados durante el procedimiento. Cada hígado se pesó al instante en una balanza analítica y se mantuvo en hielo triturado (2-8 °C) durante todo el experimento hasta su procesamiento para la determinación de biomarcadores hepáticos, en el mismo día.

#### **5.4.4 Tratamiento de residuos biológicos**

Los restos de los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo con el protocolo de RPBI. Para ello, cada animal se depositó en bolsas amarillas para almacenar los residuos anatómicos y se mantuvieron en congelación hasta su recolección bimestral por la compañía MEDAM, en el Área Académica de Medicina en E. Ramírez Ulloa.

#### **5.4.5 Criterios de punto final y aspectos bioéticos**

El tiloxapol (Triton WR1339) es un surfactante no iónico que se ha utilizado ampliamente para inducir hiperlipidemia aguda en modelos animales a fin de detectar fármacos naturales o químicos hipolipemiantes, así como para estudiar el metabolismo del colesterol y los triglicéridos (Kuo et al., 2006). Por otro lado, el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) es una toxina hepática bien caracterizada que causa daño directo a los hepatocitos, lo que lleva a hígado graso y fibrosis hepática (Weber et al., 2003). Debido a que los protocolos para la inducción

de dislipidemias e hígado graso bajo estos métodos son de 24-48 h y sus mecanismos de acción son la estimulación de HMG-CoA reductasa, disminución de la actividad de LPL y daño oxidativo hepático (Fernández-Martínez et al., 2019), no se han reportado ni han sido observados comportamientos que sugieran sufrimiento en los animales experimentales en el pasado. Aun con ello, durante las 24 y 48 h que conllevó la inducción de daño por estos reactantes, se prestó particular atención a la aparición de conductas nociceptivas como piloerección, sedación, ascitis, ictericia, inconciencia, diarrea, o signos y síntomas que refieran sufrimiento y, de aparecer alguna de ellas dependiendo de su intensidad, se tomó la decisión de punto final con la cámara de CO<sub>2</sub> disponible en el Bioterio de la UAEH, sin importar la reducción del número de miembros por cada grupo.

Por otro lado, durante todo el tiempo de estudio, los animales recibieron un trato humanitario de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999 y en la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, 8va ed. del “National Research Council of the National Academies”, de EUA. Asimismo, antes de su implementación, el protocolo experimental de este trabajo fue propuesto, evaluado y aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (CICUAL-UAEH); el cual fue registrado con el número de folio CICUAL-V-I/004/2023.

#### **5.4.6 Determinación del efecto de la suplementación sobre DLP y MASH**

Debido a que la DLP y la MASH comparten diversos aspectos fisiopatológicos, los 12 grupos experimentales fueron sometidos a un análisis de perfil lipídico. De igual manera, en todos los grupos experimentales se determinó el grado de daño hepático mediante la cuantificación espectrofotométrica de fosfatasa alcalina (FA), alanina-aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil transpeptidasa (GGTP), bilirrubina total, bilirrubina directa (BD), glucosa, glucógeno, grado de lipoperoxidación (TBARS), y la actividad de la enzima catalasa (CAT). Posteriormente, se realizaron análisis histológicos, moleculares y un perfil lipídico por RMN-<sup>1</sup>H (descritos más adelante).

#### *5.4.6.1 Determinación del perfil lipídico y glucosa en plasma*

El perfil lipídico, que incluyó la cuantificación de colesterol total, c-HDL, c-LDL, lípidos totales, triglicéridos y lipasa, y los niveles de glucosa plasmática, se determinaron utilizando kits comerciales de la marca Spinreact (Spinreact, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todo el perfil lipídico se determinó espectrofotométricamente utilizando un lector de microplacas MultiSkan (ThermoFisher Scientific Inc.) y placas de 96 posos.

#### *5.4.6.2 Determinación de marcadores de daño hepático*

##### **Fosfatasa alcalina**

En este trabajo, la determinación de la fosfatasa alcalina se realizó siguiendo el método general descrito por Bowers Jr & McComb (1966) con adaptaciones. Brevemente, en tubos esmerilados se colocaron 250  $\mu$ L de buffer de glicina 0.1 M y  $MgCl_2$  1 mM (pH 10.5) y 250  $\mu$ L de p-nitrofenilfosfato (100 mg en 25 mL de agua destilada). La mezcla se colocó en baño maría a 37°C por 5 minutos. Después, se añadieron 50  $\mu$ L de plasma sanguíneo y cada tubo se agitó suavemente. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y al término se agregaron 5 mL de NaOH 0.02 N. Los tubos se agitaron por inversión. Se leyó la absorbancia a 410 nm en espectrofotómetro UV-Vis JENWAY 6715 (Cole-Parmer Instrument Company, EUA) frente a un blanco de reactivos en el cual el plasma sanguíneo se sustituyó por agua destilada. Las absorbancias se interpolaron en una curva patrón de p-nitrofenol preparada previamente.

##### **Alanina aminotransferasa**

ALT se determinó con base en el método reportado por Reitman & Frankel (1957) modificado ligeramente. La técnica se desarrolló agregando 250  $\mu$ L de ácido  $\alpha$ -oxoglutarico y 50  $\mu$ L de plasma sanguíneo e incubando la mezcla a 37°C durante 60 minutos. Después se agregaron 250  $\mu$ L de 2,4 dinitrofenihidrazina y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Para detener la reacción colorimétrica se agregaron 2.5 mL de NaOH 0.4 N. Se leyó la absorbancia de cada muestra a 515 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una curva patrón de piruvato previamente diseñada.

### Gamma-glutamyl transpeptidasa

La determinación de GGTP se llevó a cabo siguiendo el método general descrito por Glossmann & Neville (1972). En tubos esmerilados se colocaron 400  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 200 mM (pH 8.2), 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  200 mM, 100  $\mu\text{L}$  de glicil-glicina 40 mM (pH 8.2) y 200  $\mu\text{L}$  de gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C en baño de agua y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de plasma sanguíneo. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos a 37°C y se leyó la densidad óptica a 410 nm frente a un blanco de reactivos en el cual el plasma se sustituyó por 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Debido a que la enzima GGTP emplea la gamma-glutamyl-p-nitroanilida como sustrato, obteniéndose a partir de este p-nitroanilina, las lecturas de absorbancia obtenidas se interpolaron en una curva estándar de p-nitroanilina (en ácido acético 1.5 M) previamente preparada.

### Glucógeno

El glucógeno es un polímero ramificado de unidades de glucosa que se almacena principalmente en el músculo y en el hígado. El glucógeno se sintetiza a partir de la glucosa de la dieta o a partir de otros sustratos no glucídicos. En el hígado la depleción repentina de glucógeno obedece a injurias hepáticas, fármacos o estímulos neuro-endócrinos que aceleran la liberación de unidades de glucosa al torrente sanguíneo (Gusarov & Nudler, 2018). La depleción del glucógeno sin importar la razón es mediada en gran parte por AMPK. Por tales motivos, la disminución del glucógeno hepático se considera un marcador de estrés fisiológico o enfermedades hepáticas (Adeva-Andany et al., 2016). La determinación de glucógeno se llevó a cabo mediante el método de la antrona propuesto por Seifter et al. (1950). Se pesaron 500 mg de hígado y se depositaron en tubos de vidrio con tapón, se adicionaron 1.5 mL de HOH al 30% y se sometieron a ebullición en baño maría durante 30 minutos. Después se transfirió cuantitativamente el contenido de cada tubo a un matraz aforado de 25 mL y se aforo con agua destilada. De cada matraz se tomaron entre 40-160  $\mu\text{L}$ , según su conjeturable contenido de glucógeno y se depositaron en nuevos tubos esmerilados de 13x100 y se completó el volumen hasta 1 mL con agua destilada. Después se agregaron 2 mL de solución de antrona (0.2% de antrona en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) a cada tubo con ayuda de una bureta y en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento

de los tubos. Se pusieron los tubos a ebullición en baño de agua durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro JENWAY 6715 (Cole-Parmer Instrument Company, EUA) a 620 nm frente a un blanco de reactivos (agua destilada) y un estándar de glucosa (1 mg/mL). Los resultados se expresaron como gramos de glucógeno por cada 100 g de hígado.

### **Bilirrubina total**

La prueba de bilirrubina se considera un análisis estándar para la evaluación de la función hepática. La bilirrubina es un producto de la degradación del grupo hemo de la hemoglobina. En el hígado la bilirrubina se conjuga con la albúmina, a fin de volverla hidrosoluble. Una vez conjugada, al bilirrubina se secreta en la bilis (Kasarala & Tillmann, 2016). El contenido de bilirrubina total en el plasma sanguíneo se determinó mediante un kit colorimétrico de la marca Spinreact® (Spinreact S.A., Gerona, España). El fundamento de este método se basa en la unión de la bilirrubina conjugada y no conjugada con el colorante diazo en presencia de un surfactante, para formar azobilirrubina. La intensidad del color formado, medido como el incremento de la absorbancia a 546 nm con respecto al blanco de reactivos, es proporcional a la cantidad de bilirrubina total en la muestra.

### **Bilirrubina directa**

En sujetos sanos, la bilirrubina conjugada (directa) comprende una pequeña proporción del total de la bilirrubina. El panorama contrario puede sugerir problemas en la función hepática (Kasarala & Tillmann, 2016). El contenido de bilirrubina directa en el plasma sanguíneo se determinó mediante un kit colorimétrico de la marca Spinreact® (Spinreact S.A., Gerona, España). La técnica se fundamenta en la combinación de la bilirrubina directa (conjugada) con una sal de diazonio en presencia de ácido sulfámico, para formar el compuesto coloreado azobilirrubina, el cual se puede monitorear espectrofotométricamente a 546 nm, siendo la intensidad del color formado, proporcional a la cantidad de bilirrubina directa en la muestra analizada.

## Lipoperoxidación

Todas las células animales poseen una membrana doble de fosfolípidos, los cuales son ricos en ácidos grasos. La incorporación enzimática o no enzimática de oxígeno en los ácidos grasos membranales lleva a un fenómeno que se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación. En este sentido, el malondialdehído (MDA) es un subproducto volátil de la oxigenación enzimática del ácido araquidónico y un producto final de la degradación oxidativa de lípidos. Por otra parte, el ácido tiobarbitúrico (TBA) es un reactivo analítico que posee alta afinidad por el MDA, el cual al unirse produce un aducto rojo-rosa fluorescente (Janero, 1990). De esta manera, la ruptura de las membranas celulares y la oxidación de los lípidos membranales se puede determinar mediante la cuantificación del incremento de la coloración rojiza en la mezcla de reacción a 532 nm. Este ensayo es conocido como prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Por ello, en este estudio, el grado de lipoperoxidación se determinó midiendo la cantidad de malondialdehído (MDA) liberado del tejido hepático, según el método descrito por Buege & Aust (1978). Para ello, se depositaron 500 mg de tejido hepático en tubos esmerilados y se homogenizaron con un homogeneizador de tejidos con sonda de teflón en 5 mL de agua destilada. Después, se tomaron 300  $\mu$ L del homogenado y se agregaron 700  $\mu$ L de Tris-HCl 150 mM en tubos nuevos. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se agregaron 2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) disuelto en ácido tricloroacético al 15%. Los tubos se pusieron en baño de agua a ebullición durante 45 minutos, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se analizó en espectrofotómetro a 532 nm. Para poder expresar los resultados como nanomoles de MDA/mg de proteína, se determinó el contenido de proteína de cada muestra, siguiendo el método de Bradford reportado por Edelson & Duncan (1981), con adecuaciones. Resumidamente, se tomaron 100  $\mu$ L de homogenado de hígado y se completó el volumen a 1 mL con agua destilada. Después se tomaron 20  $\mu$ L de ese volumen y se mezclaron con 80  $\mu$ L de agua destilada nuevamente en tubos de vidrio. Se agregaron 2.4 mL de reactivo de Bradford y se leyó la densidad óptica a 595 nm. Los resultados se obtuvieron al interpolar las absorbancias en una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) previamente diseñada (0-100 mg de BSA).

## Catalasa

Las catalasas, presentes en casi todos los organismos con respiración aeróbica, desempeñan un papel importante en la defensa celular contra el daño oxidativo al degradar el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a agua y oxígeno ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Se las ha implicado como un factor importante en la inflamación, la mutagénesis, la prevención de la apoptosis y la estimulación de un amplio espectro de tumores (Alfonso-Prieto et al., 2009). Como un indicador del estado antioxidante endógeno hepático, se determinó la actividad de la enzima catalasa (CAT) siguiendo el método de Cohen et al. (1970), con modificaciones importantes. Básicamente, la técnica consistió en homogenizar 500 mg de hígado de rata en solución PBS. El homogenado resultante se llevó a centrifugación a 3000 rpm por 6 minutos. Después, se tomaron alícuotas de 1 mL del sobrenadante y se depositaron en tubos de vidrio, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de etanol 0.17 M y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de tritón al 10% y se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de dicha mezcla, los cuales a su vez se mezclaron con 4.9 mL de PBS en tubos limpios. De los 5 mL resultantes de la mezcla se tomaron por duplicado 500  $\mu\text{L}$  y se colocaron en tubos de vidrio de 20 mL. Se agregaron 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se agitaron los tubos. Después de 3 minutos exactos de reacción, se agregó 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Finalmente, se añadieron 7 mL de  $\text{KMnO}_4$  a cada tubo, se agitaron en vortex y se leyó su densidad óptica a 480 nm. Las absorbancias se sustituyeron en la siguiente ecuación que describe una cinética de primer orden:  $k = \log(S_0/S_3) \times 2.3 / t$ , y así se obtuvo la actividad de la catalasa hepática, la cual se expresó como  $k \times 10^2/\text{min}$ , siendo  $k$  la constante de velocidad de reacción de primer orden,  $t$  el tiempo de reacción (3 minutos),  $S_0$  la concentración del sustrato al tiempo cero y  $S_3$  la concentración del sustrato a los 3 minutos. A su vez,  $S_0$  se obtuvo restando la absorbancia del blanco del estándar y para obtener  $S_3$  se sustrajo cada absorbancia obtenida del estándar espectrofotométrico.

### 5.4.6.3 Histología

Se realizaron análisis histológicos utilizando tinciones de hematoxilina/eosina. Se cortaron 3 laminillas del lóbulo central mayor de cada hígado y se fijaron en formaldehído al 10% durante un mínimo de 24 horas y se almacenaron así hasta su análisis. Para el análisis, las

muestras se enjuagaron primeramente con agua y se deshidrataron después utilizando una serie de reactivos basados en alcoholes, para colocarlos en parafina inmediatamente. A continuación, se realizaron cortes del tejido de aproximadamente 6 mm de espesor utilizando un microtomo manual de rotación SM2010 R (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). La tinción se llevó a cabo empleando el tinte de hematoxilina/eosina con la finalidad de diferenciar las estructuras celulares y el tejido. Utilizando este método se pueden observar la tinción de los núcleos celulares en color azul y el citoplasma de los hepatocitos en color rosa.

#### *5.4.6.4 Análisis molecular*

El efecto de la suplementación con semilla o aceite de chía sobre la expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR). Primeramente, se realizó una extracción de RNA hepático. Para ello se tomaron 100 mg de hígado de rata y se homogenizaron en un homogenizador de tejidos Ultra-Turrax® T 25 digital (IKA, Staufen, Alemania) a 3000 rpm durante 1 minuto con 1 mL del reactivo TRIzol™ (isotiocianato de guanidina, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) en hielo. Después, las muestras se centrifugaron y el RNA se precipitó utilizando 0.5 mL de alcohol isopropílico, el cual se colectó con ayuda de una micropipeta, se lavó y se resuspendió en agua libre de RNasa. Se analizó la cantidad y la calidad del RNA utilizando un espectrofotómetro de placas UV-Vis EPOCH (Agilent BioTek, Vermont, EUA) realizando lecturas del material genético diluido en agua libre de RNasa a 260 y 280 nm. La integridad del RNA de cada muestra se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) al 2% a 100 V utilizando bromuro de etidio. Las muestras con cantidad e integridad de RNA viables fueron tratadas con la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT, Promega, Wisconsin, EUA) para generar el DNA complementario (cDNA). Después, el cDNA de cada muestra se utilizó como molde para la amplificación de diferentes genes relacionados con el metabolismo lipídico, la inflamación, la tasa metabólica y el crecimiento celular. Para la amplificación se utilizó la enzima MyTaq™ DNA polimerasa (Meridian Bioscience, Ohio, EUA). Igualmente, se diseñaron cebadores directos (forward primers) e inversos (reverse

primers) *in silico* para cada gen. La secuencia de nucleótidos y otros detalles de los cebadores de cada gen se detallan en la **Tabla 14**. Para la normalización de los datos experimentales se utilizó en gen GD3PH (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, un gen glucolítico) como gen “housekeeping” en cada reacción de PCR, así como cDNA de células MCF7 como control positivo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Dx 96-Fast (Applied Biosystems, California, EUA) operado bajo las siguientes condiciones estándar: desnaturalización inicial 95°C durante 5 minutos, desnaturalización a 95°C 30 segundos, alineamiento 30 segundos según el cálculo de la  $T_m$ , extensión a 72°C durante 30 segundos y la extensión final a 72°C durante 10 minutos. Por último, los genes amplificados se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V utilizando un marcador de peso molecular de 100kb como referencia. A fin de obtener y comparar la densidad de las bandas, los geles se analizaron en un fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Berkeley, California, EUA) y con base en ello se calculó tanto la expresión relativa como los cambios en la expresión según el tratamiento.

#### **5.4.6.5 Lipidómica**

Se seleccionaron un total de 5 muestras por cada uno de los grupos experimentales y se sometieron a un análisis lipidómico no dirigido, a fin de detectar cambios en las firmas lipídicas hepáticas de cada uno de los grupos tras el tratamiento con semilla o aceite de chía, durante 4 semanas.

Se pesaron 300 mg de tejido hepático de cada muestra, y se depositaron en tubos eppendorf de 2 mL previamente pesados. A cada tubo se le agregaron cinco perlas de circonio y 1 mL de una mezcla metanol-cloroformo en una relación 1:2. Posteriormente, las muestras se sometieron a agitación mecánica en un homogenizador de perlas BeadBug (Benchmark Scientific D1030, 115 V, 60 Hz) durante dos ciclos consecutivos a 400 rpm, con una duración de 180 segundos cada uno. Tras la homogenización, las muestras se centrifugaron a 14 000 × g durante 15 minutos a 4 °C, de acuerdo con el método descrito por (Folch et al., 1957). Después se retiró la fase orgánica y se depositó en nuevos tubos eppendorf de 2 mL. Este procedimiento se repitió dos veces. Una vez recolectada la fase de cloroformo que contenía los lípidos, los tubos se mantuvieron en una campana de extracción durante

aproximadamente 2 horas a fin de promover la evaporación del solvente. La diferencia de peso entre el tubo nuevo y el tubo que contenía los lípidos tras la evaporación del solvente se consideró como el contenido de lípidos de cada muestra; dicho peso se utilizó posteriormente para la normalización de los datos.

Después, se tomaron 20 mg de la fracción lipídica de cada tubo eppendorf y se mezclaron con 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$  de grado analítico, se homogenizaron y se depositaron en tubos para resonancia Wilmad® (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA) de 5 mm de diámetro con ayuda de micro embudos de vidrio previamente cargados con 100 mg de sulfato de sodio. Los tubos se colocaron en el receptáculo de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear cargado con un imán de 7 Tesla, para producir una frecuencia de 300.08 MHz. Los análisis se llevaron a cabo a una temperatura de 3.0°C, se utilizó una sonda asw3099 y se aplicó un ancho de pulso de 8.100. Se realizaron 40 escaneos. Los datos de resonancia obtenidos se analizaron en el software de RMN Mestrelab (Mestrelab Research, SLU) versión 14.3.3.

Los espectros de resonancia (FIDs) fueron procesados en el programa MestreNova según las siguientes especificaciones: apodización: exponencial (-500), gaussiana (-0.3 GB); corrección de fase automática, corrección de línea base mediante suavizado de Whittaker. Normalización de señal por pico más alto (100.00).

Una vez normalizados, los espectros de resonancia fueron transformados en datos numéricos mediante un proceso conocido como “binning” de los datos y se exportaron en formato xls. Para la reducción de la dimensionalidad de los datos lipidómicos y el análisis se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA) y un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

#### ***5.4.6.6 Análisis estadístico***

El análisis estadístico requirió la realización de cada experimento por triplicado y cada prueba estadística se seleccionó según el tipo de datos y el cumplimiento (o no) de diversos supuestos. Para la comparación de 2 grupos experimentales (por ejemplo, tratamiento A vs tratamiento control) se realizaron pruebas T (datos con distribución normal) o análisis no

paramétricos U de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ , para datos normales). Además, para la multicomparación de diferencias entre pares de medias entre más de dos grupos (por ejemplo, tratamiento A vs tratamiento B vs tratamiento C... etc.) se utilizó una prueba ANOVA o ANOVA de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ) ajustada con prueba de Bonferroni, según el caso. Los datos con distribución normal fueron analizados además mediante análisis posthoc de Tukey (0.05). Adicionalmente, de todos los datos se obtuvieron estadísticos descriptivos como la media, el error y la desviación estándar. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ . Se emplearon los softwares IBM SPSS versión 24 (IBM Nueva York, EUA) y GraphPad Prism versión 8 (Dotmatics, Massachusetts, EUA) para el tratamiento estadístico y la construcción de los gráficos, respectivamente.

La estadística empleada en el análisis lipidómico incluyó la normalización por suma de los datos (bins), escalado de Pareto, pruebas T y fold change, ANOVA y obtención de z-scores, entre otros. Además, se obtuvieron mapas de calor de agrupamiento y volcano plots para describir mejor los resultados del análisis. Para ello, se utilizaron los programas SIMCA 14.1 y MetaboAnalyst 6.0.

Tabla 14.

Secuencia 5' a 3' los cebadores utilizados para la amplificación de genes

Gen	Secuencia directa (Forward)	Secuencia inversa (Reverse)
GD3PH (Hk)	-	-
TNF- $\alpha$	TTCTGTCTACTGAACTTGGGGGTGATCGGTC	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG
IL-1b	GGCTGCTTCCAAACCTTTGA	GAAGACACGGATTCCATGGT
IL-10	CTGGCTCAGCACTGCTAT	ATTCATGGCCTTGTAGACAC
PPAR- $\alpha$	GGCTCGGAGGGCTCTGTCATC	ACATGCACTGGCAGCAGTGGA
SREBP-1c	TCACAGATCCAGCAGGTCCCC	GGTCCCTCCACTCACCAGGGT
PPAR- $\gamma$	ATTCTGGCCCACCAACTTCGG	TGGAAGCCTGATGCTTTATCCCCA
NF- $\kappa$ B	TCCAGCTGCTATTGGATTACAC	GGGATGCGATACCTTAATGAC

HK: Gen endógeno o "Housekeeping"

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Análisis de dietas experimentales

#### 6.1.1 Composición química

La **Tabla 15** muestra la composición proximal la semilla de chía integra (SCI), la dieta estándar para roedores (DE) y el alimento para roedores modificado con semilla de chía (S-Chía). El contenido de humedad osciló entre el 6 y el 9% en todas las muestras. El contenido de humedad fue de aproximadamente 4% en la SCI y de 8% en la DE y en la dieta S-Chía. El contenido de proteína fue de 18% en SCI, de 20 en DE y de 22% en S-Chía. La reformulación de la DE con harina de chía no ocasionó un incremento significativo en el contenido proteico. El contenido de grasa fue de 25% en SCI y de 3% en la DE, lo cual coincidió con el contenido de grasa en la DE reportado por el fabricante (5%). La reformulación de la DE con SCI para formar la dieta S-Chía no incrementó el contenido de grasa total, pero si su composición (datos mostrados más adelante). El alto contenido de fibra de la SCI (30%) incrementó el contenido de fibra de 5.8% en la DE a 7.4% en la dieta S-Chía, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). El bajo contenido de carbohidrato en la SCI contrastó con el porcentaje de carbohidratos en la DE (50%) y dicho porcentaje no impactó significativamente en el contenido de carbohidratos de la dieta S-Chía (50%). Por último, la mayor densidad calórica se observó en la semilla de chía íntegra, la cual fue 422 kcal/100g de semilla; y no se observaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre el contenido calórico de la DE (332 kcal) y la dieta S-Chía (345 kcal). La **Tabla 16** muestra el perfil de ácidos grasos de la SCI, DE, S-Chía, y A-Chía. La DE fue la única muestra que tuvo en su composición ácido caproico (6:0, SCFA) aunque en cantidades muy bajas. Los ácidos grasos de cadena media (MCFA) caprílico (8:0), cáprico (10:0) y láurico (12:0) solo aparecieron en la DE y en la dieta S-Chía, siendo estadísticamente mayor el contenido de dichos ácidos grasos en DE. El contenido de los ácidos grasos saturados (SCFA) mirístico (14:0), palmítico (16:0), y araquídico (20:0) fue DE > S-Chía > SCI = A-Chía; sin embargo, el contenido de los ácidos margárico (17:0) y esteárico (18:0) fue SCI > A-Chía > DE > S-Chía. Por otro lado, el contenido de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) fue DE > S-Chía > SCI > A-Chía. El ácido graso poliinsaturado (PUFA) linoleico (18:2, omega-6) fue DE > S-Chía > SCI = A-Chía. El ácido

linolénico (ALA, 18:3, omega-3) fue A-Chía > SCI > S-Chía > DE. En general, la sustitución parcial con semilla de chía disminuyó significativamente el contenido de los ácidos palmítoleico, oleico y linoleico en la dieta S-Chía, pero incrementó el porcentaje de ALA de 3% a 46% en la dieta S-Chía. Por último, el contenido total de omega-3 (base seca) fue estadísticamente mayor en A-Chía, seguido de SCI, S-Chía y luego DE. Por su parte el contenido total de omega-6 (base seca) fue igualmente en A-Chía, seguido de SCI, DE, y luego S-Chía. Con estos valores se calculó la proporción omega-6:omega-3, la cual idealmente debe ser cercana o menor a 1 para poder reconocerse como saludable desde el punto de vista de la nutrición. El A-Chía mostró la mejor proporción, seguido de la SCI, luego la S-Chía y al final la DE, la cual tuvo la peor proporción omega-6:omega-3, asemejándose a los patrones de consumo dietético de lípidos en dietas occidentales. Estos resultados son consistentes con el diseño metodológico y aseguraron la suplementación equivalente de omega-3 (ALA) en los roedores en ambos tratamientos (S-Chía y A-Chía), ya que, según estos resultados, 1 g de A-Chía contiene aproximadamente 600 mg de omega-3 (60%), mientras que los resultados mostraron que la dieta reformulada S-Chía tuvo un contenido de omega-3 cercano a los 30 mg (3%). De este modo, teniendo en cuenta que el consumo promedio de alimento es de 20 g por día por roedor, al consumir 20 g de la dieta S-Chía el animal ingirió aproximadamente 600 mg de omega-3 (30 mg de omega-3 x 20 g de alimento al día), lo cual es equivalente al contenido de omega-3 en A-Chía que se suplementaría a cada roedor posteriormente.

### 6.1.2 Capacidad antioxidante

La **Tabla 17** muestra el contenido de fenoles totales y flavonoides, así como la inhibición de los radicales ABTS, DPPH y FRAP, como un reflejo del poder antioxidante de las dietas experimentales desgrasadas y no desgrasadas (ND). El mayor contenido fenólico total se observó en la dieta S-Chía, y el menor en el A-Chía. Igualmente, el contenido de flavonoides fue mayor en la DE y S-Chía, y menor en A-Chía y AP. La inhibición de ABTS (Trolox) fue mayor en la dieta S-Chía y menor en A-Chía y AP. La inhibición de DPPH (Trolox) fue SCI > S-Chía > DE > A-Chía AP. El ensayo FRAP fue mayor en DE ND, lo cual probablemente se debe a la adición de antioxidantes como el BHT. S-chía mostró valores altos de  $EFe^{2+}$  y A-Chía y AP tuvieron valores menores sin mostrar diferencias entre ellos. Los resultados

obtenidos en este análisis permiten distinguir que una gran parte de los compuestos antioxidantes de la semilla de chía son de naturaleza lipofílica, puesto que el desgrasado de la muestra para los análisis redujo sustancialmente su capacidad antioxidante, además de que al usar equivalentes de Trolox los resultados fueron superiores. Sin embargo, contraintuitivamente, el aceite de Chía comercial mostró baja capacidad antioxidante, muy similar al comportamiento del AP. Esto podría sugerir que los compuestos antioxidantes de la chía se encuentran fuertemente adheridos a la matriz celular de la semilla, lo cual dificulta su extracción mediante procesos tradicionales de obtención de aceites de chía comerciales basados en el prensado.

**Tabla 15.**

Composición química proximal de la semilla de chía integra (SCI), la dieta estándar para roedores (DE) y la dieta estándar para roedores reformulada con semilla de chía (S-Chía).

Componente (g/100g)	SCI 1° lote	SCI 2° lote	DE 1° lote	DE 2° lote	S-Chía 1° lote	S-Chía 2° lote
Humedad	6.42 ± 0.21 <b>d</b>	7.07 ± 0.12 <b>c †</b>	8.91 ± 0.14 <b>a</b>	8.63 ± 0.12 <b>a</b>	6.22 ± 0.04 <b>d</b>	7.70 ± 0.21 <b>b †</b>
Cenizas	4.68 ± 0.19 <b>c</b>	4.79 ± 0.04 <b>c</b>	8.85 ± 0.15 <b>a</b>	8.41 ± 0.79 <b>ab</b>	8.23 ± 0.12 <b>ab</b>	7.73 ± 0.28 <b>b</b>
Proteína	18.80 ± 1.65 <b>b</b>	17.23 ± 0.07 <b>b</b>	23.09 ± 0.31 <b>a</b>	18.74 ± 0.13 <b>b †</b>	24.27 ± 0.11 <b>a</b>	18.66 ± 0.19 <b>b †</b>
Grasa	26.23 ± 3.06 <b>a</b>	25.09 ± 1.43 <b>a</b>	3.12 ± 0.05 <b>b</b>	2.17 ± 0.02 <b>b</b>	3.66 ± 0.01 <b>b</b>	2.04 ± 0.19 <b>b</b>
Fibra cruda	32.10 ± 2.86 <b>a</b>	25.60 ± 0.48 <b>b †</b>	5.82 ± 0.63 <b>c</b>	4.78 ± 0.17 <b>c</b>	7.41 ± 0.14 <b>c</b>	6.18 ± 0.12 <b>c</b>
Carbohidratos*	11.77 ± 3.27 <b>d</b>	20.22 ± 1.93 <b>c †</b>	50.19 ± 1.03 <b>b</b>	57.27 ± 1.22 <b>a †</b>	50.21 ± 0.25 <b>b</b>	57.69 ± 0.03 <b>a †</b>
Energía**	422.57 ± 20.24 <b>a</b>	426.80 ± 5.93 <b>a</b>	332.88 ± 1.27 <b>b</b>	333.14 ± 3.86 <b>b</b>	345.65 ± 0.44 <b>b</b>	336.13 ± 2.68 <b>b</b>

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar de ensayos realizados por triplicado. Medias con superíndices diferentes en la misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas. Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Abreviaturas: DE - Dieta Estándar; S-Chía - Alimento modificado con semilla de chía; SCI - Semilla de chía integra.

\*Calculados por diferencia al 100% de la suma del resto de componentes

\*\*Calculada por la sumatoria de kcal liberadas por los componentes energéticos

† diferencias estadísticas con el valor inmediato izquierdo (Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 16.**

Perfil de ácidos grasos de la semilla de chía integra (SCI), la dieta estándar (DE), la dieta reformulada con semilla de chía (S-Chía), y el aceite de chía (A-Chía).

	Nombre	SCI (%)	DE (%)	S-Chía (%)	A-Chía (%)
SCFA 6:0	Ácido caproico	-	0.04±0.00	-	-
MCFA 8:0	Ácido caprílico	-	0.41±0.00*	0.128±0.00	-
MCFA 10:0	Ácido cáprico	-	0.42±0.00*	0.122±0.00	-
MCFA 12:0	Ácido láurico	-	4.54±0.00*	1.18±0.000	-
SFA 14:0	Ácido mirístico	0.06±0.01 c	2.37±0.00 a	0.62±0.00 b	0.04±0.00 c
SFA 16:0	Ácido palmítico	6.88±0.11 c	16.15±0.00 a	9.66±0.05 b	6.60±0.27 c
SFA 17:0	Ácido margárico	0.18±0.00 a	0.10±0.00 c	0.06±0.00 d	0.14±0.01 b
SFA 18:0	Ácido esteárico	3.47±0.05 a	2.12±0.00 c	2.66±0.00 b	2.76±0.04 b
SFA 20:0	Ácido araquídico	0.25±0.02 b	0.35±0.00 a	0.26±0.01 b	0.17±0.01 c
MUFA Ω7 16:1	Ácido palmitoleico	0.07±0.01 c	0.34±0.00 a	0.13±0.00 b	-
MUFA Ω9 18:1	Ácido oleico	7.90±0.03 c	29.13±0.00 a	12.74±0.04 b	6.30±0.03 d
PUFA Ω6 18:2	Ácido linoleico (LA)	18.99±0.34 c	41.06±0.00 a	26.36±0.20 b	18.37±0.03 c
PUFA Ω3 18:3	Ácido linolénico (ALA)	62.19±0.23 b	2.96±0.00 d	46.01±0.12 c	65.82±0.08 a
	Ω-3 (ALA o ALA+DHA)	14.20±0.05 b	0.14±0.00 d	2.97±0.01 c	61.19±0.07 a
	Ω-6 (LA)	4.33±0.08 b	1.96±0.00 c	1.70±0.01 d	17.08±0.03 a
	Proporción Ω-6: Ω-3	0.31:1 b	14:1 d	0.57:1 c	0.28:1 a

\*Diferente de S-Chía (t de Student, IC95%). Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias estadísticas entre muestras (Tukey, 0.05).

Abreviaturas: MCFA (medium-chain fatty acid) ácido graso de cadena media; MUFA (monounsaturated fatty acid) ácido graso monoinsaturado; PUFA (polyunsaturated fatty acid) ácido graso poliinsaturado; SCFA (short-chain fatty acid) ácido graso de cadena corta; SFA (saturated fatty acid) ácido graso saturado.

**Tabla 17.**

Contenido fenólico total (FT), flavonoides (FLA) y capacidad antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP) de la semilla de chía integra (SCI), la dieta estándar para roedores (DE), la DE reformulada con chía (S-Chía), el aceite de chía (A-Chía), y el aceite de pescado (AP).

Componente	SCI	SCI ND	DE	DE ND	S-Chía	S-Chía ND	A-Chía	AP
<b>FT</b> (mg EAG/g)	5.46±0.04 <sup>c</sup>	4.93±0.10 <sup>d†</sup>	6.77±0.10 <sup>b</sup>	6.62±0.09 <sup>b</sup>	5.57±0.11 <sup>c</sup>	7.28±0.06 <sup>a†</sup>	0.17±0.01 <sup>e</sup>	0.25±0.02 <sup>e</sup>
<b>FLA</b> (µg EQ/g)	0.11±0.03 <sup>c</sup>	0.13±0.00 <sup>c</sup>	0.34±0.00 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.31±0.00 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>b†</sup>	0.03±0.00 <sup>d</sup>	0.02±0.00 <sup>d</sup>
<b>ABTS</b> (µg EAA/g)	13.09±2.50 <sup>b</sup>	11.00±0.31 <sup>bc</sup>	17.38±0.44 <sup>a</sup>	13.00±0.89 <sup>b†</sup>	12.38±0.80 <sup>b</sup>	8.63±2.05 <sup>c†</sup>	1.01±0.39 <sup>d</sup>	0.94±0.13 <sup>d</sup>
<b>ABTS</b> (µM ET/g)	4.30±1.20 <sup>bc</sup>	2.13±0.67 <sup>cd</sup>	4.23±0.97 <sup>bc</sup>	0.70±0.45 <sup>d†</sup>	5.05±0.60 <sup>b</sup>	9.25±1.80 <sup>a†</sup>	0.75±0.33 <sup>d</sup>	0.68±0.11 <sup>d</sup>
<b>DPPH</b> (µg EAA/g)	2.67±0.03 <sup>a</sup>	2.39±0.09 <sup>b†</sup>	1.94±0.06 <sup>c</sup>	1.46±0.06 <sup>d†</sup>	1.87±0.03 <sup>c</sup>	1.82±0.09 <sup>c</sup>	0.09±0.00 <sup>e</sup>	0.10±0.00 <sup>e</sup>
<b>DPPH</b> (µM ET/g)	13.10±0.48 <sup>a</sup>	10.59±0.09 <sup>b†</sup>	8.62±0.24 <sup>cd</sup>	8.20±0.36 <sup>de</sup>	8.89±0.03 <sup>c</sup>	7.92±0.09 <sup>e†</sup>	0.17±0.00 <sup>f</sup>	0.25±0.00 <sup>f</sup>
<b>FRAP</b> (mg EFe <sup>2+</sup> )	0.34±0.20 <sup>e</sup>	4.71±0.07 <sup>c†</sup>	2.04±0.05 <sup>d</sup>	10.21±0.02 <sup>a†</sup>	0.74±0.05 <sup>e</sup>	7.84±0.10 <sup>b†</sup>	4.30±0.32 <sup>c</sup>	4.64±0.37 <sup>c</sup>

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar de ensayos realizados por triplicado. Medias con letras diferentes en una misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, p<0.05).

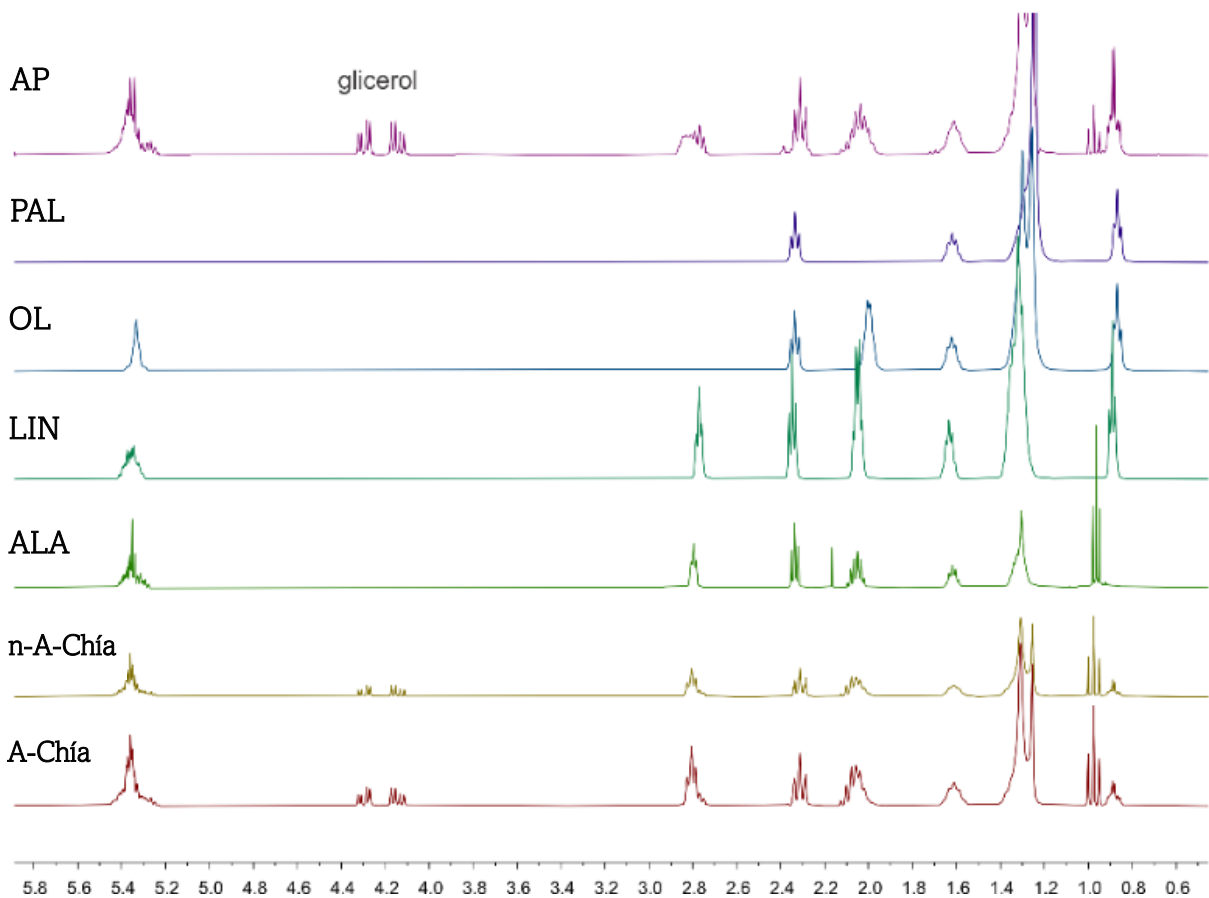
El símbolo “†” denota diferencias estadísticas con el valor inmediato izquierdo, es decir, con las muestras ND (Tukey, p<0.05).

Abreviaturas: DE - Dieta estándar; EAA - Equivalentes de ácido ascórbico; EAG - Equivalentes de ácido gálico; EFe<sup>2+</sup> - Equivalentes de hierro <sup>2+</sup>; ET - Equivalentes de Trolox; S-Chía - Dieta estándar reformulada con semilla de chía; ND - Muestras no desgrasadas; SCI - Semilla de chía integra; A-Chía - Aceite de chía; AP - Aceite de pescado.

### 6.1.3 Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón de hidrogeno de los aceites de pescado (AP) y chía se muestran en la **Figura 13**. La figura contiene los espectros del AP, y de estándares analíticos de ácido palmítico (PAL), oleico (OL), linoleico (LIN) y  $\alpha$ -linolénico (ALA); y los espectros de aceites de chía extraídos manualmente (n-A-Chía) y adquirido de forma comercial (A-Chía, empleado en este estudio). De izquierda a derecha, a 5.35 ppm se observa un multiplete correspondiente a los H de los carbonos olefínicos ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), implicados en los dobles enlaces de los alquenos, reflejando la presencia de ácidos grasos insaturados. Nótese que el estándar de ácido palmítico, por tratarse de un ácido graso saturado, carece de dicha señal. A 4.2 ppm se observa un doble doblete correspondiente a las señales de los hidrógenos de los grupos metileno de glicerilo ( $-\text{CH}_2\text{OCOR}$ ) del glicerol. Cada doblete refleja la presencia de uno de estos grupos. Nótese que dicha señal está ausente en los estándares, pero se hace presente en los aceites de pescado y chía, reflejando que los ácidos grasos que contienen dichos especímenes se encuentran en forma de triglicéridos. A 2.8 ppm se observa un multiplete correspondiente a las señales de los hidrógenos de los grupos bis-alílicos ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) presentes en las muestras, es decir, los hidrógenos unidos a átomos de carbono situados entre dos dobles enlaces. Nótese que dicha señal está ausente en el estándar de ácido palmítico y en el ácido oleico, debido a que se trata de ácidos grasos saturado y monoinsaturado, respectivamente. A 2.3 ppm se observa un triplete característico de las señales correspondientes a los hidrógenos que forman parte del grupo metileno  $\alpha$ -carbonílico en los ácidos grasos, es decir, el metileno adyacente al carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). la señal de los H de los carbonos 2 y 3 de los metilenos del DHA se encuentran en la región 2.325 y 2.425 (poco visibles en la imagen). Entre 2.0 y 2.2 ppm se observa un multiplete de los hidrógenos de los grupos metileno alílicos ( $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), es decir, aquellos H unidos a carbonos adyacentes a un doble enlace  $\text{C}=\text{C}$ . A 1.6 ppm se observa un multiplete la señal de los hidrógenos del grupo metileno  $\beta$ -carbonílico ( $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), es decir, el carbono adyacente al carbono del carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). A 1.3 se observa un multiplete de picos altos correspondiente a los grupos metileno de las cadenas alifáticas ( $-(\text{CH}_2)_n-$ ). El triplete a 0.997 ppm es característica del ALA y los omega-3, y corresponde al hidrogeno del grupo metilo terminal ( $-\text{CH}_3$ ). Nótese que la señal está ausente

en los estándares PAL, OL y LIN (**Figura 13**). En la región de 0.889 ppm se observa un multiplete correspondiente al H del grupo metilo terminal ( $-CH_3$ ) de los ácidos oleico, linoleico y saturados; es decir, el carbono omega 1 en el caso de los aceites insaturados. Nótese que la señal es menos intensa en los aceites de chía y está ausente en el estándar de ALA. La asignación del espectro de los aceites de chía (Souza et al., 2017) y pescado (Igarashi et al., 2000; Lv et al., 2020) es consistente con lo reportado por otros autores.



**Figura 13.** Espectros de resonancia magnética nuclear del aceite de pescado (AP), aceite de chía natural (n-A-Chía), aceite de chía comercial (A-Chía), y estándares analíticos de ácido palmítico (PAL), ácido oleico (OL), ácido linoleico (LIN), y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA).

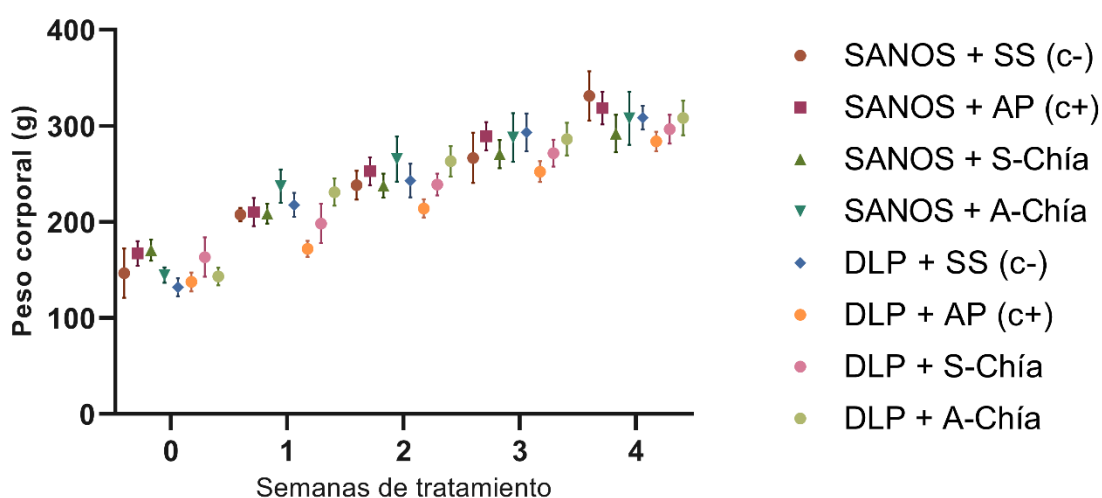
## 6.2 Estudio en animales

### 6.2.1 Efecto de la suplementación sobre la dislipidemia

#### 6.2.1.1 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre el peso corporal

La **Figura 14** muestra el efecto de la suplementación con dieta estándar para roedores y solución salina (DE + SS, control -), aceite de pescado (DE + AP, control +), alimento reformulado con semilla de chía (S-Chía) y aceite de chía (DE + A-Chía), sobre el peso corporal durante 4 semanas de tratamiento. En general no se observaron diferencias entre el peso corporal de los grupos sanos e inducidos con DLP. Al inicio del experimento (semana cero), la media del peso corporal entre los grupos sanos fue de 157.33 g. El grupo SANOS + A-Chía exhibió el menor peso corporal inicial ( $144.67 \pm 8.09$  g), y el grupo SANOS + S-Chía, el mayor ( $170.67 \pm 10.93$  g). Por otro lado, la media general de peso en los grupos con DLP fue de 144.06 g, siendo el grupo DLP + S-Chía ( $163.38 \pm 20.49$  g) el de mayor peso inicial y el grupo DLP + SS el menor ( $132.00 \pm 9.30$  g). Al final del tratamiento (semana 4), la media general de peso corporal en los grupos sanos fue de 312.47 g y la de los grupos con DLP de 399.38 g. Debido a que en los estudios con modelos animales resulta complicado normalizar la edad de todos los animales de experimentación; y teniendo en cuenta que los roedores se encontraban en una etapa de crecimiento acelerado (5-6 semanas) al inicio del estudio, el promedio de edad inicial se mostró diferente (aunque no significativo) entre los grupos sanos y con DLP. Por ello, para evaluar de mejor manera las diferencias en el peso de los animales a lo largo del estudio, y a fin poder evidenciar la ganancia de grasa corporal que obstruyera el enfoque del presente estudio, se procedió a calcular el porcentaje de cambio de peso de los animales en la semana 4 con respecto al peso inicial. De este modo, el porcentaje de cambio de peso para cada uno de los grupos experimentales fue el siguiente: SANOS + SS: 125.82 %, SANOS + AP: 90.44 %, SANOS + S-Chía: 71.09 %, SANOS + A-Chía: 112.90 %, DLP + SS: 133.81 %, DLP + AP: 106.27 %, DLP + S-Chía: 81.56 %, DLP + A-Chía: 115.27 %, MASH + SS: 94.35 %, MASH + AP: 115.23 %, MASH + S-Chía: 99.07 %, MASH + A-Chía: 106.90 %. El porcentaje de cambio de peso permite observar que los animales tuvieron un cambio de peso (con respecto al peso inicial) cercano al 100% tanto en los grupos sanos como en los grupos inducidos con DLP. Tomando en cuenta tanto estos datos como el hecho de que la dieta proporcionada a

todos los animales fue una dieta equilibrada que evita la ganancia de peso, y que la suplementación con los aceites o semilla de chía no elevó considerablemente el aporte calórico de las dietas experimentales (**Tabla 15**), estos resultados permiten concluir que la suplementación con aceite de pescado, aceite de chía o semilla de chía, ni la inducción aguda de DLP *per se* influyeron en la ganancia de peso corporal, indicando que todos los animales de los grupos experimentales mantuvieron un peso normal durante todo el estudio, aspecto de gran relevancia en este estudio cuyo objetivo es el estudio de la DLP y la MASH en ratas normopeso.

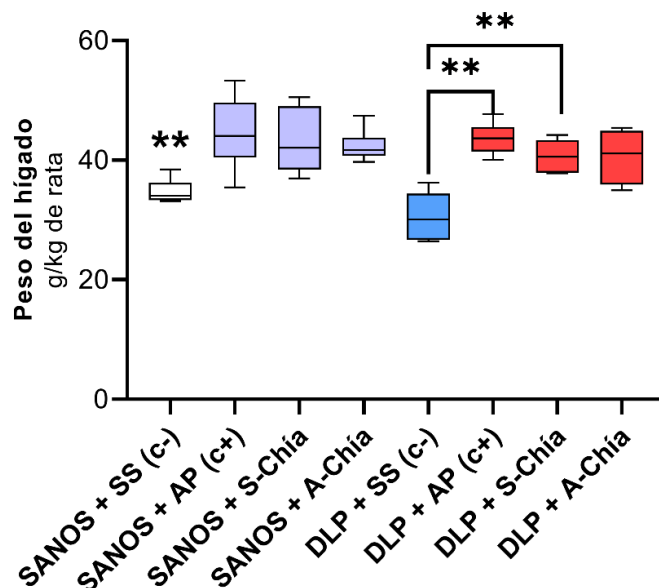


**Figura 14.** Peso corporal de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

### 6.2.1.2 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre el peso del hígado

El peso del hígado puede ser un indicador importante de la presencia de grasa hepática (esteatosis) tanto en DLP como en MASH. En este estudio inmediatamente después de la eutanasia, el hígado fue extraído, doblemente lavado en solución salina, secado y pesado en una balanza analítica. La **Figura 15** muestra los resultados concernientes al peso del hígado de los grupos sanos y con DLP. El peso del hígado se expresa como gramos por kilogramo del peso final de los roedores. A pesar de la acumulación de lípidos en el plasma de los animales (datos mostrados más adelante), la inducción de DLP no ocasionó un incremento significativo ( $p > 0.05$ ) en el peso del hígado en ninguno de los grupos de ratas. Asimismo, el

tratamiento con S-Chía o A-Chía no influyó en el peso del hígado en los animales sanos ni con DLP. Moreira et al. (2022) tampoco observaron diferencias en el peso del hígado de ratas Wistar suplementadas con S-Chía y A-Chía; y, de manera similar a lo observado en este estudio (entre 12-15 g dependiendo la edad), los autores reportaron pesos promedio del hígado cercanos a los 15 g.



**Figura 15.** Peso del hígado (g/kg de peso) de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

Estos resultados, en conjunto con el análisis histológico (mostrado más adelante), demostraron que, a pesar de estar fisiopatológicamente relacionadas, la DLP inducida por la administración de tiloxapol en dosis única no fue capaz de ocasionar esteatosis hepática en ratas normopeso. Esto puede deberse a diversas razones. En primer lugar, aunque la inyección intraperitoneal en roedores de experimentación es una de las vías de administración preferidas por los investigadores debido a que permite la rápida absorción de grandes volúmenes de reactivos o fármacos (Lambert et al., 2017), el protocolo de inducción de DLP requiere la administración i.p. de tiloxapol en dosis única, ya que la administración i.p. en forma repetida está contraindicada tanto por la alta probabilidad de perforar órganos peritoneales o vasos sanguíneos que causen sufrimiento innecesario al animal, como por la gran cantidad de efectos secundarios reportados en respuesta tanto a los excipientes como

a los compuestos a evaluar (“Intraperitoneal Drug Administration,” 1994). Por otro lado, debido a que la absorción de sustancias administradas i.p. ocurre por la vasculatura mesentérico-portal, la vasculatura mesentérico-extraportal y extramesentérica, y los vasos linfáticos, una parte de los compuestos administrados se eliminan parcialmente por el efecto de primer paso hepático, disminuyendo la potencia y la eficacia de estos (“Intraperitoneal Drug Administration,” 1994).

### *6.2.1.3 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre la glucosa y el perfil lipídico*

Los niveles plasmáticos de glucosa, lípidos totales (LT), colesterol total (CT), triglicéridos (TGs), LDL y HDL de las ratas sanas y con DLP suplementadas con SS (c-), AP (c+), S-Chía o A-Chía se muestran en la **Figura 16**. Los grupos de ratas sanas mostraron valores normales de glucosa sanguínea (cerca de 200 mg/dL), sin evidencia de diferencias drásticas entre ellos. Únicamente el grupo SANAS + AP mostró niveles de glucosa plasmática estadísticamente menores ( $p < 0.05$ ) al resto de los grupos de ratas sanas (147.13 mg/dL). Dicha diferencia podría explicarse por los efectos reportados del AP sobre el metabolismo de la glucosa y la mejora de la sensibilidad a la insulina (D’Alessandro et al., 2002). Por otro lado, la administración de tiloxapol elevó significativamente los niveles de glucosa plasmática en AP y A-Chía, mostrando A-Chía niveles de glucemia estadísticamente mayores ( $p < 0.05$ ) al grupo AP (265.41 y 211.64 mg/dL, respectivamente) (**Figura 16A**).

La elevación de los niveles séricos de glucosa tras la administración i.p. de tiloxapol ya se ha reportado por otros investigadores (Kachalov et al., 2024). Asimismo, otros autores han observado resultados similares en estudios con S-Chía y A-Chía. Por ejemplo, de Miranda et al. (2019) no encontraron mejoría en el metabolismo de la glucosa tras la suplementación de 3% de harina de chía durante 16 semanas en un modelo hiperlipidémico de ratones. Los autores observaron incrementos en el área bajo la curva en la prueba de tolerancia oral a la glucosa en los grupos hiperlipidémicos e incluso en los grupos sanos. Las elevaciones en la glucosa se atribuyen entre otras cosas a la aparición de moléculas inflamatorias ocasionada por el incremento de lípidos circulantes, lo cual pone al cuerpo de los animales en un estado de resistencia a la insulina. Además, un exceso en la producción de radicales libres a causa del incremento de lípidos circulantes pudo disminuir la secreción de insulina por las células

$\beta$  del páncreas y, al mismo tiempo, obstruir la señalización de la insulina en los tejidos dependientes de ella, incluido el hígado (Giacco & Brownlee, 2010). Esta premisa es consistente con los resultados observados hasta el momento en este trabajo, ya que los mayores niveles de lípidos se observaron en AP y A-Chía, y estos dos grupos son los que mostraron los niveles estadísticamente mayores de glucosa de entre todos los demás grupos. De igual manera, la disminución en la actividad de la catalasa se ha relacionado con intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en modelos de ratones knockout (Piao et al., 2017). Por otro lado, Enes et al. (2020) sugieren que la cantidad de ALA de la variedad de chía utilizada, así como la cantidad de ALA en la dieta de los roedores, podría ser un factor determinante en los niveles de glucosa observados, ya que el ALA es capaz de modular el metabolismo de la glucosa mediante la regulación a la alta de la vía PI3K/AKT. En contraste, otros autores han encontrado resultados discordantes con lo observado en este trabajo. Moreira et al. (2022) notaron mejoría de la glucosa sanguínea tras la suplementación de ratas Wistar con cantidades de S-Chía y A-Chía similares a las empleadas en este estudio; sin embargo, el modelo empleado por estos autores fue un modelo de hígado graso inducido por dieta alta en grasa y alta en fructosa y no propiamente un modelo de DLP inducida por tiloxapol, lo cual podría explicar las discrepancias observadas.

Por otro lado, los grupos de ratas sanas (barras azules del gráfico) exhibieron valores bajos y normales en los niveles de lípidos totales (**Figura 16B**), TGs (**Figura 16C**), y colesterol total (**Figura 16D**) y, en general, no se observaron diferencias importantes entre ellos. Por otro lado, las ratas tratadas con tiloxapol durante 24 h (barras rojas del gráfico) desarrollaron DLP en forma de hiperlipidemia (HLP), hipertrigliceridemia (HTG) e hipercolesterolemia (HCA) combinadas, independientemente de la suplementación con AP, S-Chía o A-Chía. Huynh et al. (2024) observaron el mismo patrón de lípidos en un modelo de DLP inducida por dosis única de tiloxapol (400 mg/kg i.p.) en ratones albinos. Es decir, elevaciones de CT, TGs y LDL de aproximadamente 5-15 veces con respecto al grupo control tras la inyección i.p. de tiloxapol. Ham et al. (2009) y Heck et al. (2020) igualmente reportaron patrones de DLP inducida por tiloxapol similar al de este estudio, con aumentos de alrededor de 10 veces los

niveles de TGs y de aproximadamente 5 veces los niveles de colesterol total en los grupos control con DLP.

Los grupos sanos mostraron niveles bajos y normales de colesterol total (cerca de 60 mg/dL); y la inducción de DLP incrementó significativamente sus niveles en todos los grupos (**Figura 16D**); sin embargo, S-Chía y A-Chía mitigaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la elevación del colesterol total. La semilla de chía contiene un tipo de fibra insoluble especial conocida como lignina de Klason, la cual se cree que es responsable en gran medida de los efectos hipocolesterolemiantes de esta semilla (de Falco et al., 2017).

Por otra parte, los niveles más altos de TGs se observaron en el grupo DLP + SS. Sorpresivamente el grupo DLP + AP superó los niveles de lípidos y colesterol totales del grupo suplementado con SS. No obstante, aunque gráficamente los niveles de lípidos en DLP + AP se mostraron superiores a DLP + SS, estadísticamente no se encontraron diferencias entre ellos ( $p > 0.05$ ). Curiosamente, los niveles de LT y TGs en los grupos con DLP suplementados con A-Chía y AP fueron elevados, sugiriendo que la administración de aceites puros, aunque estos sean ricos en ácidos grasos esenciales, no es una estrategia óptima para contrarrestar la DLP inducida por tiloxapol a corto plazo, ya que puede exacerbarla.

Si se contemplan únicamente los efectos benéficos del omega-3 (López Farré & Macaya, 2006) (abundante en el aceite de pescado y en la semilla de chía) sobre el metabolismo lipídico, esto puede parecer contradictorio en primera instancia; sin embargo, al examinar los mecanismos que sigue el tiloxapol para inducir DLP, este fenómeno puede ser explicado lógicamente. El tiloxapol es un surfactante no iónico que se ha utilizado desde hace tiempo para inducir DLP en modelos experimentales (Abdou et al., 2018). La evidencia indica que el tiloxapol puede rodear las lipoproteínas que llevan lípidos desde el hígado hacia los tejidos periféricos, impidiendo la utilización de los lípidos que acarrean en su interior por los tejidos que expresan lipoproteína lipasas (LPL). Igualmente, se sabe que el tiloxapol actúa directamente sobre las enzimas lipolíticas, como la LPL y la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) (Rasouli et al., 2016), impidiéndoles realizar su actividad biocatalítica de hidrólisis de los lípidos contenidos en las lipoproteínas. De esta manera, debido a que 1) el tiloxapol actúa sobre las LPL y no sobre enzimas de  $\beta$ -oxidación (Abdou et al., 2018); y 2)

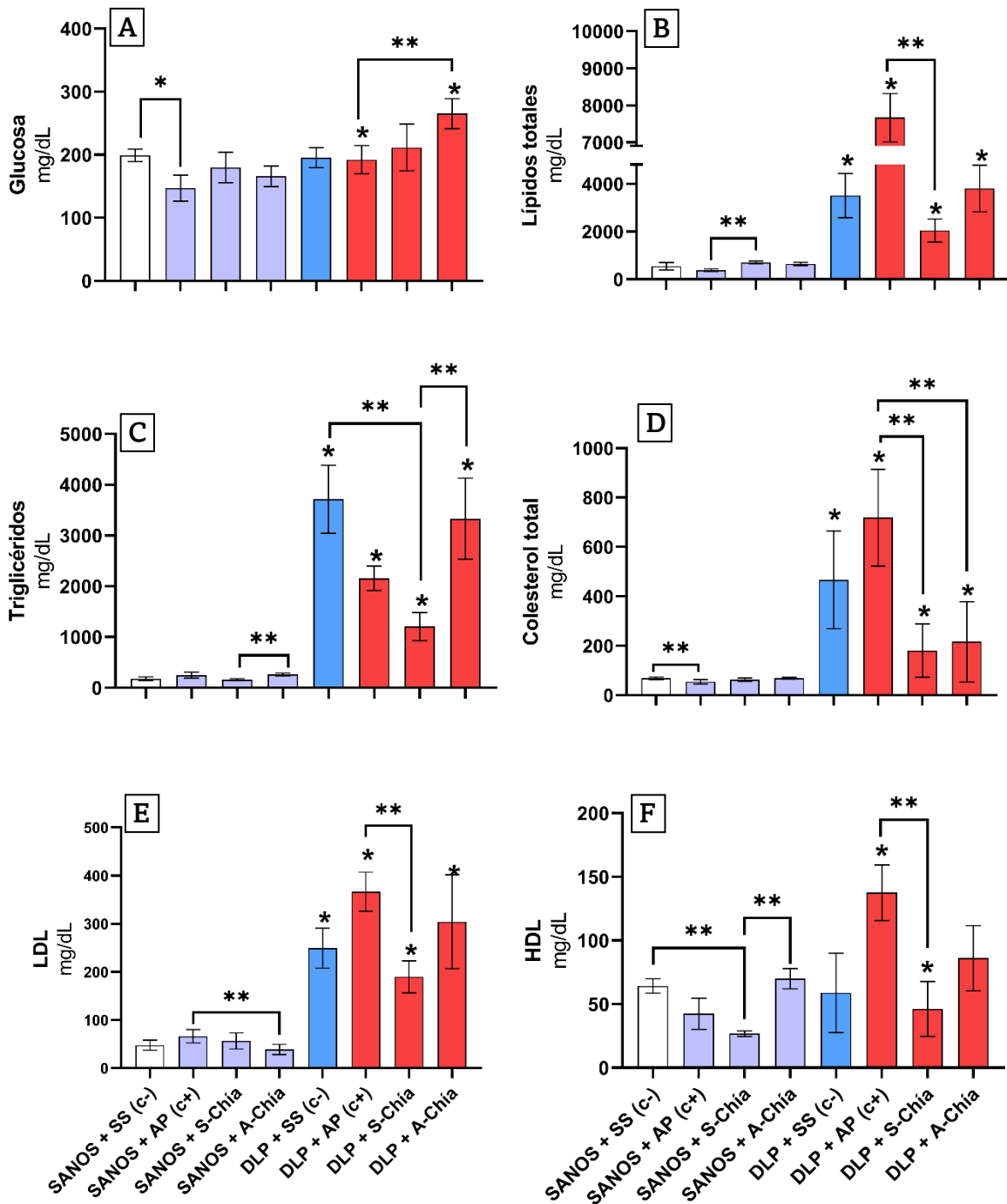
las enzimas que metabolizan omega-3 y otros ácidos grasos insaturados (como omega-6 o 9 abundantes en los aceites comestibles) son las mismas (Bartlett & Eaton, 2004; López Farré & Macaya, 2006; Schreurs et al., 2010), cualquier exceso de ácidos grasos, sin importar su naturaleza mono- o polinsaturada, o su grado de esencialidad, puede traducirse en una acumulación de TGs en plasma. Además, uno de los principales mecanismos por los cuales los ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA en AP y ALA en A-Chía) mejoran la HTG es la inhibición de ApoC-III, un inhibidor natural de LPL expresada en VLDL, HDL y quilomicrones (Shearer et al., 2012). En la HTG experimental inducida por tiloxapol, el AP no puede ejercer dicho mecanismo debido a que LPL se encuentra bloqueada directamente por tiloxapol, no por ApoC-III, como suele ocurrir de forma natural en procesos patológicos. Esto ocasionó que la presencia de AP y A-Chía fuera intrascendente en el modelo experimental e incluso contribuyera a la HTG, explicando el comportamiento idéntico de AP y A-Chía en los grupos con DLP, y el comportamiento diferencial de S-Chía.

S-Chía logró atenuar la acumulación de lípidos plasmáticos ocasionada por el tiloxapol más eficientemente que A-Chía y AP, siendo esta disminución estadísticamente significativa entre S-Chía y AP en los niveles de LT (2042.41 y 7665.32 mg/dL, respectivamente) y CT (180.74 y 718.83 mg/dL, respectivamente); y entre S-Chía y SS en los niveles de TGs (1207.26 y 3715.32 mg/dL, respectivamente). La S-Chía posee un alto contenido de fibra soluble e insoluble capaz de reprimir parcialmente la absorción de los aceites suplementados a lo largo del periodo de experimentación. Esta absorción significativamente reducida ( $p < 0.05$ ) de TGs (en los grupos sanos suplementados con S-Chía) observada únicamente en S-Chía (**Figura 16C**) visiblemente evitó la drástica elevación de TGs cuando la clarificación de LDL fue bloqueada por el tiloxapol. Estos resultados fueron consistentes con los resultados reportados por Oliva et al. (2013), quienes observaron disminución de los niveles de TGs en ratas inducidas con DLP tras la suplementación con semilla de chía durante 3 meses. A diferencia de los efectos moderados observados en este estudio, los autores observaron reversión completa de la HTG; sin embargo, los autores sustituyeron 36.2% de la dieta con S-Chía, y el periodo de suplementación fue superior al nuestro. Teniendo en cuenta la cantidad de S-Chía suplementada (el doble que en este estudio) y el

tiempo de suplementación (el triple que en este estudio), estas observaciones podrían sugerir que los efectos de la S-Chía sobre la DLP son proporcionales y dependientes de la cantidad de semilla empleada.

Con respecto a los niveles de LDL no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los grupos sanos, sin embargo, la inducción de DLP incrementó significativamente los niveles de LDL en todos los tratamientos (**Figura 16E**). Aun así, la S-Chía logró atenuar significativamente el incremento de LDL causado por el tiloxapol e igualmente SS, AP y A-Chía, no mostraron un efecto atenuante importante de las LDL en DLP.

Por otra parte, el grupo suplementado con S-Chía en los grupos sanos mostró los niveles estadísticamente más bajos de HDL que el resto de los grupos. Finalmente, la suplementación con AP y S-Chía incrementó significativamente los niveles de HDL en DLP mientras que los grupos SS (c-) y A-Chía se mantuvieron sin cambios (**Figura 16F**). El incremento concomitante de LDL y HDL fue consistente con lo reportado por Askin & Umudum (2024), quienes observaron elevación de lípidos plasmáticos incluidas las HDL después de la inyección i.p. de 400 mg/kg de tiloxapol en un modelo de hiperlipidemia en ratas. El incremento de HDL tras la suplementación con AP ha sido observado en estudios anteriores (Nishimoto et al., 2009). Por otro lado, el incremento conjunto de LDL y HDL después de la inducción de DLP experimental podría deberse a que el metabolismo de las LDL y el transporte reverso del colesterol (RCT) están estrechamente relacionados. Durante el trayecto de las HDL hacia el hígado, las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (Apo-B), como VLDL, IDL y LDL, transfieren parte de sus triglicéridos a las HDL, al mismo tiempo que las HDL les transfieren ésteres de colesterol (CE), en un proceso mediado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (Askin & Umudum, 2024). De este modo, incrementos en el flujo de partículas LDL podrían condicionar el aumento compensatorio de las HDL tanto en modelos experimentales como en procesos patológicos normales.



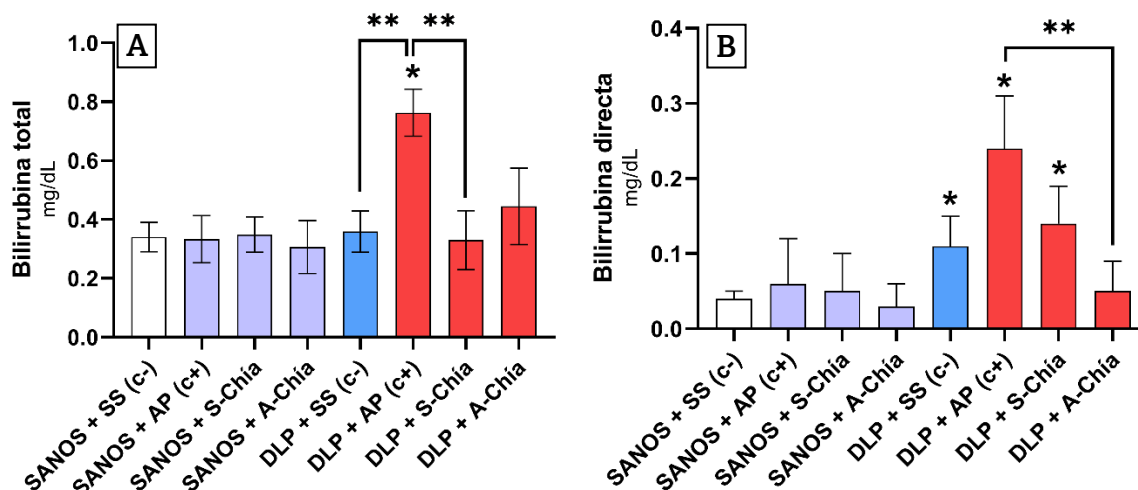
**Figura 16.** Niveles plasmáticos de glucosa (A) lípidos totales (B) triglicéridos (C) colesterol total (D) LDL (E) y HDL (F) de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

#### *6.2.1.4 Efecto de la semilla y el aceite de chía sobre marcadores de funcionalidad hepática*

Se ha reportado que, dependiendo del modelo empleado, el tilioxapol es capaz de inducir daño oxidativo celular, inhibición de vías de neurotransmisión y ocasionar cambios tisulares importantes (Abdou et al., 2018). Asimismo, debido a que el hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo lipídico, se deseaba conocer si la suplementación con altas dosis de aceites comestibles podría tener implicaciones patológicas sobre el funcionamiento hepático de los roedores. Debido a ello, en este estudio se evaluaron tanto los efectos de la suplementación sobre la DLP como los efectos sobre marcadores de daño y funcionalidad hepática. Se seleccionaron diferentes marcadores para evidenciar aspectos particulares del funcionamiento y el daño hepático en términos de colestasis, necrosis celular, estrés fisiológico y daño oxidativo.

#### **Colestasis – Bilirrubina, fosfatasa alcalina, gama-glutamil transpeptidasa**

La bilirrubina es un pigmento derivado del catabolismo del grupo hemo de las hemoproteínas por la enzima hemooxigenasa (HO), la cual libera biliverdina, monóxido de carbono y hierro; y este proceso ocurre casi por completo en el bazo. Después, la enzima biliverdina reductasa (BVR) transforma la biliverdina en bilirrubina indirecta (BI) o no conjugada (BNC), la cual se libera del bazo hacia la sangre donde se une con albumina para volverse hidrosoluble y poder viajar a otros tejidos incluyendo el hígado. En el hígado, la bilirrubina se conjuga con ácido glucurónico (bilirrubina conjugada, BC) para ser excretada hacia la vesícula biliar, la cual la liberará en el intestino a través del colédoco y la ampolla de Vater para ayudar en los procesos digestivos. Ahí, la microbiota intestinal descompone parte de la bilis en urobilinoídes, los cuales son responsables del color de las heces (Hinds & Stec, 2018). La **Figura 17** muestra los niveles de bilirrubina total (BT) y bilirrubina directa (BD) o conjugada (BC) de ratas sanas y con DLP suplementadas con SS, AP, S-Chía y A-Chía. En general, no se observaron incrementos en los niveles de BT entre los grupos inducidos con DLP y sus controles sanos, los cuales oscilaron entre 0.3 y 0.4 mg/dL. Únicamente el grupo suplementado con AP (DLP + AP) mostró una elevación significativamente diferente ( $0.76 \pm 0.08$  mg/dL,  $p < 0.05$ ) a los grupos SS y S-Chía, pero igual a A-Chía. Por el contrario, la inducción de DLP sí ocasionó un incremento significativo en los niveles de BD de todos los tratamientos excepto en A-Chía.



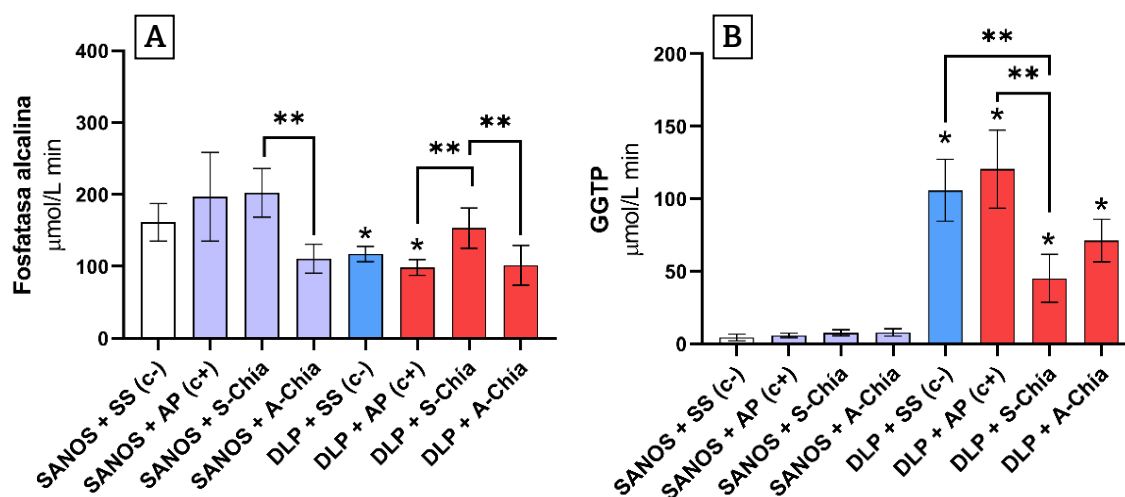
**Figura 17.** Niveles plasmáticos de bilirrubina total (A) y bilirrubina directa (B) de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

Normalmente, cuando las elevaciones en los niveles de bilirrubina en sangre (hiperbilirrubinemia) se acompañan de incrementos en los niveles de las enzimas de colestasis (FA y GGTP) pueden reflejar desordenes pre hepáticos, hepáticos y/o post hepáticos. En este caso, únicamente se observó incremento en los niveles de BD e incremento en GGTP, pero no en FA, en los grupos con DLP (**Figura 18**). Según Guerra Ruiz et al. (2021), las elevaciones de BC sugieren que la excreción canalicular podría estar afectada, aun cuando los procesos de captación y conjugación de bilirrubina funcionen adecuadamente, indicando la presencia de trastornos de los conductos biliares como la colangitis esclerosante; sin embargo, teniendo en cuenta 1) el patrón de alteraciones bioquímicas concurrentes; 2) los hallazgos histológicos (mostrados más adelante) que no sugieren daño hepático importante; 3) que la bilirrubina no es un marcador sensible ni específico de la función hepática; y 4) que no se ha reportado que el tiloxapol (en dosis única) o los aceites de pescado y chía o la semilla de chía en si causen daños al hígado, se puede concluir que dicha observación es solo un hallazgo clínico y no es suficiente para establecer que cualquiera de los tratamientos ocasionó daños hepatobiliares.

Por último, a pesar de que la elevación plasmática de la bilirrubina se ha relacionado con enfermedades hepatobiliares y la aparición de ictericia, recientemente se ha correlacionado a la BNC con efectos protectores a nivel cardiovascular y metabólico debido a su potente

capacidad antioxidante, y a que su similitud química con el fenofibrato le confiere propiedades como ligando de PPAR- $\alpha$  (Hinds & Stec, 2018), un receptor nuclear que incrementa la oxidación de ácidos grasos (Estefes-Duarte et al., 2024), previniendo de la DLP y la esteatosis hepática (Han et al., 2017b). Aunque en este trabajo no se determinó directamente la BNC, es posible determinarla indirectamente como BT-BD. Así, los mayores niveles de BNC se observan en los grupos suplementados con aceites DLP + AP (0.52 mg/dL) y DLP + A-Chía (0.39 mg/dL), lo que sugiere una posible protección indirecta contra el estrés oxidativo y el almacenamiento de lípidos.

La fosfatasa alcalina (FA) y la gama-glutamil transpeptidasa o gama-glutamil transferasa (GGTP) son dos enzimas altamente expresadas en el tejido hepático cuya elevación plasmática se considera un marcador importante de colestasis (Guerra Ruiz et al., 2021). La **Figura 18** muestra los niveles sanguíneos de FA y GGTP en los grupos experimentales.



**Figura 18.** Actividad de las enzimas fosfatasa alcalina (A) y gamma-glutamil transferasa (B) de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

Los niveles de FA tras la inducción de DLP no sufrieron elevaciones en ninguno de los tratamientos; por el contrario, se observó una disminución significativa en el grupo control DLP + SS y DLP + AP. Ni S-Chía ni A-Chía disminuyeron los niveles de FA, sin embargo, debido a que la FA es una enzima que también posee elevada actividad en tejidos

extrahepáticos como el hígado o el riñón (U. Sharma et al., 2014), las fluctuaciones de esta enzima que no son consistentes con el patrón de comportamiento de otros biomarcadores hepáticos no se consideran determinantes para establecer el daño hepático (Fernandez & Kidney, 2007; U. Sharma et al., 2014).

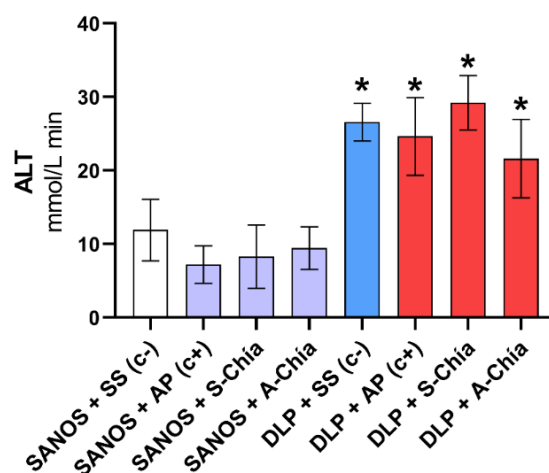
Por otro lado, mientras que en los grupos sanos no se observaron diferencias estadísticas, la actividad de GGTP mostró una tendencia clara a la elevación tras la inducción de DLP en todos los tratamientos (**Figura 18**). Tanto S-Chía como A-Chía previnieron significativamente ( $p < 0.05$ ) la elevación de GGTP ocasionada por el tiloxapol, y, en el caso de S-Chía, el efecto atenuante fue mucho más sobresaliente, probablemente debido a una mayor riqueza y variedad de nutrientes hepatoprotectores. Jamshed & Gilani (2014) consistentemente observaron mitigación de la elevación de GGTP en un modelo animal de DLP inducida por tiloxapol y suplementado con almendras, sugiriendo un efecto hepatoprotector derivado de la presencia de nutrientes esenciales como los ácidos grasos insaturados, la fibra, las proteínas, y compuestos bioactivos lipofílicos también presentes abundantemente en S-Chía.

#### **Necrosis – Alanina aminotransferasa**

La alanina aminotransferasa (ALT) es una enzima citosólica con presencia en intestino, cerebro, próstata, músculos, tejido adiposo y, en mucho mayor concentración, en las células hepáticas (Z. Liu et al., 2014). Cuando se produce una lesión hepática, la ALT sale de los hepatocitos, ocasionando incrementos de esta enzima en el plasma sanguíneo. La **Figura 19** muestra la actividad de la enzima ALT de los grupos sanos y con DLP suplementados con SS (c-), AP (c+), S-Chía y A-Chía. La inducción de DLP con tiloxapol ocasionó incremento significativo de aproximadamente 3 veces los niveles normales de ALT. Aunque en los grupos con DLP el A-Chía mostró los niveles más bajos de ALT comparado con SS, AP y S-Chía, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

Heck et al. (2020) reportaron daño hepático leve medido como la elevación plasmática de las transaminasas ALT y aspartato aminotransferasa (AST) tras la inducción de DLP con una dosis única de tiloxapol igual a la empleada en este estudio (400 mg/kg, i.p.), y, en concordancia con los resultados de esta investigación, los autores observaron incrementos

plasmáticos de ALT de aproximadamente 4 veces los valores del control. Asimismo, Anandhi et al. (2013) reportaron incrementos de ALT de aproximadamente 2 veces el valor del control sano. La elevación de ALT causada por el tiloxapol podría estar en parte relacionada con sus propiedades lisosomotrópicas, es decir, la capacidad de acumularse dentro de los lisosomas celulares, misma que le confiere propiedades terapéuticas en dosis más bajas. Esto aunado al hecho de que los hepatocitos poseen gran actividad lisosomotrópica se cree que contribuye al fenómeno de lipotoxicidad en el hígado (Heck et al., 2020). Desafortunadamente, las dosis de S-Chía y A-Chía empleadas en este estudio no lograron evitar la elevación de ALT.

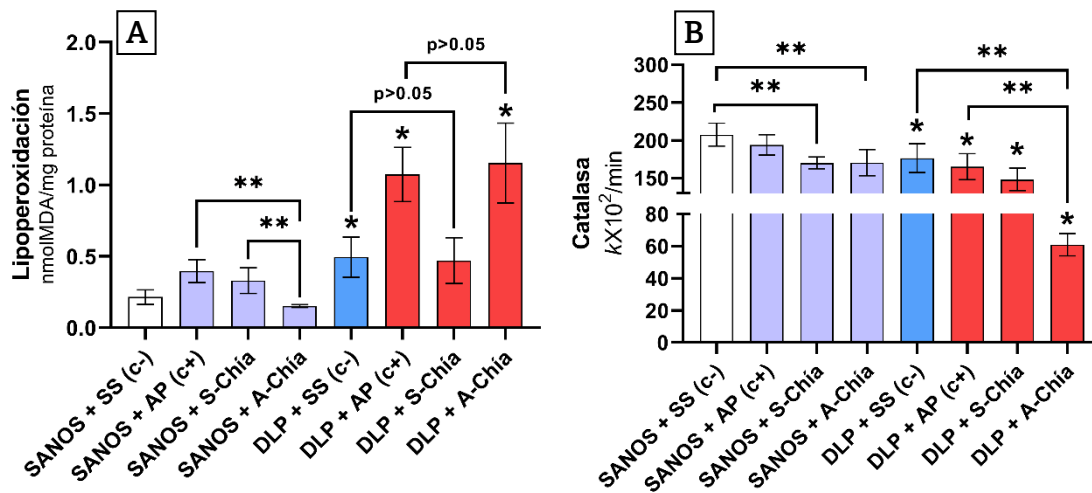


**Figura 19.** Actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

### Estrés oxidativo – Lipoperoxidación y catalasa

El nivel de lipoperoxidación (LPX), medido como la liberación de malondialdehído (MDA) por el tejido hepático, así como la actividad de la enzima catalasa (CAT) de los grupos experimentales se encuentran en la **Figura 20**. Los grupos sanos mostraron niveles bajos de lipoperoxidación ( $< 0.5$  nmol de MDA/mg de proteína) y sin diferencias importantes (aunque significativas) entre ellos; sin embargo, la inducción de DLP ocasionó incrementos significativos en AP y A-Chía. S-Chía evitó por completo la elevación del nivel de peroxidación hepática, lo cual es consistente con la alta capacidad antioxidante que mostró la semilla en el análisis químico (**Tabla 17**). El incremento en los niveles de LPX tras la

inyección de tiloxapol pueden atribuirse a que 1) el tiloxapol incrementa la respiración mitocondrial, propiciando una sobreproducción de radicales libres (Anandhi et al., 2013); 2) el tiloxapol regula a la baja la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos por múltiples mecanismos, incluyendo el daño al DNA (Abdou et al., 2018; de Sousa et al., 2017). Asimismo, debe destacarse que la elevación de MDA en el tejido hepático de los grupos AP y A-Chía es consistente con la elevación de lípidos plasmáticos en estos grupos. Es posible que la gran cantidad de lípidos plasmáticos derivados de la inducción de DLP en los grupos DLP + AP y DLP + A-Chía ocasionara cierto grado de estrés agudo en los hepatocitos, desencadenando vías inflamatorias mediadas por el ácido araquidónico (ARA). Teniendo en cuenta que el MDA es un subproducto volátil de la oxigenación enzimática del ácido araquidónico y no solo un producto final de la degradación oxidativa de lípidos de membrana (Janero, 1990), resulta posible que la elevación del grado de LPX (MDA) observada en este estudio sea un reflejo temprano de la activación de las cascadas inflamatorias. Por último, Aitken et al. (2006) sugieren que existen rutas alternas de producción de ROS que involucran al ácido linoleico (presente en mayor cantidad en A-Chía) e incluso al DHA (abundante en AP), y que empeoran la LPX.



**Figura 20.** Niveles hepáticos de lipoperoxidación (A) y actividad hepática de la catalasa (B) de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

Grujić-Milanović et al. (2021) observaron elevaciones dramáticas en los niveles de LPX en un grupo de ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa (HFD) y suplementadas con aceite de soja con respecto al grupo control. Curiosamente dichas elevaciones fueron similares a las observadas en el grupo suplementado con lardo de cerdo, cuya composición de ácidos grasos es predominantemente saturada. Aunado a la elevación de LPX, los autores observaron incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en el hígado como IL-6 y pentraxina 3 (PTX-3), una proteína de fase aguda inducible por TNF, concluyendo que, a nivel hepático, el consumo excesivo de lípidos vegetales insaturados puede ser incluso más lipoperoxidante e inflamogénico que las grasas saturadas. Las elevaciones en los niveles de MDA observados en AP y A-Chía también fueron consistentes con lo observado por Garrel et al. (2012), quienes observaron incrementos sustanciales en los niveles hepáticos de MDA tras la suplementación de ratas con 200 mg/100g de dieta de ALA o 500 mg/100g de dieta de EPA+DHA, mismos que disminuyeron al reducir las dosis de ALA a 20 mg/100g de dieta, confirmando que la suplementación excesiva eventualmente puede conducir al incremento del estrés oxidativo hepático y la aparición de procesos oxidativos en cadena.

La inducción de DLP con tiloxapol disminuyó ligera pero significativamente la actividad de CAT en todos los grupos (**Figura 20B**). A-Chía mostró los niveles más bajos de CAT tras la inducción de DLP, lo cual es consistente con la elevación de LPX en el mismo grupo. Abdou et al. (2018) sostienen que el tiloxapol causa descenso en la actividad de CAT debido al incremento de ROS y/o a la alteración en el sistema antioxidante endógeno. Igualmente, se ha demostrado que el tiloxapol daña el material genético en distintos órganos incluido el hígado (de Sousa et al., 2017), pudiendo ocasionar disminución en la transcripción y expresión de enzimas antioxidantes incluida CAT.

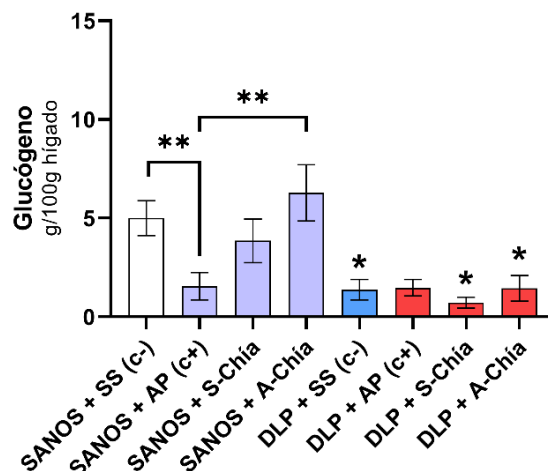
Por otra parte, para entender el comportamiento de CAT en este experimento, primeramente, se tiene que hacer una aproximación al mecanismo catalítico de la CAT desde una perspectiva cinética. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno y lo convierte en agua y oxígeno molecular (Abdou et al., 2018). En primera instancia, en organismos saludables se esperaría que un incremento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevara la actividad de CAT para neutralizar a dicho radical. Sin embargo, una

producción excesiva y repentina de  $H_2O_2$  podría ocasionar la inactivación enzimática por un mecanismo de saturación por sustrato (Alfonso-Prieto et al., 2009). Ahora bien, aunque en situaciones normales los ácidos grasos de la chía y el pescado no suelen incrementar sustancialmente la producción de  $H_2O_2$ , es posible que la abundancia de ácidos grasos de cadena larga (causada por la inducción experimental de DLP con tiloxapol simultánea a la suplementación) dé lugar a una sobre activación de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (Shin et al., 2018), que a su vez ocasionó el incremento desproporcionado de  $H_2O_2$  y la subsecuente inactivación enzimática de la CAT. Además, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno como el  $H_2O_2$  ocasionan disfunción mitocondrial hepática, lo cual a su vez disminuye la expresión del factor respiratorio nuclear 1 (Nrf-1), un factor de transcripción relacionado con la biogénesis mitocondrial, regulando a la baja la expresión de los genes de la fosforilación oxidativa codificados por el ADN mitocondrial (mtDNA) y nuclear, y alterando el balance redox (Grujić-Milanović et al., 2021). Igualmente, mediante la oxidación del hierro (II) almacenado en el hígado en hierro (III) (en una reacción conocida como reacción de Fenton), el  $H_2O_2$  participa en la generación del radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), una de las especies de ROS más dañinas, lo cual puede afectar la actividad de los factores de transcripción relacionados con la defensa antioxidante, como el factor respiratorio nuclear 2 (Nrf-2), quien transcribe, entre otras enzimas antioxidantes, a CAT (Shin et al., 2018). Aproximaciones científicas que respaldan esta premisa han sido reportadas previamente. Garrel et al. (2012) reportaron una leve disminución de la actividad hepática de CAT (U/L) en ratas suplementadas con 200 mg de ALA y 500 mg de EPA+DHA, e incremento de dicha actividad al disminuir la dosis de ALA a 20 mg. Curiosamente, el ALA es el principal componente de A-Chía, y el EPA y el DHA los principales ácidos grasos en el AP; y, consistentemente, las dosis empleadas por estos autores fueron las mismas dosis empleadas en este estudio.

### Estrés fisiológico – Glucógeno

Los niveles de glucógeno de los grupos experimentales se muestran en la **Figura 21**. Los niveles de glucógeno revelaron resultados diferenciales entre los grupos sanos. El grupo control (SANOS + SS) mostró valores de glucógeno cercanos a 5 g/100 g hígado. El grupo

sano suplementado con aceite de pescado (AP) por otro lado, mostró los valores más bajos y el grupo suplementado con A-Chía los más altos. S-Chía fue el único grupo que mostró valores intermedios y sin diferencias estadísticas con el resto de los grupos sanos. La inyección de tiloxapol ocasionó disminución estadística en todos los grupos inducidos con DLP, con excepción del grupo DLP + AP, cuyos valores inicialmente también fueron menores.



**Figura 21.** Niveles de glucógeno hepático de los grupos experimentales sanos y con dislipidemia (DLP) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

La depleción del glucógeno hepático ocurre en diversas situaciones como el ayuno, la alta demanda metabólica, el ejercicio prolongado, el estrés, o la presencia de resistencia a la insulina. Debido a que la depleción del glucógeno se observó similar entre todos los grupos con DLP incluido el control (SS), los resultados sugieren que dicha disminución se debe a la presencia de tiloxapol y no la suplementación con ninguno de los tratamientos. En primer lugar, es posible que el tiloxapol directamente haya ocasionado estrés hepático por 1) el incremento en la LPX; 2) el aumento en la producción de radicales libres y/o 3) la disminución de la actividad de CAT, promoviendo la glucogenólisis y el incremento de la glucosa plasmática observados. Por otro lado, es posible que, al incrementar los niveles de TGs y ácidos grasos libres, el tiloxapol indirectamente promovió la activación de la glucogenólisis hepática a fin de elevar la oxidación de ácidos grasos toda vez que la glucosa liberada del glucógeno se agotara, a fin de prevenir los daños lipotóxicos de la acumulación

excesiva de lípidos a nivel hepático y extrahepático. En este sentido, ni S-Chía ni A-Chía fueron capaces de mitigar la depleción súbita de glucógeno. Aun así, la depleción del glucógeno es un proceso natural que no refleja *per se* el daño hepático, sino un proceso de adaptación a diversas condiciones que funciona como un “glucostato” (Soon & Torbenson, 2023).

#### **6.2.1.5 Efecto de la suplementación sobre el tejido hepático**

La **Figura 22** muestra el panel histológico construido a partir de las imágenes obtenidas del análisis histológico bajo tinción con H&E. La figura muestra en la columna izquierda los cortes histológicos hepáticos de ratas sanas suplementadas con SS (**22A**), AP (**22C**), S-Chía (**22E**), y A-Chía (**22G**); y a la derecha los cortes histológicos de ratas inducidas con DLP y suplementadas igualmente con SS (**22B**), AP (**22D**), S-Chía (**22F**), y A-Chía (**22H**).

Primeramente, el grupo control (SANAS + SS) (**Figura 22A**) muestra una arquitectura lobulillar normal y conservada, con presencia de cordones de hepatocitos distribuidos radial y organizadamente. Se observan sinusoides hepáticos igualmente definidos y sin apariencia de daño, con células endoteliales intactas y sin signos de necrosis o inflamación, compatible con hígados de animales completamente saludables.

La inducción de DLP en ratas suplementadas con SS (**Figura 22B**) ocasionó la aparición de una placa necrótica importante, desorganización de la arquitectura normal del tejido con pérdida de definición celular en el área afectada, y citoplasmas celulares más eosinofílicos, lo cual sugiere que el tiloxapol ocasiono necrosis focal y alteración estructural visible en el hígado.

El hígado de ratas sanas suplementadas con AP (**Figura 22C**) mostró arquitectura conservada, cordones hepáticos organizados y definidos y estructuras morfológicas como la vena central claramente identificables, lo cual sugiere que la suplementación de AP no altero la morfología hepática en animales sanos.

La suplementación de AP en ratas con DLP (**Figura 22D**) permitió conservar mejor la estructura hepática, la cual queda evidenciada por la organización de cordones hepáticos y la clara identificación de estructuras morfológicas como la triada portal, integrada por una rama de la vena portal, una rama de la arteria hepática, y el conducto biliar, el cual es fácilmente distinguible por su epitelio cúbico simple compuesto de colangiocitos. Esto sugiere un efecto hepatoprotector moderado del AP en DLP experimental.

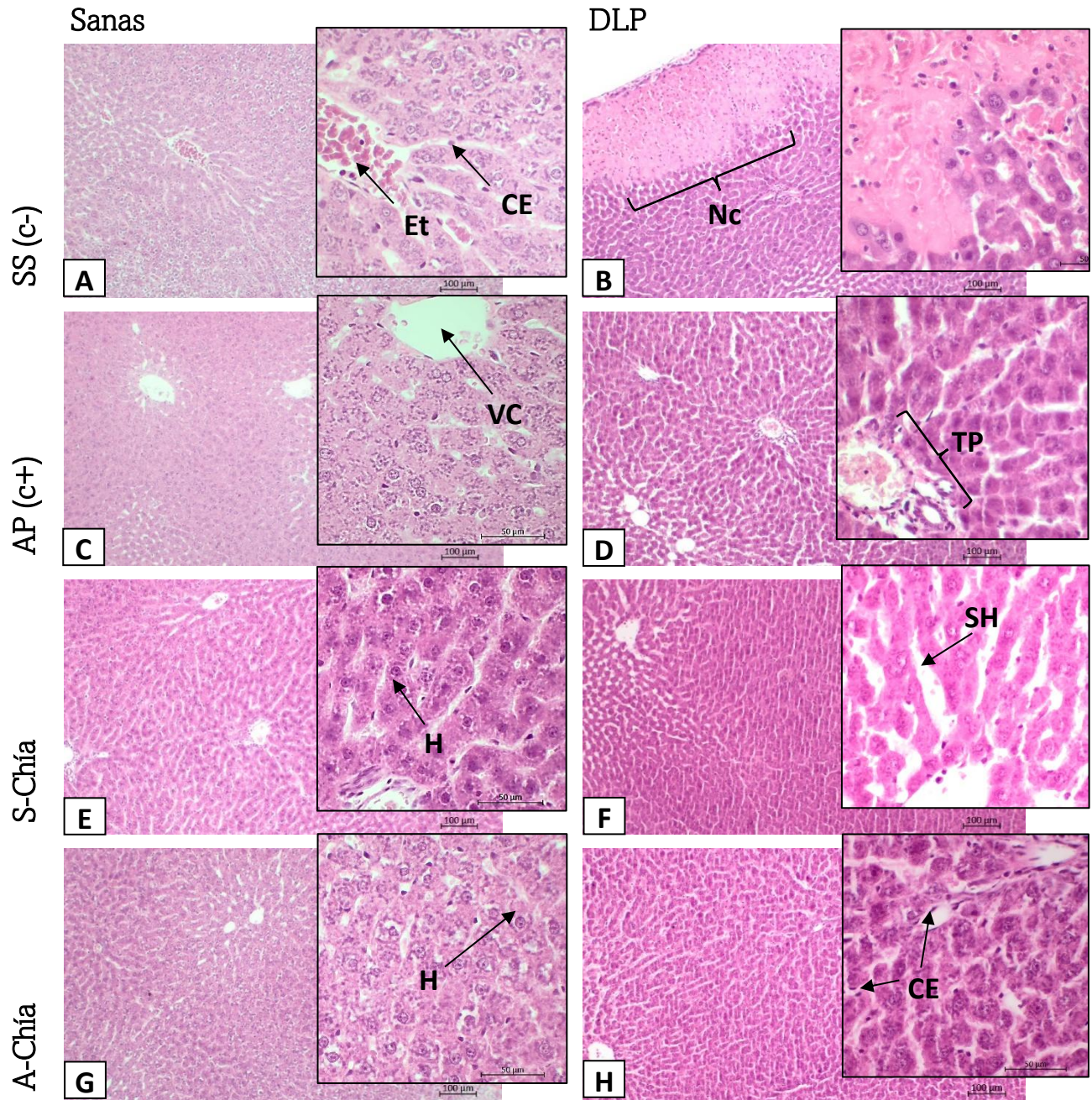
Las ratas sanas suplementadas con S-Chía (**Figura 22E**) mostraron hepatocitos con morfología normal y arquitectura organizada general y sin alteraciones evidentes, lo cual sugiere que la dieta S-Chía no ocasionó daño hepático en condiciones normales.

La suplementación de S-Chía en ratas con DLP (**Figura 22F**) permitió conservar la arquitectura hepática, ya que no se observan zonas extensas de necrosis como en el grupo control; asimismo se observan cordones hepáticos mejor organizados y sin signos de congestión, y sinusoides hepáticos sin inflamación. La S-Chía parece ofrecer protección hepática moderada, similar a AP.

La suplementación de A-Chía en ratas sanas (**Figura 22G**) no afectó la estructura celular ni la arquitectura tisular. La imagen muestra arquitectura normal con hepatocitos íntegros y sin señales de inflamación, por lo que se puede concluir que el A-Chía no produce alteraciones hepáticas cuando se suplementa en altas dosis en roedores sanos.

En ratas con DLP suplementadas con A-Chía (**Figura 22H**) se observan células endoteliales claramente visibles, arquitectura general bastante conservada, sin áreas de necrosis y cordones hepáticos claramente diferenciados. La arquitectura general en el grupo DLP suplementado con A-Chía se encuentra ligeramente mejor que los grupos S-Chía y AP, revelando una buena capacidad protectora y parcialmente restauradora de A-Chía sobre la histología hepática.

Un aspecto destacable en este análisis es el hecho de que los animales inducidos con DLP no mostraron signos de MASLD, lo cual es diferente a lo observado en contextos clínicos no experimentales, donde una gran cantidad de pacientes que cursan con DLP padecen también MASLD/MASH (Gurevitz & Rosenson, 2024). Esto se debe a que el modelo de tiloxapol es ideal para inducir DLP aguda, pero esta DLP inducida no necesariamente se relaciona con la aparición de MASLD en modelos agudos (a corto plazo). Huynh et al. (2024) tampoco observaron anormalidades histológicas en cortes de hígado teñidos con hematoxilina & eosina (H&E) de ratones tratados con dosis única de tiloxapol para inducir DLP. Otra de las razones más importantes que explican el desarrollo de DLP, pero no de hígado graso en los grupos tratados con tiloxapol probablemente tiene que ver con su mecanismo hiperlipidemiante en sí mismo. La hiperlipidemia característica del tiloxapol es resultado de su capacidad de bloquear el consumo de lípidos contenidos en lipoproteínas por los tejidos extrahepáticos y por el hígado (Anandhi et al., 2013), sin embargo, dependiendo del modelo, empleado, la aparición de MASLD puede observarse o no.



**Figura 22.** Cortes histológicos de hígado de ratas Wistar inducidas con DLP bajo tinción de hematoxilina/eosina (H&E). Flechas y texto en negro destacan morfología hepática normal.

Abreviaturas: CE – Célula Entodelial; Et – Eritrocitos; H - Hepatocitos; Nc – Necrosis; SG - Sinusoides Hepáticos; TP – Triada Portal; VC – Vena Central.

Por ejemplo, la agudeza del modelo y la administración de tiloxapol en dosis única evitó la acumulación de lípidos hepáticos, ya que el desarrollo de MASLD inducida por tiloxapol, por lo menos hasta niveles histológicamente detectables, generalmente ocurre más lento. En este sentido, Abdou et al. (2018) reportaron que el tiloxapol causa vacuolización lipídica hepática solo hasta los 28 días de administración en roedores; y dicha acumulación lipídica hepática generalmente se ve favorecido por factores dietéticos como el consumo de altas cantidades de fructosa o grasa, o por la presencia de resistencia a la insulina u obesidad (Ziamanesh et al., 2023).

En este modelo experimental, los animales tuvieron pesos corporales saludables e incluso la dieta control no fue una dieta alta en grasa o fructosa, sino una dieta de mantenimiento del peso, evitando en los roedores el desarrollo de sobrepeso u obesidad y resistencia a la insulina a lo largo de todo el experimento, lo cual era ineludible en nuestro experimento para poder realizar una aproximación mecanística de la modificación del metabolismo lipídico derivada de la suplementación con fracciones de chía y no de la presencia de covariables como la obesidad, la misma resistencia a la insulina, o el tipo de dieta (Ziamanesh et al., 2023). En conjunto estos aspectos evitaron la apreciación típica de vacuolización lipídica en los análisis histológicos hepáticos de los grupos experimentales.

#### *6.2.1.6 Efectos de la suplementación sobre la expresión génica*

Después de evaluar los efectos de la suplementación con S-Chía y A-Chía sobre el perfil lipídico y distintos marcadores de la funcionalidad hepática y el estado antioxidante, se analizaron los efectos de dicha suplementación sobre la expresión de genes hepáticos relacionados con el metabolismo lipídico y la inflamación. Los resultados se muestran en la **Figura 23**. Los efectos del AP sobre la expresión génica no se investigaron en esta ocasión debido a que el AP no es objeto de estudio central de esta investigación y a que la efectividad del AP sobre la modulación terapéutica de genes del metabolismo lipídico e inflamatorios está ampliamente demostrada (Banaszak et al., 2024; da Cunha de Sá et al., 2021; D'Alessandro et al., 2002; S. W. Kim et al., 2020; Lima Rocha et al., 2022; Lluís et al., 2013; Manickam et al., 2010; Popović et al., 2012). Para la interpretación de los resultados de este experimento, al grupo control de ratas sanas suplementadas con solución salina (SANAS +

SS) se le asignó un valor arbitrario de 1, y los niveles de ARNm tanto de la inducción de DLP como de la suplementación con S-Chía o A-Chía se expresaron en función de ese valor. Los niveles de ARNm de SREBP-1c disminuyeron ligeramente tras la inducción de DLP experimental con tiloxapol en el grupo control (DLP + SS), y la suplementación con S-chía disminuyó drásticamente los niveles de dicha expresión. El A-Chía, por su parte, también disminuyó la expresión de este gen, pero de una manera más sutil. Por otra parte, los niveles de PPAR- $\alpha$  disminuyeron un 50% tras la inducción de DLP en el grupo control (DLP + SS), y la suplementación con las fracciones de chía incrementó significativamente su expresión, siendo este incremento notablemente superior en el grupo suplementado con S-Chía. Finalmente, los niveles de ARNm de PPAR- $\gamma$  incrementaron 0.5 veces tras la inducción de DLP en el grupo control (DLP + SS), y la suplementación con S-Chía no ocasionó ningún cambio en los niveles de PPAR- $\gamma$ ; sin embargo, el A-Chía logró disminuir estos niveles a un valor intermedio entre el grupo control sano (SANAS + DLP) y el control de DLP (DLP + SS).

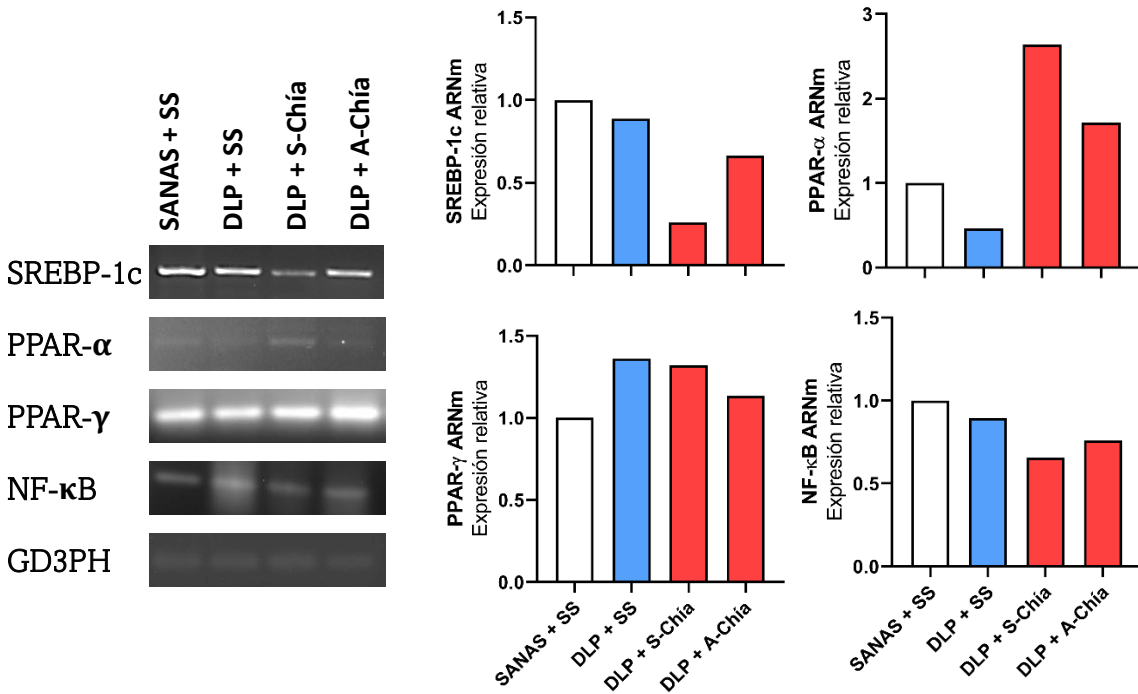
SREBP-1c es un factor de transcripción que funciona como un sensor de lípidos corporales, el cual transcribe una amplia variedad de genes colesterogénicos y lipogénicos como ACC, FAS, HMG-CoA reductasa, entre otros (DeBose-Boyd & Ye, 2018; Estefes-Duarte et al., 2024; Raghov et al., 2008; Shimano & Sato, 2017). Cuando los niveles de colesterol descienden, SREBP-1c incrementa su actividad transcripcional para iniciar, según sea el caso, la lipogénesis o la colesterogénesis hepática *de novo*. Por otro lado, cuando ocurre el escenario contrario, es decir, cuando SREBP detecta un incremento en los niveles de colesterol y ácidos grasos, su actividad transcripcional desciende proporcionalmente con los valores de lípidos censados (DeBose-Boyd & Ye, 2018; Estefes-Duarte et al., 2024). En este estudio, es probable que la elevación súbita de TGs y colesterol tras la administración de tiloxapol haya ocasionado la reducción de la actividad de SREBP-1c por el mecanismo de retroalimentación negativa característico de SREBP (Sato, 2010). La reducción sustancial de los niveles de ARNm de SREBP-1c en los grupos suplementado con S-Chía y A-Chía es consistente con los hallazgos reportados por Rossi et al. (2013), quienes demostraron que el remplazo de aceite de maíz por semilla de chía disminuyó la expresión del SREBP-1

hepático, lo cual consecuentemente causó la reducción de sus enzimas blanco como ACC, FAS y G6PDH. De igual manera, en ese estudio, los autores observaron incrementos en la expresión de PPAR- $\alpha$  y la  $\beta$ -oxidación tras la suplementación con S-Chía, lo cual también es consistente con los resultados de este estudio, ya que la suplementación con S-Chía y A-Chía incrementó los niveles de ARNm de PPAR- $\alpha$ , siendo la S-Chía el tratamiento que promovió en mayor medida dicho incremento (**Figura 23**). Pandurangan et al. (2020) confirmaron estos efectos hipolipidémicos de la semilla de chía en modelos celulares de adipocitos y macrófagos al observar una disminución significativa de los niveles de ARNm de SREBP-1C e incrementos significativos en la expresión de genes termogénicos como UCP-1, PGC-1 $\alpha$  y PRDM16, siendo algunos de ellos genes diana de PPAR- $\alpha$ .

Mecánicamente, es probable que la riqueza de ALA en la dieta de los roedores haya impulsado la producción de EPA/DHA, los cuales a su vez promovieron la activación de PPAR- $\alpha$  y un consecuente incremento en la tasa de oxidación de ácidos grasos (FAO) (Song et al., 2010) que redujo los niveles de TGs y colesterol en los grupos suplementados con S-Chía y A-Chía (**Figuras 16C y 16D**). Además, la activación de PPAR- $\alpha$  pudo verse aún más incrementada como respuesta compensatoria a los altos niveles de lípidos circulantes, a fin de incrementar la FAO y devolver los niveles de TGs y lípidos totales a la normalidad. Después, la activación de PPAR- $\alpha$  pudo inhibir la vía LXR/SREBP-1C, lo cual explica coherentemente todos los resultados observados en el análisis molecular de este estudio. La inhibición de la vía LXR/SREBP-1C por PPAR- $\alpha$  fue demostrada experimentalmente en el año 2003 por Yoshikawa et al. Por último, los efectos superlativos de S-Chía sobre A-Chía pueden estar relacionados con una mayor riqueza de compuestos bioactivos presentes en la semilla de chía completa (SCI), los cuales fueron capaces de modular de mejor manera el metabolismo lipídico a nivel molecular.

Además de evaluar los efectos de la suplementación con las fracciones de chía sobre genes del metabolismo lipídico, se quiso averiguar si la inducción aguda de DLP podía incrementar la transcripción de genes inflamatorios debido a la sobrecarga súbita de lípidos intrahepáticos. Para ello, se determinaron los niveles de ARNm del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, un regulador maestro de la inflamación que transcribe genes como el del TNF- $\alpha$ , las

ciclooxigenasas (COX), la proteína C reactiva (CRP), entre otros (Estefes-Duarte et al., 2024). Conjuntamente, el análisis de la expresión de NF- $\kappa$ B nos permitió averiguar si la vía de trans-represión PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B podía estar relacionada con los efectos observados. En línea con esto, los niveles de NF- $\kappa$ B disminuyeron levemente en el grupo control inducido con DLP (DLP + SS). El grupo suplementado con S-Chía mostró una disminución del 25% en los niveles de ARNm de NF- $\kappa$ B, y el A-Chía los redujo un 20% aproximadamente (**Figura 22**).



**Figura 23.** Efectos de la suplementación con S-Chía o A-Chía sobre la expresión de genes hepáticos de roedores inducidos con DLP experimental.

PPAR- $\gamma$  es un receptor nuclear que además de participar en la regulación de la homeostasis lipídica también exhibe mecanismos antiinflamatorios, principalmente mediante la trans-represión del factor transcripcional NF- $\kappa$ B (Estefes-Duarte et al., 2024; Yenuganti et al., 2014). Esto implica que un incremento en la actividad transcripcional de PPAR- $\gamma$  se traduce en una reducción consecuente de la transcripción de NF- $\kappa$ B (Estefes-Duarte et al., 2024; Han et al., 2017b; Y. Liu et al., 2018; Morán Salvador, 2008). En este sentido, al observar los niveles de ARNm de PPAR- $\gamma$  y NF- $\kappa$ B entre los grupos suplementados, es posible notar un comportamiento consistente con este hecho; es decir, cuando los niveles de ARNm de PPAR- $\gamma$  incrementaron, los niveles de ARNm de NF- $\kappa$ B disminuyeron proporcionalmente.

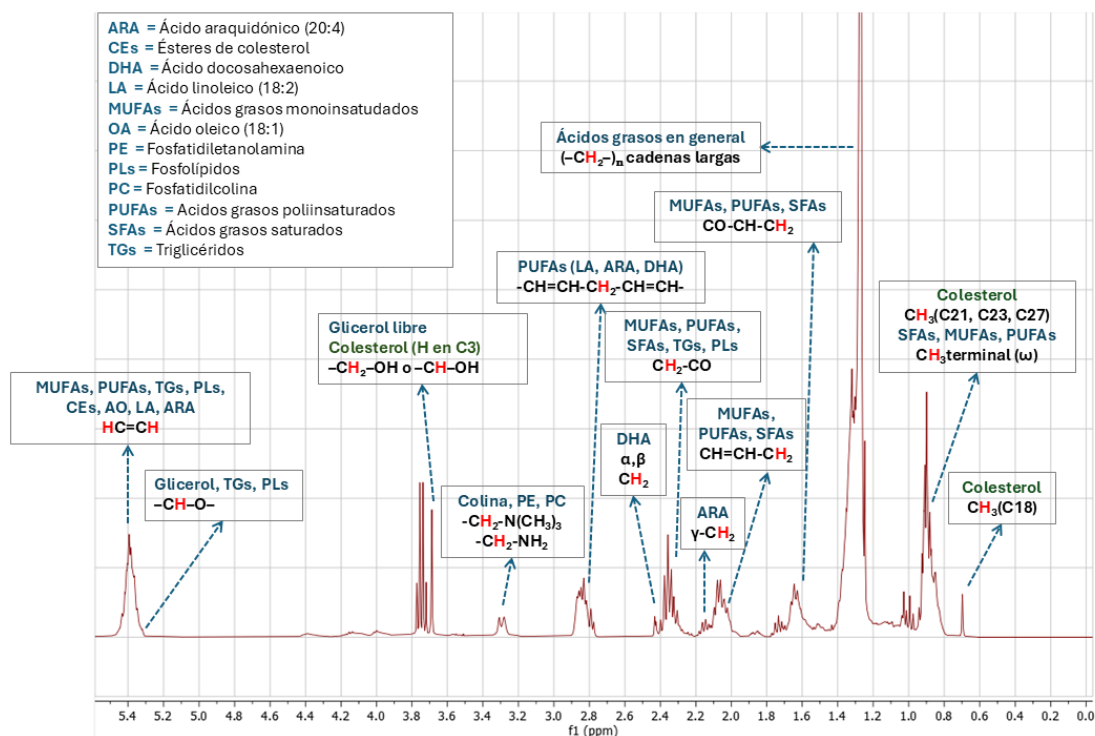
De igual manera, resulta importante destacar que tanto la suplementación con S-Chía como con A-Chía disminuyeron el ARNm de NF- $\kappa$ B, aun cuando la inducción aguda de DLP no incrementó la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por encima de los valores del control. Esto se debe probablemente a que los ácidos grasos omega-3 pueden modular diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria, como la inflamación, de una manera independiente de los PPARs (Draper et al., 2011). A nivel práctico, este hallazgo sugiere que los componentes químicos de la semilla de chía pueden ejercer un efecto profláctico o preventivo ante la inflamación, puesto que son capaces de reducir la transcripción de genes inflamatorios mediada por NF- $\kappa$ B a niveles subnormales, lo cual podría retrasar tanto la progresión de la MASLD hacia la MASH, como la aparición de otros aspectos del síndrome metabólico relacionados con la inflamación como la resistencia hepática a la insulina y la disfunción endotelial. Aun así, debido a que PPAR- $\gamma$  es un regulador crítico de la diferenciación y maduración de adipocitos (Estefes-Duarte et al., 2024; Han et al., 2017b), y su activación mediada por ligando depende de los ácidos grasos insaturados como el ALA de la chía o el EPA/DHA del aceite de pescado (Estefes-Duarte et al., 2024; Zapata-Gonzalez et al., 2008), el consumo excesivo de omega-3 puede promover la adiposidad en los sujetos, aunque probablemente con un patrón menos inflamatorio. Aunque este aspecto no se indagó en este estudio, distintos resultados reportados por autores que han explorado este fenómeno apoyan la veracidad de estas aseveraciones (S. W. Kim et al., 2020).

#### *6.2.1.7 Efectos de la suplementación sobre el lipidoma hepático*

A fin de evaluar los efectos de la suplementación con S-chía o A-Chía sobre diferentes clases de lípidos hepáticos y hacer una aproximación hacia los mecanismos de acción preventivos/terapéuticos, se realizó un análisis lipidómico mediante RMN<sup>1</sup>H y análisis multivariado. Para ello, inicialmente se realizó la asignación de los picos espectrales correspondientes a una muestra de lípidos hepáticos de ratas del grupo control (SANAS + SS), extraídos mediante el método de Folch (Folch et al., 1957). La **Figura 24** muestra un espectro representativo y su asignación de picos de resonancia correspondiente. Primeramente, es posible observar una huella espectral típica de muestras lipídicas hepáticas que exhibe, entre otras señales, un único pico más alto entre 1.2 y 1.4 ppm, el cual

corresponde al total de lípidos neutros de reserva hepática, y un singlete cercano a 0.7 ppm correspondiente al protón unido al C18 del colesterol. El espectro completo se describe a continuación.

De izquierda a derecha, entre 5.20–5.25 ppm se observa un multiplete débil correspondiente al protón sn-2 del glicerol ( $-\text{CH}-\text{O}-$ ), lo cual denota la presencia de triglicéridos y/o fosfolípidos. Entre 4.10–4.35 ppm aparece un multipletes correspondientes a metilenos sn-1 y sn-3 del glicerol ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ ) característicos de triglicéridos o glicerofosfolípidos de membrana (fosfatidilcolina [PC] o fosfatidiletanolamina [PE]). A 3.60–3.70 ppm se observan señales pequeñas correspondientes a metilenos adyacente a OH o protones unidos a carbonos enlazados a OH ( $-\text{CH}_2-\text{OH}$  o  $-\text{CH}-\text{OH}$ ), lo cual es característico del glicerol libre y del protón unido a C3 en el colesterol. Entre 3.20 y 3.25 se encuentra una señal definida ( $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) que es característica de la colina, fosfatidilcolina, esfingomielina y otros fosfolípidos que contienen colina. Entre 2.75–2.85 ppm destaca un multiplete pequeño correspondiente a un metileno bis-alílicos ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), lo cual denota la presencia específica de ácidos grasos poliinsaturados; en este caso, indica la presencia de ácido linoleico (LA), ácido araquidónico (ARA) o ácido docosahexaenoico (DHA). En 2.25–2.35 ppm se observa una señal clara de los metilenos  $\alpha$  adyacentes al carbonilo ( $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ) de los ácidos grasos, lo cual puede corresponder a ácidos grasos no esterificados, o bien, ácidos grasos contenidos en triglicéridos o fosfolípidos. Entre 1.95–2.10 ppm se aprecia un multiplete medio que evidencia metilenos ( $-\text{CH}_2-$ ) adyacentes a un doble enlace alílicos. En 1.55–1.65 ppm existe una señal pequeña correspondiente al metileno  $\beta$  al carbonilo, propio de ácidos grasos. Entre 1.20–1.35 ppm se observa la señal más intensa del espectro, la cual corresponde a metilenos que conforman cadenas acilo largas ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>n</sub> sugerentes de TGs y ácidos grasos de cadena larga. Su intensidad refleja el contenido total de lípidos neutros, es decir, lípidos sin carga eléctrica que generalmente funcionan como la reserva energética de lípidos del hígado. En 0.85–0.95 ppm se encuentra un triplete que indica la presencia de metilos terminales o metilos omega ( $\omega$ ) de cadenas acilo ( $-\text{CH}_3$ ). Por último, una pequeña pero característica señal en 0.65–0.70 ppm, específica del metilo angular del C18 del colesterol [ref.](#)



**Figura 24.** Asignación del espectro de RMN<sup>1</sup>H en una fracción de lípidos hepáticos extraídos del grupo control SANOS + SS. Tanto la señal del disolvente CHCl<sub>3</sub> a 7.24 ppm como la del TMS a 0.0 ppm se han excluido del espectro.

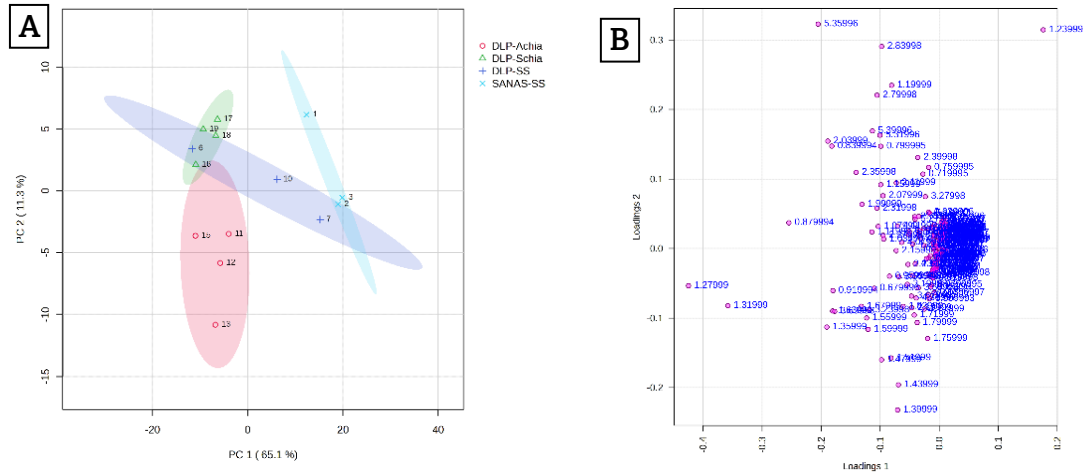
Después de la asignación del espectro, los espectros fueron procesados y normalizados por el pico más alto (1.3 ppm), al cual se le asignó un valor de 100. Posteriormente, las señales de los espectros fueron transformadas en “bins”, números representativos de cada señal detectada (habitualmente la media) que pueden ser agrupados en una tabla o matriz de datos para facilitar el análisis multivariado. La tabla de datos se procesó y se normalizó nuevamente mediante un escalado de Pareto y se realizó un análisis de componentes principales (PCA), un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y otros análisis que se muestran a continuación.

En primer lugar, la **Figura 25A** muestra la proyección de los datos mediante el gráfico de puntajes del PCA. Es posible observar una clara separación entre los grupos sanos o con DLP tratados con S-Chía o A-Chía. No se observan valores atípicos, es decir, fuera de los intervalos de confianza (95%, zonas sombreadas del gráfico). Se calcularon dos componentes principales, PC-1 y PC-2, los cuales fueron capaces de explicar el 65.1 y el 11.3 % de la varianza de los datos, respectivamente. El gráfico de puntajes de PCA deja ver

que el grupo control sano (SANAS + SS) fue el único grupo en agruparse en el cuadrante derecho, mientras que los grupos suplementados con las fracciones de chía se agruparon hacia la izquierda. Por su parte, el grupo control de DLP (DLP + SS) se ubicó en la zona cercana al origen de la escala, perpendicularmente al eje X, lo cual sugiere que este grupo comparte características en cuanto a patrones lipídicos con el grupo sano y con los grupos con DLP. Esto preliminarmente soporta dos ideas principales: 1) que la inducción de DLP con tiloxapol no solo incrementó los lípidos en el plasma, sino que también ocasionó un cambio en la composición lipídica hepática; y 2) que la suplementación con S-Chía o A-Chía si tuvo un efecto diferencial sobre el lipidoma hepático de los roedores.

En línea con esto, el diagrama de cargas (**Figura 25B**), el cual destaca los desplazamientos químicos (es decir, las clases de lípidos) responsables de la separación o diferenciación de los grupos proyectados en el PCA (**Figura 25A**), permite acentuar lo siguiente: el mayor aglomerado de desplazamientos químicos se observa en la zona próxima al origen (0.0), esto indica que la mayoría de los grupos de lípidos no muestran una diferencia clara entre tratamientos. También se observa que la señal a 1.23999 ppm (carga positiva en PC-1), correspondiente a metilenos de cadenas alifáticas largas ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>n</sub>, es la variable que más contribuye a la separación de los grupos control (SANAS + SS y DLP + SS) de los grupos suplementados con chía, lo cual sugiere que dichos grupos control tienen 1) un mayor contenido de lípidos totales; y/o 2) una mayor proporción de ácidos grasos saturados en comparación con los grupos tratados con S-Chía o A-Chía. Las señales con valores de carga negativos en PC-1, es decir, los desplazamientos a 1.27999 y 1.31999 ppm (a la izquierda del plot), correspondientes también a metilenos repetitivos ( $-\text{CH}_2-$ ), consistentemente sugieren reducción de acumulación de TGs en los grupos suplementados tanto con S-Chía como con A-Chía. Además, los desplazamientos con valores de carga negativos en PC-1 (positivo en PC-2) como 5.35996 (correspondiente a protones olefínicos  $[\text{=CH-}]$ ), y las señales 2.83998, 2.7998 de protones bis-alílicos (es decir, de ácidos grasos poliinsaturados como ácido linoleico [18:2] o ácido linolénico [18:3]), se pueden considerar un reflejo del grado de instauración total, lo que consistentemente indica que la suplementación con chía ocasionó una redistribución de ácidos grasos y una modificación al perfil de instauración de los

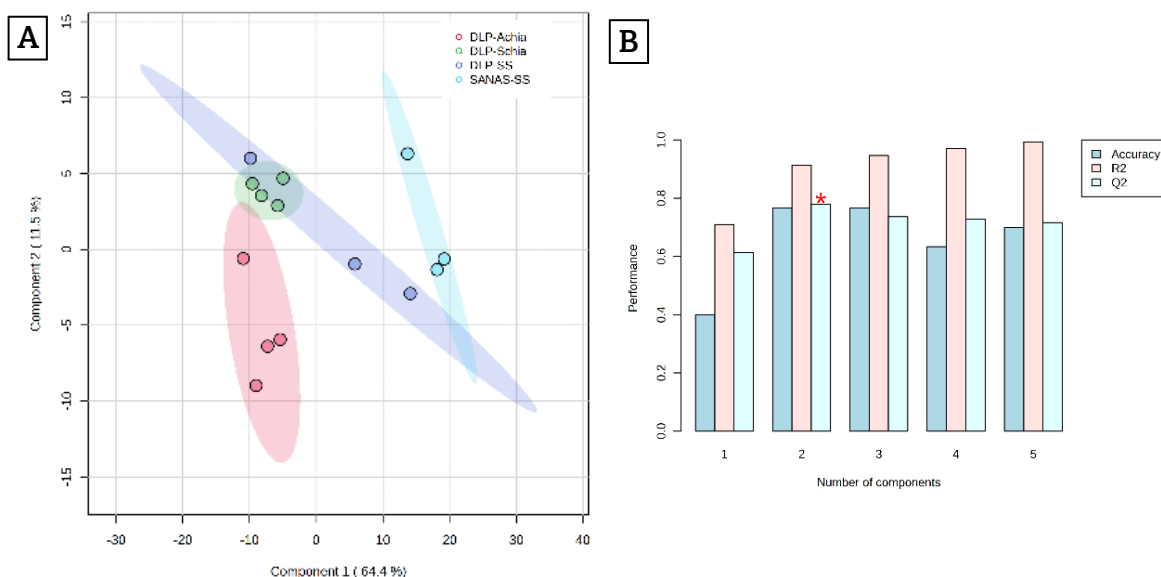
mismos, y, posiblemente, una reducción de la acumulación de estos a nivel hepático. Considerando que los mayores valores de carga reflejan mayor influencia en la separación de los grupos en cada PC, dichos desplazamientos evidencian lípidos o grupos de lipídicos acentuadamente diferenciados tras la suplementación con chía.



**Figura 25. (A)** Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales del grupo control y los grupos con DLP suplementados con S-Chía o A-Chía. [PERMANOVA] Valor F 9.8724; R<sup>2</sup>: 0.74758; valor p (basado en 999 permutaciones): 0.002. **(B)** Diagrama de cargas derivado del PCA.

Después del PCA, se llevó a cabo un análisis discriminante de últimos cuadrados parciales (PLS-DA), el cual es un método supervisado que tiene como finalidad la creación de un modelo predictivo que permita discriminar con claridad a que grupo pertenece una muestra según su patrón de distribución (firma) de lípidos. El gráfico del PLS-DA, así como los coeficientes de predicción ( $Q^2$ ,  $R^2$ , accuracy), se muestran en las Figuras 25A y 25B, respectivamente. Los valores de predicción de la varianza del PLS-DA para los PC-1 y PC-2 fueron 64.4 y 11.5%, respectivamente; dichos valores fueron bastante similares a los del PCA (65.1% PC-1 y 11.3% PC-2). Los valores de  $Q^2$  para el PC-1 fueron de 0.54374 y para el PC-2 de 0.79612. Los valores de  $R^2$  para el PC-1 fueron de 0.70993 y para el PC-2 de 0.91321. Por último, los valores de exactitud (accuracy) del modelo, es decir, el porcentaje de muestras que el modelo logró predecir correctamente, fue de 0.43333 (o 43%) para el PC-1 y de 0.81667 (u 82%) para el PC-2, siendo el PC-2 el que mostró los mayores de tanto de  $Q^2$  como de  $R^2$  y exactitud (accuracy).

$Q^2$  es una estimación de la capacidad predictiva real del modelo y se calcula mediante validación cruzada (VC). En cada VC, los datos predichos se comparan con los datos originales y se calcula la suma de los errores al cuadrado. El error de predicción se suma entonces para todas las muestras (Suma Residual Predicha de Cuadrados o PRESS). Para mayor comodidad, el PRESS se divide entre la suma de cuadrados inicial y se resta de 1 para asemejarse a la escala del  $R^2$ . Las buenas predicciones tendrán un PRESS bajo o un  $Q^2$  alto. Es posible tener un  $Q^2$  negativo, lo que significa que el modelo no es predictivo o está sobreajustado. En este estudio, debido a que no existió una diferencia importante entre  $R^2$  y  $Q^2$ , podemos concluir que el modelo no está sobreajustado y que predice satisfactoriamente la pertenencia de las muestras a un grupo determinado.

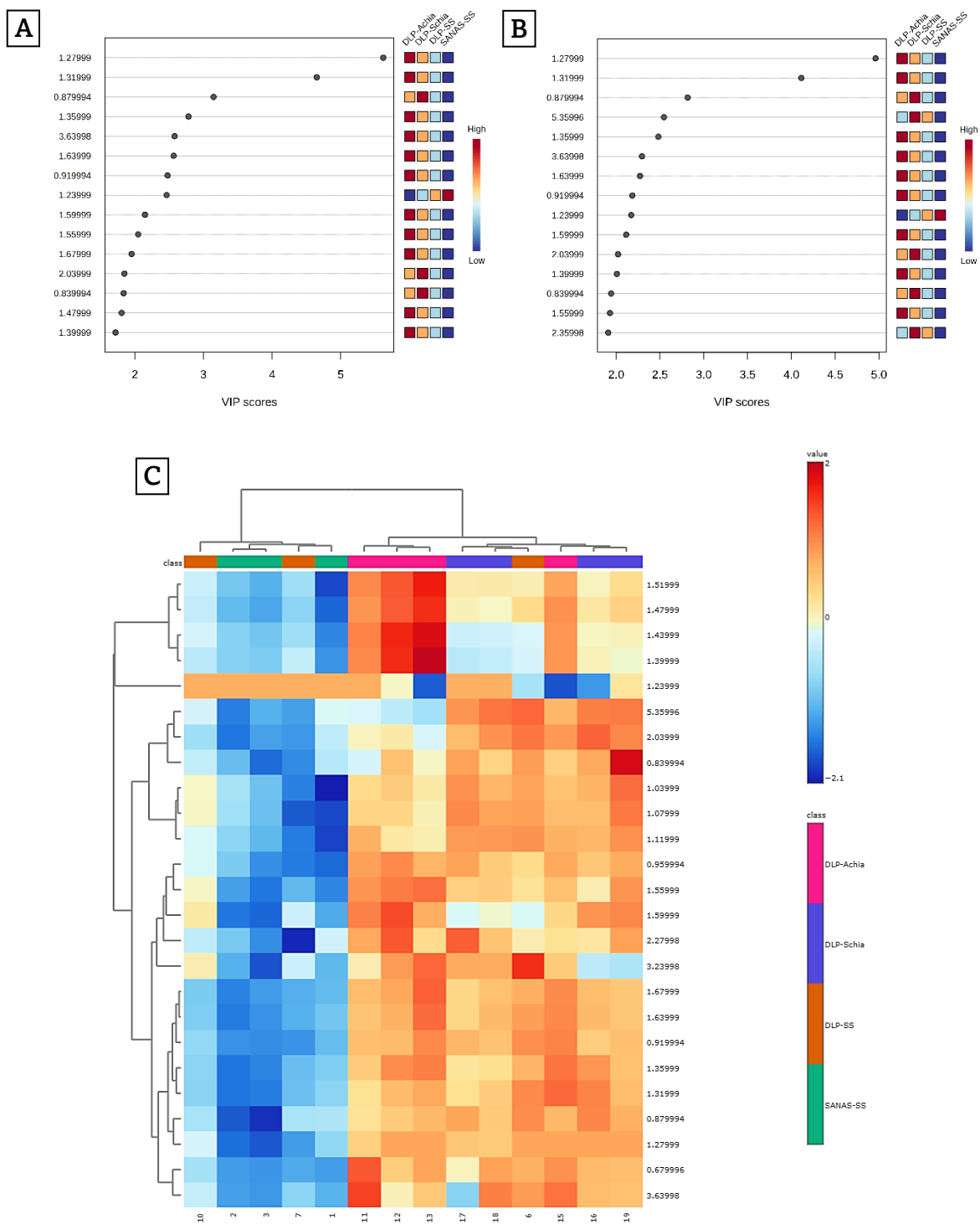


**Figura 25.** (A) Gráfico de análisis discriminante de últimos cuadrados parciales (PLS-DA). (B) Coeficientes de predicción de 5 componentes principales del grupo control y los grupos con DLP suplementados con S-Chía o A-Chía.

La **Figura 26** muestra los puntajes de importancia de la variable para la predicción (VIP scores) de PC-1 (**Figura 26A**) y PC-2 (**Figura 26B**), los cuales se obtuvieron a partir del PLS-DA. En cada uno de los dos componentes principales utilizados se seleccionaron únicamente los 15 desplazamientos químicos que mejor apoyan la predicción del modelo, es decir, aquellos con VIP scores  $> 1$ . En los gráficos de VIP score tanto de PC-1 como de PC-2 es destacable que las señales con mayor importancia para la predicción corresponden

a desplazamientos químicos en regiones que corresponden a, de menor a mayor desplazamiento, metilos terminales (0.8-0.9 ppm) cadenas alifáticas (1.2-1.4 ppm), regiones de insaturación (1.7-2.0 ppm), y regiones de detección de protones del glicerol (3.63 ppm). Este patrón consistentemente sugiere que la suplementación impactó positivamente en la acumulación de lípidos hepáticos, así como en el nivel de insaturación, y la señal a 3.63 (señal en quinta posición en PC-1 y sexta posición en VIP scores de PC-2) indica que los componentes de la chía intervinieron en los niveles de esterificación y re-esterificación hepática. Teniendo en cuenta que 1) en el PCA los grupos tratados con S-Chía y A-Chía se ubicaron en las región negativa del eje X en PC-1, y 2) que el análisis molecular mostró incremento en los niveles de ARNm de PPAR- $\alpha$  y disminución del ARNm de SREBP-1c, estas observaciones apuntan sólidamente a que la suplementación con chía incrementó la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y ralentizó la lipogénesis *de novo*, ya que PPAR- $\alpha$  codifica genes de  $\beta$ -oxidación como CPT-I, CPT-II, FABP1 etc.; y SREBP-1c transcribe a ACC, FAS, genes lipogénicos por excelencia (Han et al., 2017a). Además, teniendo en cuenta que tanto el ALA como sus derivados metabólicos (EPA y DHA) son ligandos naturales de PPAR- $\alpha$  (Bougarne et al., 2018), dichos efectos se pueden atribuir predominantemente a este componente de la semilla y el aceite de chía.

A fin de continuar con el análisis, los desplazamientos con mayores VIP scores fueron seleccionados y considerados variables relevantes, y se utilizaron para creación de un mapa de calor de agrupamiento o “clustering heatmap” de visualización basado z-scores y autoescalado (**Figura 26C**). El heatmap destaca que, aunque los grupos no se agrupan de una forma idónea, los grupos control tratados con solución salina (SANOS +SS y DLP + SS) se agrupan juntos, y que los grupos suplementados con S-chía o A-Chía se agrupan juntos también, lo cual es consistente con el PCA. Esto sugiere que la suplementación con A-Chía o S-Chía si tuvo un efecto en la composición lipídica hepática de los roedores, y que dicho efecto fue mayor al ocasionado por el tiloxapol en los grupos inducidos con DLP.

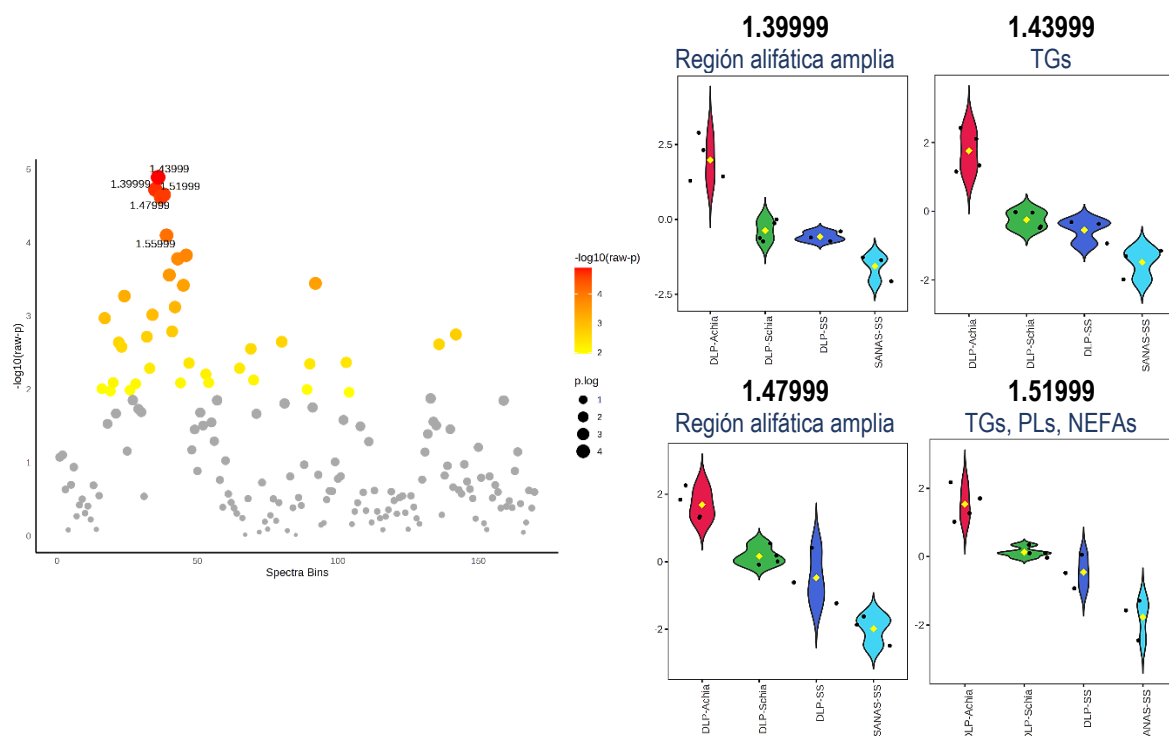


**Figura 26.** Vip scores (Variable Importance for Projection). Importancia de la variable para la predicción del (A) PC-1 y (B) PC-2. (C) Heatmap construido a partir de las variables con mayor VIP score. En cada fila se observa cada una de las muestras y en las filas se muestran las variables (desplazamientos químicos) de importancia. Los recuadro color rojo intenso destacan los grupos lipídicos sobrerregulados según su desplazamientos químicos, y los recuadros con colores azules intensos denotan grupos lipídicos regulados a la baja en el hígado de ratas Wistar.

Otro aspecto para destacar es que todas las clases de lípidos seleccionadas se encuentran disminuidos en los grupos control, e incrementados en los grupos suplementados con cualquier fracción de chía. Esto indica que la suplementación con S-Chía o A-Chía si tiene un efecto sobre el lipidoma hepático. Sin embargo, esto aparentemente contradice los resultados del PCA y el diagrama de cargas mostrados con anterioridad, en los cuales los grupos suplementados con chía aparentaban estar disminuidos en ácidos grasos. Esto se puede explicar por el hecho de que para la construcción del heatmap se seleccionaron únicamente las muestras con mayor VIP score. Además, el escalado de los datos significaría que una clase lipídica podría aparecer sobrerregulada (en rojo en el gráfico) únicamente por ser mayor que la media global, la cual puede ser baja para muchas variables (Szymańska et al., 2012). De este modo, un pequeño aumento puede denotar erróneamente incremento de lípidos en general. Por último, debido a la naturaleza de los componentes de la chía y a la selección exclusiva de señales con VIP scores altos, es bastante probable que esta aparente discrepancia esté denotando el hecho de que en las muestras control los niveles netos de lípidos son mayores en muestras control, pero que los niveles de lípidos insaturados sean mayores en los grupos suplementados con chía, debido a que buena parte de las señales con mayor VIP score corresponden a señales de instauración (0.919994 ppm, 1.67999 ppm, 2.03999 ppm, etc.).

Hasta este punto del análisis se ha concluido que la suplementación tuvo efectos detectables y predecibles con cierto nivel de exactitud en la proporción de lípidos y en las tasas de esterificación, re-esterificación e instauración de ácidos grasos; sin embargo, si estos efectos eran estadísticamente significativos o no, aún era una idea desconocida. Para averiguarlo, se realizó un ANOVA entre los 4 grupos (controles y suplementados) empleando las 170 desplazamientos químicos utilizados como variables. La **Figura 27** muestra los resultados de dicho ANOVA. El análisis reconoció a 37 de los 170 señales como significativos, y el resto como no significativos. Los puntos con colores rojos o cercanos al rojo destacan desplazamientos químicos significativos. Los puntos grises y más pequeños no son significativos para el modelo. Además, a la derecha del ANOVA se observan cuatro violin

plots de los principales desplazamientos químicos con diferencia estadística entre grupos según el ANOVA.



**Figura 27.** ANOVA que muestra las señales de grupos lipídicos que estadísticamente diferencian a los grupos en estudio. Los puntos con colores rojos o cercanos al rojo destacan desplazamientos químicos significativos. Los puntos grises y más pequeños no son significativos para el modelo. A la derecha se observan 4 violin plots de los principales desplazamientos químicos con diferencia estadística entre grupos según el ANOVA.

Aunque el ANOVA nos permitió detectar que existían diferencias estadísticas entre grupos, y los violin plots nos sugirieron cierta información, aun no era posible establecer deducciones concluyentes con respecto a que grupos estaban marcando esas diferencias. Por ello, a fin de averiguar si la suplementación con S-Chía y A-Chía mostraban efectos estadísticamente diferenciales sobre el lipidoma hepático, se realizó un análisis Fold Change y una prueba T entre ambas muestras, y los resultados de dichos análisis se utilizaron para construir un gráfico de volcán que permite una visualización clara de los efectos diferenciados. La **Figura 28** muestra los resultados obtenidos en dichos análisis.

## 6.2.2 Efecto de la suplementación sobre la MASH

### 6.2.2.1 Efectos sobre el peso corporal, el consumo de alimento y el peso hepático

#### Figura 29

### 6.2.2.2 Efectos sobre la glucosa y el perfil lipídico

La **Figura 30** muestra los niveles de glucosa, lípidos totales, triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL de los grupos sanos y con MASH suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), dieta estándar reformulada con semilla de chía (S-Chía) y aceite de chía (A-Chía).

Glucosa. Los niveles de glucosa en todos los grupos sanos se mantuvieron cercanos a 200 mg/dL sin diferencias entre sí, lo cual sugiere que la suplementación no tiene efecto significativo en condiciones saludables. La administración de CCl<sub>4</sub> para producir MASH incrementó significativamente los niveles de glucosa únicamente en el grupo MASH+A-Chía con respecto a su grupo control sano (SANOS+A-Chía). Aunque el AP mostró niveles bajos de glucosa y estadísticamente diferentes al control (MASH+SS), dichos resultados no son trascendentes debido a que la inducción de MASH no incrementó la glucosa en el grupo MASH+SS con respecto al grupo SANOS+SS.

Lípidos totales. En los grupos sanos, los niveles de lípidos totales oscilaron entre 500 y 700 mg/dL; dichos valores resultan normales en roedores. Ni la suplementación con AP, S-Chía o A-Chía modificaron significativamente los niveles sanguíneos de lípidos totales. La inducción de MASH incremento significativamente los lípidos totales en el grupo control y en el grupo suplementado con S-Chía. Además, entre estos dos grupos se observaron diferencias estadísticas, siendo el grupo control el que mostró los niveles más altos. Esto sugiere que, en un contexto de daño hepático, la semilla de chía pudo mitigar significativamente las modificaciones al metabolismo de los lípidos ocasionadas por la

perturbación del funcionamiento hepático causada por el  $\text{CCl}_4$ . Por otro lado, ni el AP ni el A-Chía incrementaron los niveles de lípidos totales tras la inducción de MASH, lo cual contrasta con los hallazgos encontrados en el modelo de DLP, donde la suplementación con cualquier aceite incrementó sustancialmente los niveles de lípidos totales aun en ratas sanas.

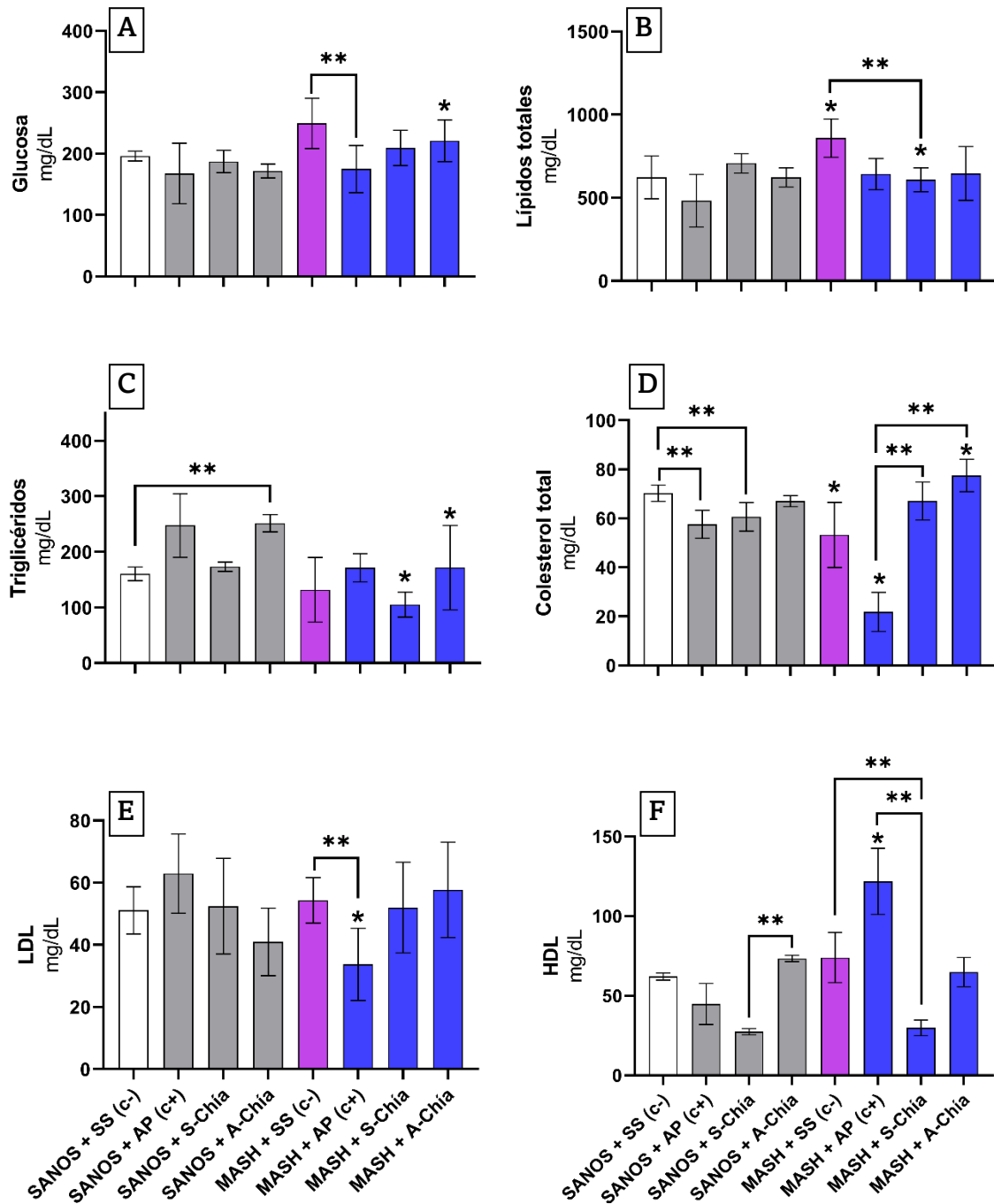
Triglicéridos. Los niveles de TGs fueron similares entre los grupos sanos suplementados con SS y S-Chía (160.65 y 173.33 mg/dL, respectivamente). Sin embargo, la suplementación con AP o A-Chía incrementaron significativamente y de una manera muy similar dichos valores (247.62 y 251.61 mg/dL, respectivamente). Tras la inducción de MASH, tanto la S-Chía como el A-Chía disminuyeron significativamente las concentraciones séricas de TGs con respecto a sus grupos control, siendo el grupo MASH suplementado con S-Chía el que mostró los valores más bajos, los cuales no fueron estadísticamente diferentes al grupo MASH + A-Chía.

Colesterol total. Los niveles basales de colesterol fueron estadísticamente mayores al grupo AP y al grupo S-chía entre los grupos sanos. La administración de  $\text{CCl}_4$  disminuyó significativamente los niveles de colesterol total en el grupo SS y en el grupo AP, y los incrementó en el grupo A-Chía. El grupo MASH+S-Chía se mantuvo sin cambios. El grupo inducido con MASH y suplementado con AP mostró los niveles más bajos de colesterol total (21.86 mg/dL). El aceite de pescado es capaz de reducir los niveles de colesterol mediante la supresión de la biosíntesis endógena de colesterol, al suprimir la actividad transcripcional del factor nuclear SREBP, mediante la activación de los receptores nucleares activados por ligando PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ .

LDL. Las concentraciones plasmáticas de LDL se mantuvieron sin cambios significativos entre los grupos de ratas sanas, las cuales oscilaron entre 40 y 60 mg/dL aproximadamente. La inducción de DLP con  $\text{CCl}_4$  redujo significativamente los niveles de LDL en el grupo suplementado con AP con respecto a su grupo control (SANOS+AP) mostrando valores de 33.72 mg/dL. Dicho comportamiento es consistente con los niveles de colesterol total bajos exhibidos por el grupo MASH+AP. Los demás grupos (SS, S-Chía y A-Chía) se mantuvieron sin cambios importantes con respecto a sus controles sanos. Debido a que las LDL se sintetizan en proporción a los niveles de colesterol, una reducción del colesterol total ya sea

de origen dietético o procedente de la biosíntesis *de novo*, requiere menor transporte endógeno a través del torrente sanguíneo por las LDL, lo cual reduce sus niveles.

HDL. Los niveles de HDL en ratas sanas en general se observaron normales (entre 45-70 mg/dL), con excepción del grupo suplementado con semilla de chía, el cual mostró niveles estadísticamente inferiores al resto de los grupos sanos (27.39 mg/dL). Tras la inducción de MASH todos los grupos se mantuvieron sin cambios importantes con respecto a sus controles, con excepción del grupo suplementado con AP, el cual incrementó sus niveles desde 44.79 mg/dL en el grupo sano, hasta 121.88 mg/dL en MASH+AP. Estos valores fueron estadísticamente superiores ( $p < 0.05$ ) tanto al grupo control MASH+SS (73.96 mg/dL) como al grupo MASH+S-chía (29.86 mg/dL); sin embargo, no difirieron estadísticamente (aunque si numéricamente) del grupo suplementado con A-Chía (64.84 mg/dL).

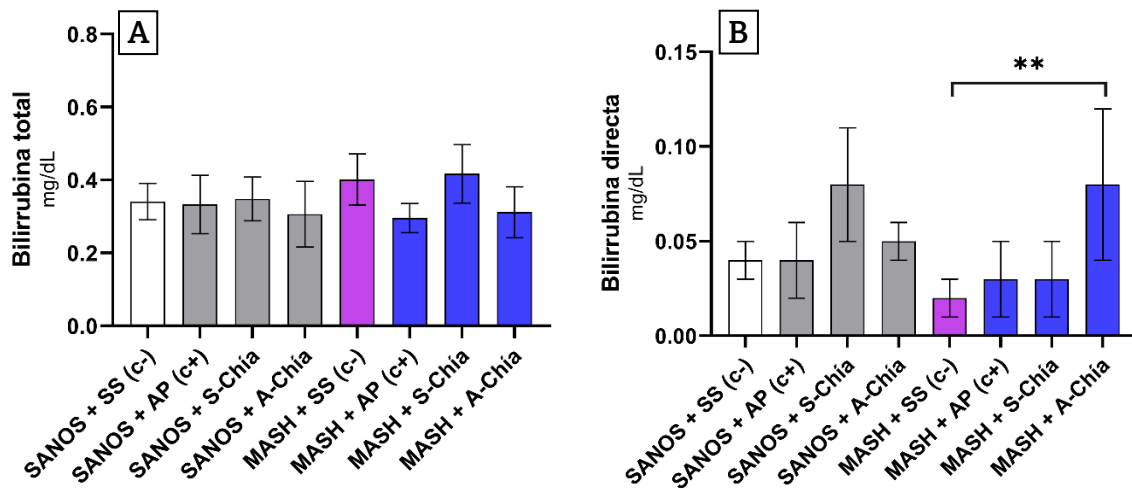


**Figura 30.** Niveles plasmáticos de glucosa (A), lípidos totales (B), triglicéridos (C), colesterol total (D), LDL (E), y HDL (F), de los grupos experimentales sanos y con esteatohepatitis (MASH) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

### 6.2.2.3 Efectos sobre los marcadores de funcionalidad hepática

#### Colestasis – Bilirrubina, fosfatasa alcalina y gama-glutamil transpeptidasa

La **Figura 31** muestra los niveles plasmáticos de bilirrubina total y directa de los grupos sanos y con MASH suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla de chía (S-Chía) y aceite de chía (A-Chía). Las concentraciones de bilirrubina total no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos ni en ratas sanas ni en ratas inducidas con MASH. Dichas concentraciones oscilaron entre 0.30 y 0.40 mg/dL aproximadamente. Por otro lado, las concentraciones de bilirrubina directa mostraron una tendencia similar, con excepción del grupo inducido con MASH y suplementado con A-Chía, el cual fue estadísticamente superior al grupo control de MASH (MASH + SS); sin embargo, dicha elevación no fue estadísticamente diferente a su grupo control sano (SANOS + A-Chía), por lo que no podría considerarse un hallazgo clínico relevante. Aun así, las elevaciones aisladas de la bilirrubina directa pueden sugerir un defecto en la incorporación de la bilirrubina en la bilis a causa de obstrucción colestática o daño en los canalículos biliares; es decir, un defecto en la excreción de bilirrubina conjugada (Y. Yang et al., 2025).



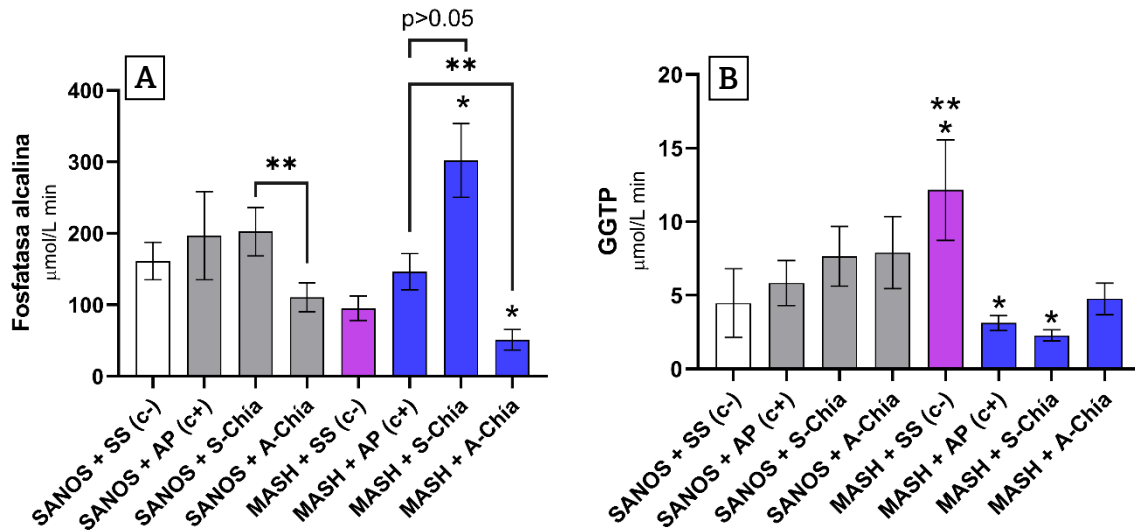
**Figura 31.** Niveles plasmáticos de bilirrubina total (A) y bilirrubina directa (B) de los grupos experimentales sanos y con esteatohepatitis (MASH) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+) o semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

La **Figura 32** muestra los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina y gama-glutamil transpeptidasa (GGTP) de los grupos sanos y con MASH suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla de chía (S-Chía) y aceite de chía (A-Chía). Los grupos sanos mostraron niveles de fosfatasa alcalina normales y consistentes, con excepción del grupo suplementado con chía, el cual mostró niveles estadísticamente inferiores ( $p < 0.05$ ) al grupo suplementado con S-Chía ( $110.60 \mu\text{mol/L/min}$ ), pero iguales al grupo SS y al grupo AP. La inducción de MASH modificó significativamente los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina en los grupos suplementados tanto con S-Chía, como con A-Chía. Entre los grupos inducidos con MASH, las concentraciones de fosfatasa del grupo S-Chía fueron superiores a las de los grupos SS ( $95.23 \mu\text{mol/L/min}$ ), AP ( $146.43 \mu\text{mol/L/min}$ ), y A-Chía ( $51.10 \mu\text{mol/L/min}$ ). El grupo MASH + A-Chía mostró los niveles más bajos de esta enzima ( $51.10 \mu\text{mol/L/min}$ ), los cuales fueron estadísticamente inferiores ( $p < 0.05$ ) a los del grupo suplementado con AP ( $146.43 \mu\text{mol/L/min}$ ). Esto sugiere cierta hepatoprotección del A-Chía. Los resultados de este estudio son diferentes a los reportados por Munir & Khan (2023), quienes tras la inducción de daño hepático utilizando el modelo de  $\text{CCl}_4$ , observaron incrementos drásticos de las enzimas hepáticas, incluyendo la fosfatasa alcalina. Estas discrepancias notables podrían explicarse por las particularidades entre método de inducción de MASH empleada por los autores de dicho estudio y el método utilizado en esta investigación. En el estudio de (Munir & Khan, 2023), los investigadores administraron  $\text{CCl}_4$  diluido durante 12 días vía oral a ratas albinas para inducir daño hepático. En contraste, en este estudio se utilizó una dosis única de  $\text{CCl}_4$  vía intragástrica.

En cuanto a los niveles de gama-glutamil transpeptidasa (GGTP), ninguno de los tratamientos mostró diferencias estadísticas (pero sí numéricas) entre los grupos sanos, siendo el grupo SS el que mostró los menores valores de GGTP ( $4.48 \pm 2.33 \mu\text{mol/L/min}$ ); La inducción de MASH modificó significativamente dichos niveles en todos los tratamientos. En el caso del grupo control- (SS), los niveles de GGTP se vieron notablemente incrementados ( $12.15 \mu\text{mol/L/min}$ ), mientras que, en los demás grupos, incluyendo S-Chía y A-Chía, se encontraron disminuciones importantes ( $2.28$  y  $4.77 \mu\text{mol/L/min}$ , respectivamente), las cuales fueron significativas con respecto a sus controles sanos en los

grupos AP y S-Chía. Aunque los estudios en modelos animales que sustenten la disminución de GGTP tras la suplementación con chía o aceites ricos en omega 3 como el AP y el A-Chía son escasos. Un par de metaanálisis de ensayos clínicos aleatorizados sustentan este hallazgo. El primer estudio, en el cual se incluyeron 10 ensayos clínicos llevados a cabo con pacientes que padecían MASLD/MASH, se encontró que la suplementación como omega-3 disminuyó eficientemente las concentraciones séricas de GGTP, además de otros parámetros sugerentes de daño hepático, e incluso el perfil lipídico de los pacientes se vio disminuido (Lu et al., 2016). En el segundo metaanálisis publicado recientemente, se incluyeron 20 ensayos clínicos aleatorizados que en total sumaban 1615 pacientes que padecían enfermedad hepática, y, aunque se observó alto nivel de heterogeneidad diagnóstica, la reducción de los niveles de GGTP tras la suplementación con omega-3 fue consistente en todos los estudios (S. J. Kim et al., 2025).

Dado que tanto el AP como la S-Chía y el A-Chía son ricos en omega-3, y que los resultados fueron similares entre estos 3 grupos, los resultados sugieren cierto grado de hepatoprotección medido como la concentración plasmática de GGTP, debido a la riqueza de ácidos grasos esenciales que mejoran la fluidez de la membrana celular.



**Figura 32.** Niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina (A) y gamma-glutamyl transpeptidasa (GGTP) (B) de los grupos experimentales sanos y con esteatohepatitis (MASH) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

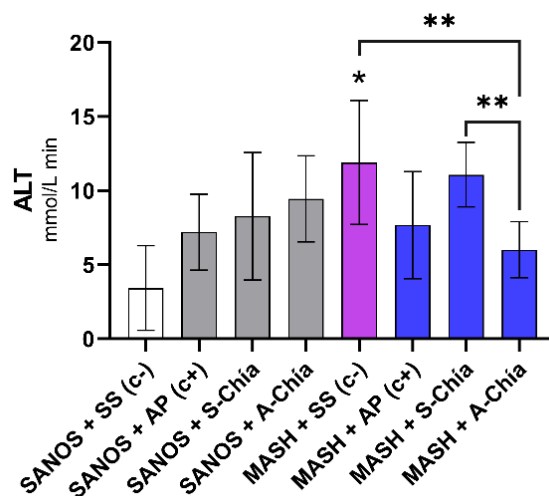
### Necrosis – Alanina aminotransferasa

La **Figura 33** muestra los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa (ALT) de los grupos sanos y con MASH suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla de chía (S-Chía) y aceite de chía (A-Chía). Aunque las concentraciones de ALT entre los grupos sanos se mostraron sin diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ), los niveles más bajos de esta enzima se observaron en el grupo control- SANOS+SS ( $3.43 \pm 2.86$  mmol/L/min). Por otro lado, tras la inducción de MASH con  $\text{CCl}_4$ , dicho grupo control (SANOS+SS) incrementó sustancialmente sus valores de ALT (de 3.43 a 11.91 mmol/L/min), mientras que los grupos AP, S-Chía y A-Chía se mantuvieron sin cambios importantes con respecto a sus controles sanos (7.67, 11.08, y 6.01 mmol/L/min, respectivamente). Entre los grupos con MASH se observaron diferencias entre el grupo control SS y el grupo suplementado con A-Chía, siendo este último el tratamiento que mostró los más bajos y mejores resultados ( $6.01 \pm 1.89$  mmol/L/min).

La hepatotoxicidad ocasionada por el  $\text{CCl}_4$  se debe a que el  $\text{CCl}_4$  es metabolizado por completo en el hígado por enzimas microsomales del citocromo P450 (CYP2E1), transformándolo en radicales libres, principalmente triclorometilo ( $\text{CCl}_3\bullet$ ) y peróxido triclorometilo ( $\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$ ), los cuales por su alta reactividad reaccionan con las proteínas y lípidos presentes en las membranas celulares de los hepatocitos, dañando la integridad celular y provocando la lisis celular que ocasiona la salida de enzimas citoplasmáticas como las transaminasas ALT y AST (Boll et al., 2001; H. Khalid, 2022). Ahora bien, la elevación de las transaminasas es una observación común en los modelos de  $\text{CCl}_4$ ; sin embargo, la severidad de dichas elevaciones es diferente entre modelos. En este estudio se observó una elevación de 3.5 veces los valores basales con respecto al control, lo cual sugiere un daño hepático moderado/bajo a causa del  $\text{CCl}_4$ , quizá debido a la administración de  $\text{CCl}_4$  en dosis única vía intragástrica, ya que otros autores que han utilizado la vía intraperitoneal han observado elevaciones en los niveles de transaminasas de hasta 400 veces los valores basales (F. W.-Y. Wong et al., 1998).

Sachi et al. (2024) evaluaron los efectos hepatoprotectores de la suplementación con 200 y 400 mg/kg de un extracto de semilla de chía y observaron disminuciones importantes de

las transaminasas ALT y AST de una manera dependiente de la dosis. Los autores sostienen que la riqueza en antioxidantes que contiene la semilla de chía como el ácido clorogénico y el ácido cafeico pudieron restablecer el balance redox, protegiendo la integridad de las membranas, lo cual evito la liberación de las transaminasas.



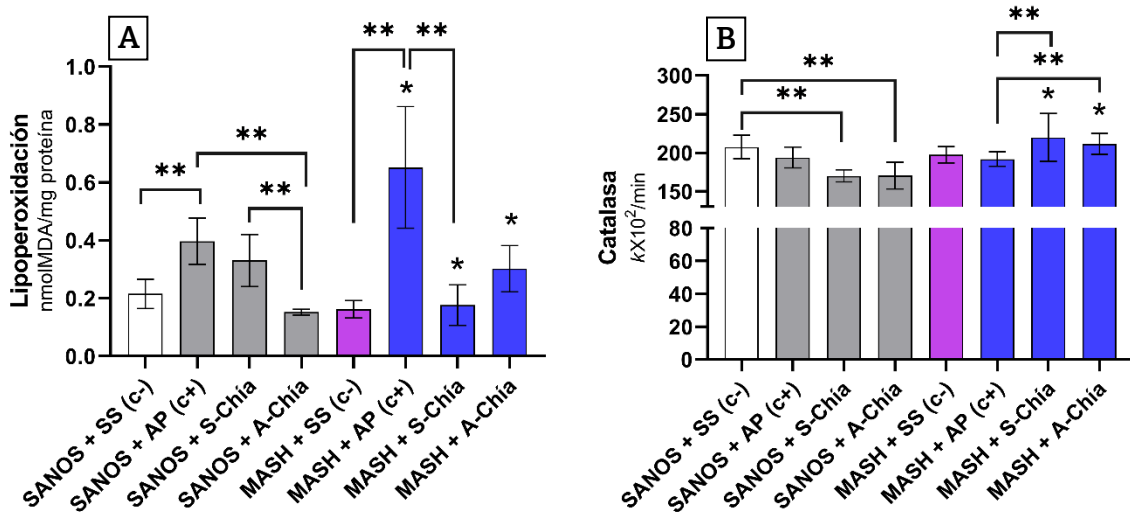
**Figura 33.** Niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa (ALT) de los grupos experimentales sanos y con esteatohepatitis (MASH) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

### Estrés oxidativo – Lipoperoxidación y catalasa

La **Figura 34** muestra los niveles hepáticos de lipoperoxidación y la actividad de la catalasa hepática de los grupos sanos y con MASH suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla de chía (S-Chía) y aceite de chía (A-Chía). Tanto los grupos sanos como los inducidos con MASH mostraron diferencias importantes según el tratamiento administrado. Primeramente, en los grupos de ratas sanas, los niveles basales de LPX en el grupo control (SANOS+SS) fueron bajos y similares al grupo suplementado con A-Chía, con el cual no mostraron diferencias estadísticas. Después, la suplementación con A-Chía disminuyó de mejor manera los niveles de LPX, seguido de S-Chía, y finalmente AP. Se observaron diferencias entre la suplementación con S-Chía y A-Chía, siendo A-Chía el mejor tratamiento para reducir la LPX en ratas sanas. La inducción de MASH con  $CCl_4$  no incrementó los niveles de MDA en el grupo control de MASH (SS); sin embargo, el grupo AP mostró incrementos importantes. Contrariamente, los grupos suplementados con S-Chía

y A-Chía mostraron disminuciones estadísticas de MDA con respecto a sus controles sanos. Por último, entre grupos con MASH, el grupo AP ( $0.652 \pm 0.210$  nmol MDA/mg proteína) fue estadísticamente superior ( $p < 0.05$ ) al grupo SS ( $0.162 \pm 0.030$  nmol MDA/mg proteína) y al grupo S-Chía, pero no al grupo A-Chía, aunque numéricamente A-Chía fue muy inferior ( $0.302 \pm 0.080$  nmol MDA/mg proteína) (**Figura 34A**).

La actividad de la catalasa hepática se observa en la **Figura 34B**. En los grupos sanos, los mayores valores de actividad de la catalasa se observaron en el grupo control ( $207.37 \pm 15.177$   $kx10^2/min$ ), los cuales fueron estadísticamente superiores ( $p < 0.05$ ) tanto a los del grupo suplementado con S-Chía ( $170.12 \pm 7.69$   $kx10^2/min$ ) como A-Chía ( $170.48 \pm 17.30$   $kx10^2/min$ ). Entre los grupos con MASH no se observó incremento en los niveles de catalasa en SS ( $197.44 \pm 10.61$   $kx10^2/min$ ) y AP ( $191.84 \pm 9.37$   $kx10^2/min$ ), pero si en S-Chía ( $219.89 \pm 30.80$   $kx10^2/min$ ) y A-Chía ( $211.50 \pm 13.54$   $kx10^2/min$ ); y estos incrementos fueron ambos estadísticamente superiores ( $p < 0.05$ ) al grupo MASH suplementado con AP.

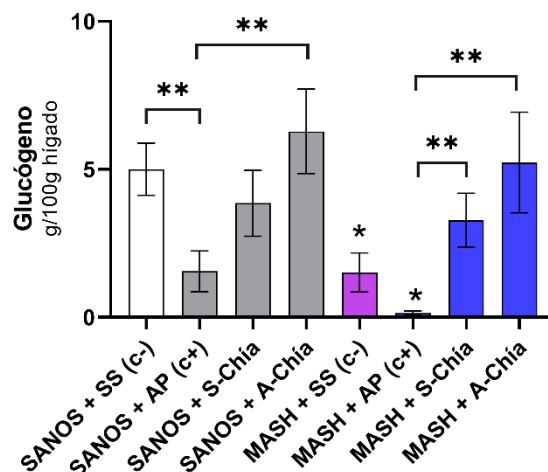


**Figura 34.** Niveles hepáticos de lipoperoxidación (**A**) y actividad de la catalasa hepática (**B**) de los grupos experimentales sanos y con esteatohepatitis (MASH) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

### Estrés fisiológico – Glucógeno

La **Figura 35** muestra los niveles hepáticos de glucógeno de los grupos sanos y con MASH suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla

de chía (S-Chía) y aceite de chía (A-Chía). Los niveles de glucógeno hepático mostraron el mismo comportamiento entre ratas sanas y con MASH. En el grupo control, los valores de glucógeno fueron de  $5.00 \pm 0.88$  g/100g. Estos resultados fueron similares a los observados en los grupos suplementados con fracciones de chía, es decir, S-Chía y A-Chía, pero diferentes estadísticamente al grupo suplementado con AP, el cual mostró los valores basales más bajos de glucógeno hepático ( $1.55 \pm 0.69$  g/100g). La inducción de MASH ocasionó una disminución estadística en el grupo control ( $1.51 \pm 0.66$  g/100g), y en el grupo suplementado con AP ( $0.14 \pm 0.07$  g/100g), con respecto a sus controles; sin embargo, tanto S-Chía ( $3.28 \pm 0.91$  g/100g), como A-Chía ( $5.23 \pm 1.70$  g/100g) impidieron la depleción de glucógeno tras la administración de  $\text{CCl}_4$  y se mantuvieron sin cambios con respecto a sus controles sanos.



**Figura 35.** Niveles hepáticos de glucógeno de los grupos experimentales sanos y con esteatohepatitis (MASH) suplementados con solución salina (SS, control-), aceite de pescado (AP, control+), semilla (S-Chía) o aceite de chía (A-Chía). \*Denota diferencias significativas entre un grupo inducido con DLP y su control sano (U de Mann-Whitney  $p < 0.05$ ). \*\*Denota diferencias significativas entre tratamientos sanos o inducidos con DLP (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

#### 6.2.2.4 Efectos de la suplementación sobre el tejido hepático

La **Figura 36** muestra el panel histológico de los grupos de ratas sanas y con DLP suplementados con los diferentes tratamientos.

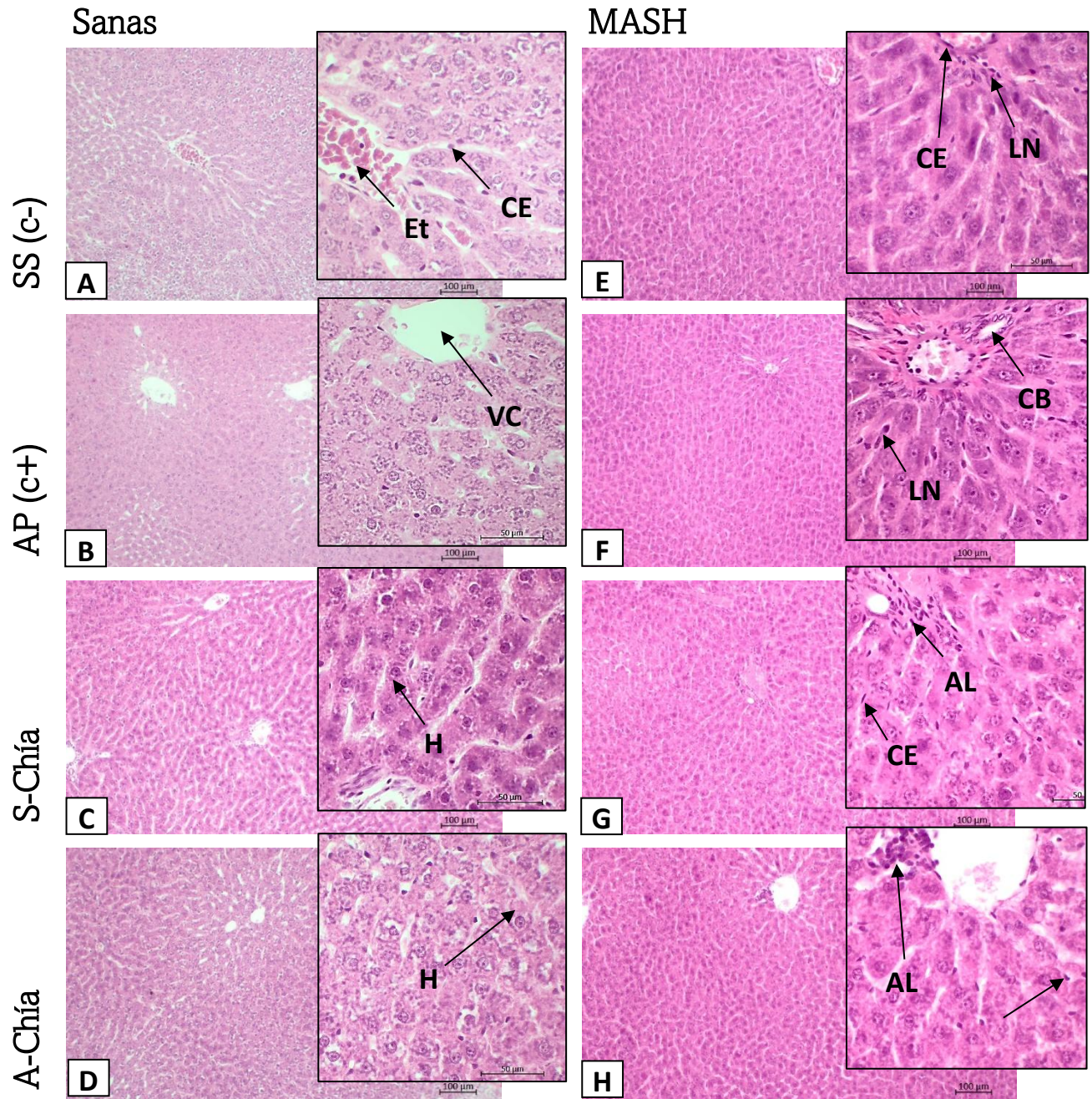


Figura 36. Cortes histológicas de hígado de ratas Wistar inducidas con MASH bajo tinción de hematoxilina/eosina. Flechas y texto en negro destacan morfología hepática normal.

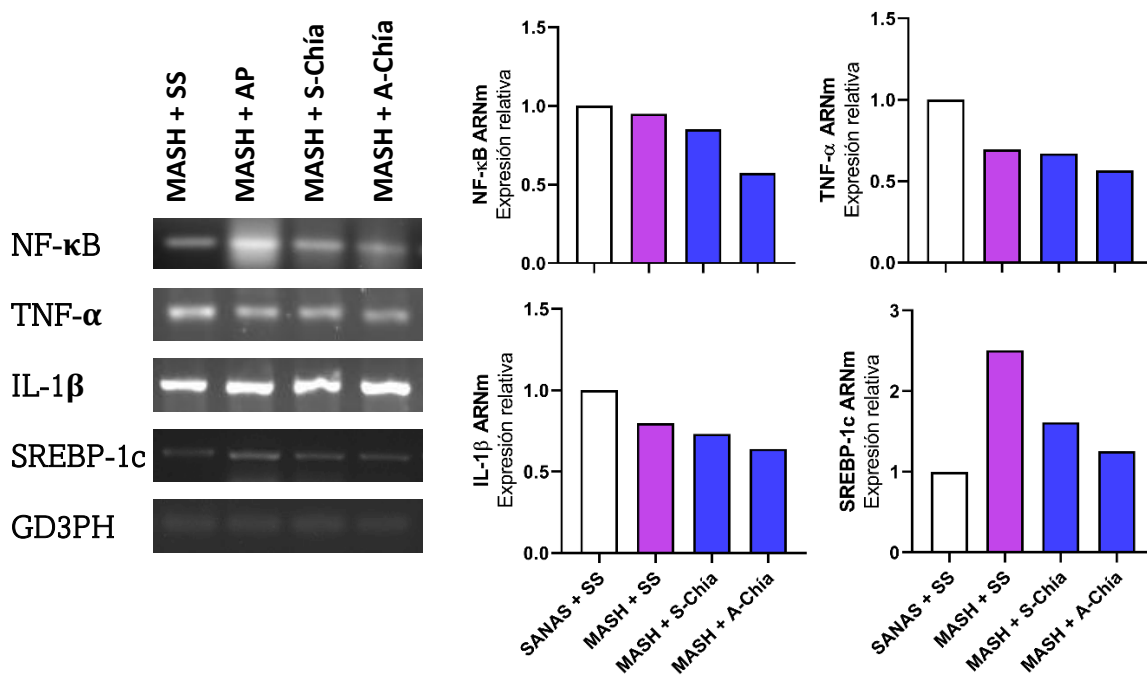
#### *6.2.2.5 Efectos sobre la expresión génica*

Los efectos de la suplementación con S-Chía y A-Chía sobre la expresión de genes en los roedores inducidos con MASH se muestran en la **Figura 37**. Primeramente, destaca el hecho de que ninguno de los genes inflamatorios evaluados incrementó tras la inducción de MASH con CCl<sub>4</sub> (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ ). Por otra parte, la suplementación con S-Chía disminuyó ligeramente los niveles de ARNm de los 3 genes inflamatorios, y el AA-Chía disminuyó dichos niveles un poco más. Juntamente con los resultados observados en el análisis histológico (**Figura 36**) y los biomarcadores sugestivos de MASH como el nivel de lipoperoxidación, la actividad de la catalasa y los niveles de ALT, los genes evaluados confirman que el modelo de MASH no fue completamente establecido con éxito. Las causas se discuten a continuación.

Como primer punto, en este estudio se utilizó un modelo de MASH acelerado, empleando el reactante CCl<sub>4</sub> como agente inductor de MASH, y no un modelo tradicional que mimetizara de mejor manera los patrones fisiopatológicos observados en la mayoría de los casos de MASH secundaria a MASLD. El uso de modelos acelerados de MASH permite la reducción sustancial del tiempo de montaje del modelo y acelera la obtención de resultados, permitiendo apearse a periodos de tiempo establecidos para los proyectos. Sin embargo, aunque dichos modelos son bien aceptados y arrojan resultados reproducibles y equiparables a los modelos tradicionales, ofrecen ciertas desventajas entre las cuales, la correcta implementación es a menudo un punto de inflexión importante. Analizando específicamente las condiciones empleadas en este estudio durante el montaje del modelo de MASH con CCl<sub>4</sub>, la vía de administración de CCl<sub>4</sub> se considera uno de los principales causantes del montaje inadecuado de este modelo acelerado de daño hepático.

A fin de averiguar si la inducción experimental de MASH con CCl<sub>4</sub> modificó el metabolismo lipídico hepático, en este estudio, además de la evaluación de genes inflamatorios, se evaluó la expresión de SREBP-1c, por ser un regulador clave de la homeostasis lipídica (Estefes-Duarte et al., 2024). Sorpresivamente, los niveles de ARNm incrementaron 2.5 veces tras la inducción de MASH (MASH + SS) con respecto al control (SANAS + SS), y la S-Chía disminuyó a 1.5 veces el valor del control, mientras que el A-Chía redujo dicha expresión a

niveles cercanos a los del grupo control sano. Aunque en el modelo de DLP la S-Chía mostró mejores resultados en la modulación de genes del metabolismo lipídico. En el modelo de MASH, el A-Chía fue más efectivo al reducir el ARNm de SREBP-1c. Esto puede deberse a diversas razones. En primer lugar, al observar la **Figura 30**, se puede observar que los niveles de colesterol son menores en el grupo MASH + S-Chía que en el grupo MASH + A-Chía; y en la **Figura 37** se observa que los niveles de ARNm de SREBP-1c fueron ligeramente mayores en MASH + S-Chía que en MASH + A-Chía. Considerando que SREBP es un factor de transcripción que puede regular su propia actividad transcripcional, según la cantidad de activadores (esteroles) en el medio, es posible que los niveles de ARNm de SREBP-1c observados en el modelo de MASH estén en función inversa de los niveles de colesterol encontrados en el plasma de los roedores. Por otro lado, también es posible que los compuestos bioactivos presentes tanto en la semilla como en el A-Chía hayan participado en la regulación negativa de SREBP-1C. Los fitoesteroles, los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación de la fibra dietética (abundante en S-Chía), así como el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) de la chía, son compuestos funcionales que cuentan con evidencia que respalda sus efectos inhibitorios sobre genes lipogénicos como SREBP (Sato, 2010).



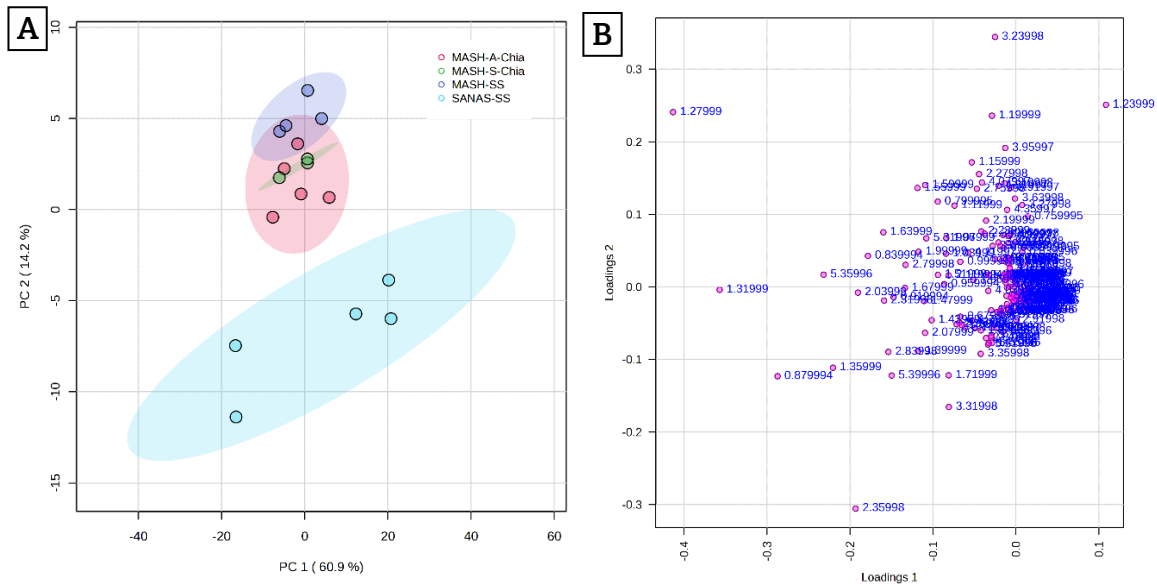
**Figura 37.** Efecto de la suplementación con S-Chía y A-Chía sobre la expresión de genes en roedores inducidos con MASH.

#### *6.2.2.6 Efectos sobre el lipidoma hepático*

Este trabajo también se propuso evaluar el efecto de la suplementación con S-Chía o A-Chía sobre el lipidoma hepático de los roedores inducidos con MASH, a fin de proponer posibles mecanismos de acción preventivos/terapéuticos. Para lograrlo, los espectros de RMN<sup>1</sup>H se apilaron para ser procesados y normalizados juntos en el programa de análisis químico MestreNova. Asimismo, a fin de facilitar el análisis multivariado, los espectros fueron transformados en “bins”, mediante un proceso conocido como “binning”, el cual tiene como propósito transformar la señales espectrales en números que puedan ser recolectados en una sola matriz de datos para poder llevar a cabo el análisis. La matriz de datos obtenida se normalizó mediante un escalado de Pareto y se procedió a la realización de un análisis de componentes principales (PCA), un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), y otros análisis necesarios para contestar interrogantes de este trabajo, de forma similar al procedimiento realizado con los grupos inducidos con DLP. Para el análisis de este modelo de MASH se utilizó la misma asignación del espectro que se usó en el análisis del modelo de DLP, la cual se puede revisar detalladamente en la **Figura 23**.

La **Figura 38** muestra el gráfico de puntajes del PCA, el cual destaca la proyección de los datos y evidencia la ausencia de valores atípicos. Se obtuvieron dos componentes principales, PC-1 y PC-2, a los cuales se pudo atribuir el 60.9% y el 14.2% de la varianza de los datos, respectivamente. El grupo control de ratas (SANAS + SS) se diferenció claramente del resto de grupos, ubicándose en la parte inferior del plot, y cruzando el eje Y, lo que implica que se extendió tanto por los valores negativos del PC-1 como por los positivos del mismo PC-1; sin embargo, se ubicó únicamente en el cuadrante de valores negativos del PC-2. Los grupos restantes, es decir MASH + SS, MASH + S-Chía y MASH + A-Chía, no se diferenciaron tan claramente uno del otro como el grupo de ratas sanas. Aun así, es posible observar una separación perceptible entre el grupo MASH + SS y el grupo MASH + A-Chía. El grupo suplementado con S-Chía quedó completamente embebido dentro del grupo suplementado con A-Chía, sugiriendo que los efectos de ambos tratamientos son indiferenciables, según esta proyección no supervisada. Por otro lado, el diagrama de cargas del PCA (**Figura 38B**) destaca las clases de lípidos responsables de la separación de los

grupos, principalmente de las ratas sanas con respecto a las inducidas con MASH. La zona central, es decir, la zona próxima al 0.0 del plot, muestra una alta aglutinación de variables, sugiriendo que la vasta mayoría de clases lipídicas no sufrieron modificaciones importantes tras la inducción de MASH o la suplementación con cualquiera de las fracciones de chía. Aun así, los desplazamientos a 3.24 ppm, 1.24 ppm, 1.20 ppm, y 3.96 ppm contribuyeron a la separación del grupo SANAS + SS hacia los valores positivos del PC-1; y los desplazamientos a 2.36, 1.32, y 0.88 ppm contribuyeron a la separación del mismo grupo SANAS + SS del resto de los grupos hacia los valores negativos de PC-1. Todos los grupos inducidos con MASH se mantuvieron próximos la zona cero del PC-1 y se orientaron levemente hacia la zona de valores positivos del PC-2. Únicamente los desplazamientos a 1.28 ppm parecieron contribuir claramente a dicha separación. La poca diferenciación de los grupos inducidos con MASH probablemente se debe a que el modelo de inducción de MASH con  $\text{CCl}_4$  utilizado en este estudio no es un modelo que genere MASH como consecuencia de la esteatosis hepática, sino un método directo que daña e inflama los hepatocitos sin causar hígado graso, es decir, sin afectar en gran medida los patrones lipídicos hepáticos.

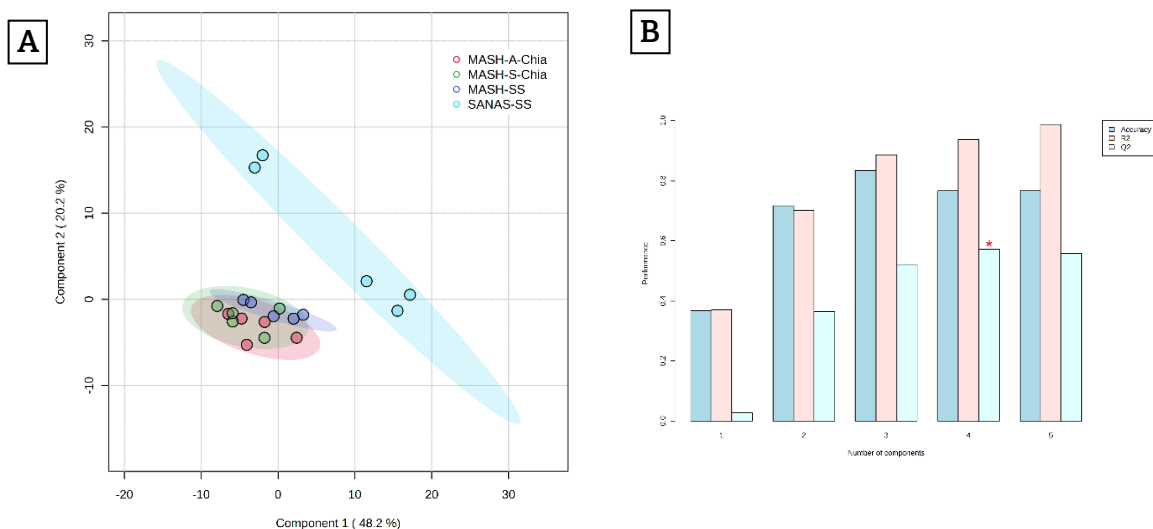


**Figura 38. (A)** Gráfico de puntuaciones del análisis de componentes principales del grupo control y los grupos con DLP suplementados con S-Chía o A-Chía. [PERMANOVA] Valor-F: 1.2246;  $R^2$ : 0.22033; valor p (basado en 999 permutaciones): 0.301. **(B)** Diagrama de cargas del PC-1 (eje X) y PC-2 (eje Y).

Después del análisis del comportamiento de los datos mediante el PCA, se realizó un PLS-DA para la generación de un modelo predictivo. Los resultados del PLS-DA y el comportamiento de los coeficientes de predicción ( $Q^2$ ,  $R^2$ , accuracy) se observan en la **Figuras 39A** y **39B**, respectivamente. El gráfico de puntajes del PLS-DA destaca la imposibilidad del modelo para discriminar con precisión los grupos inducidos con MASH. Esto se ve reflejado en los puntajes del PC-1 y PC-2 según el PLS-DA, los cuales fueron de 48.2 y 14.2%, respectivamente. El PC-1 es el componente que mejor describe la varianza de los datos. Dichos valores son menores a los observados en el PCA. La **Figura 39B** muestra los coeficientes de predicción del PLS-DA. Se puede observar que el PC-1 mostró valores bajos de  $Q^2$  (0.02689); sin embargo, dicho valor incrementó a medida que se incrementó el número de componentes principales hasta llegar a cuatro PCs; y comenzó a descender en el PC-5, lo cual sugiere que el modelo a partir de cinco PCs empieza a estar sobreajustado. Por ello, en este análisis se seleccionaron cuatro PCs en lugar de dos.

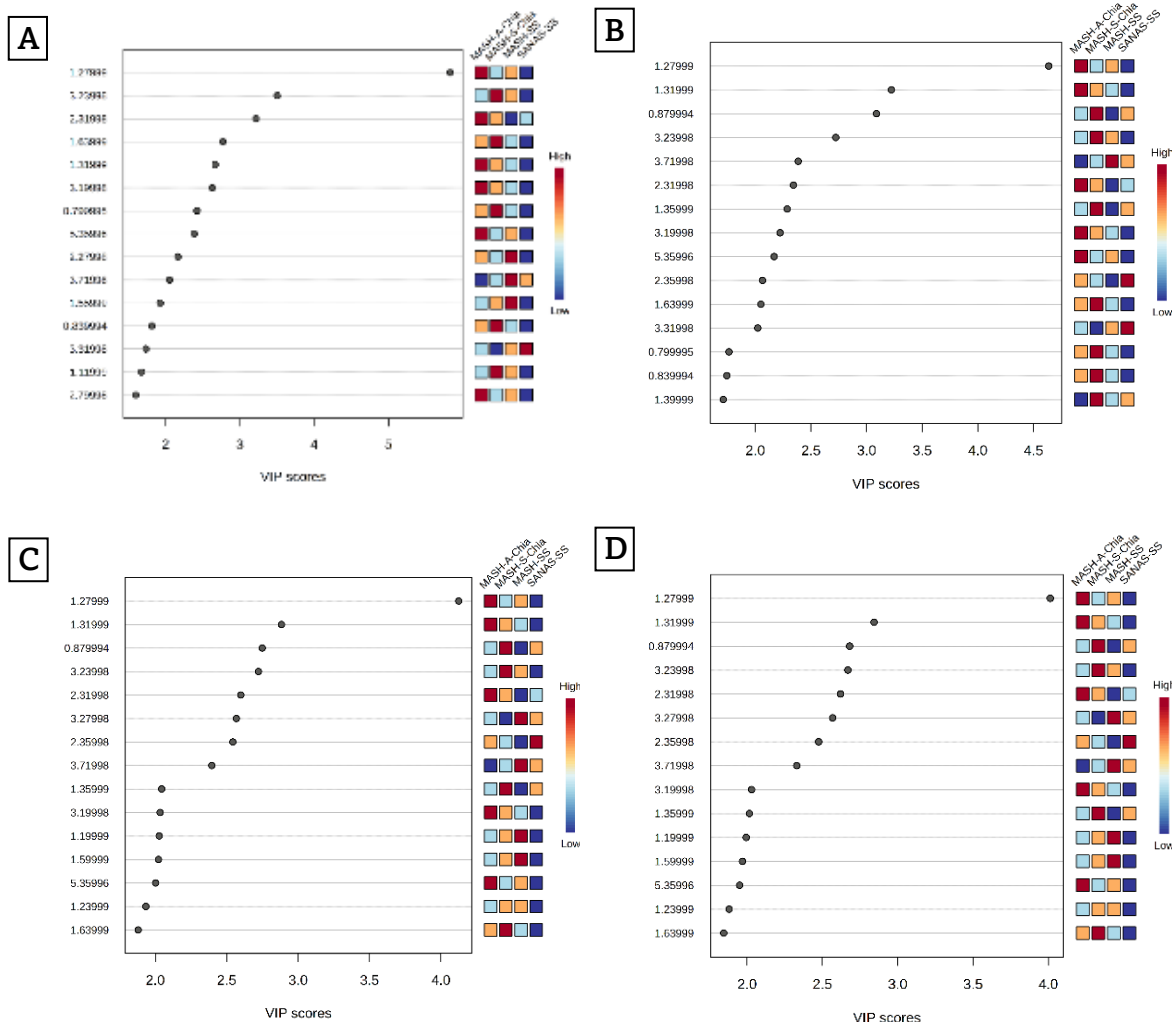
Los valores de  $Q^2$  para los PC-2, PC-3, PC-4, y PC-5 fueron de 0.36466, 0.52134, 0.5715, y 0.55744, respectivamente. Por otra parte, los valores de  $R^2$  para los PC-1 - PC-5 fueron de 0.37077, 0.70121, 0.88626, 0.93684, y 0.98746, respectivamente. Por último, los valores de exactitud (accuracy) del modelo, es decir, el porcentaje de muestras que el modelo logró predecir correctamente fueron de 0.3666 (o 36 %) para el PC-1, de 0.7166 (u 71.6 %) para el PC-2, 0.8333 (83%) para PC-3, 0.76667 (76%) para PC-4, y 0.76667 (76%) para PC-5, siendo el PC-3 el que mostró los mayores valores de  $R^2$ . El estadístico  $Q^2$  se considera el parámetro diagnóstico estándar para la validación de modelos PLS-DA en estudios de metabolómica. Este indicador se calcula a partir del error existente entre la variable categórica estimada ( $\hat{y}$ ) y la variable real observada ( $y$ ). Dicho error de predicción se acumula para todas las muestras, obteniéndose el valor PRESS (Predicted Residual Sum of Squares), el cual posteriormente se compara con la suma total de cuadrados (TSS) (Szymańska et al., 2012). Debido a que el estadístico  $Q^2$  mide el desempeño predictivo del modelo mediante validación cruzada, valores elevados de  $Q^2$  (cercanos a 1) indican mayor capacidad de predicción y mejor desempeño al aplicarse a datos nuevos, por lo que funciona como un indicador de la confiabilidad del modelo más allá del conjunto de

entrenamiento. Triba et al. (2015) mencionan que modelos con valores de  $Q^2 \geq 0.5$  pueden considerarse buenos modelos predictivos. En este estudio el análisis PLS-DA con 4 componentes permite clasificar a nuestro modelo con capacidad predictiva moderada/buena.  $R^2$ , por su parte, únicamente refleja la proporción de variabilidad explicada, por lo que es un estadístico con menor peso a la hora de la evaluación de modelos de predicción por PLS-DA (Mickiewicz et al., 2013).



**Figura 39. (A)** Gráfico de análisis discriminante de últimos cuadrados parciales (PLS-DA). **(B)** Coeficientes de predicción de 5 componentes principales del grupo control y los grupos con DLP suplementados con S-Chía o A-Chía.

La **Figura 40** muestra las variables con mayores puntajes VIP en cada uno de los cuatro componentes principales seleccionados para este modelo; es decir, los desplazamientos químicos (clases de lípidos) que contribuyeron en mayor medida a la discriminación de los grupos experimentales.

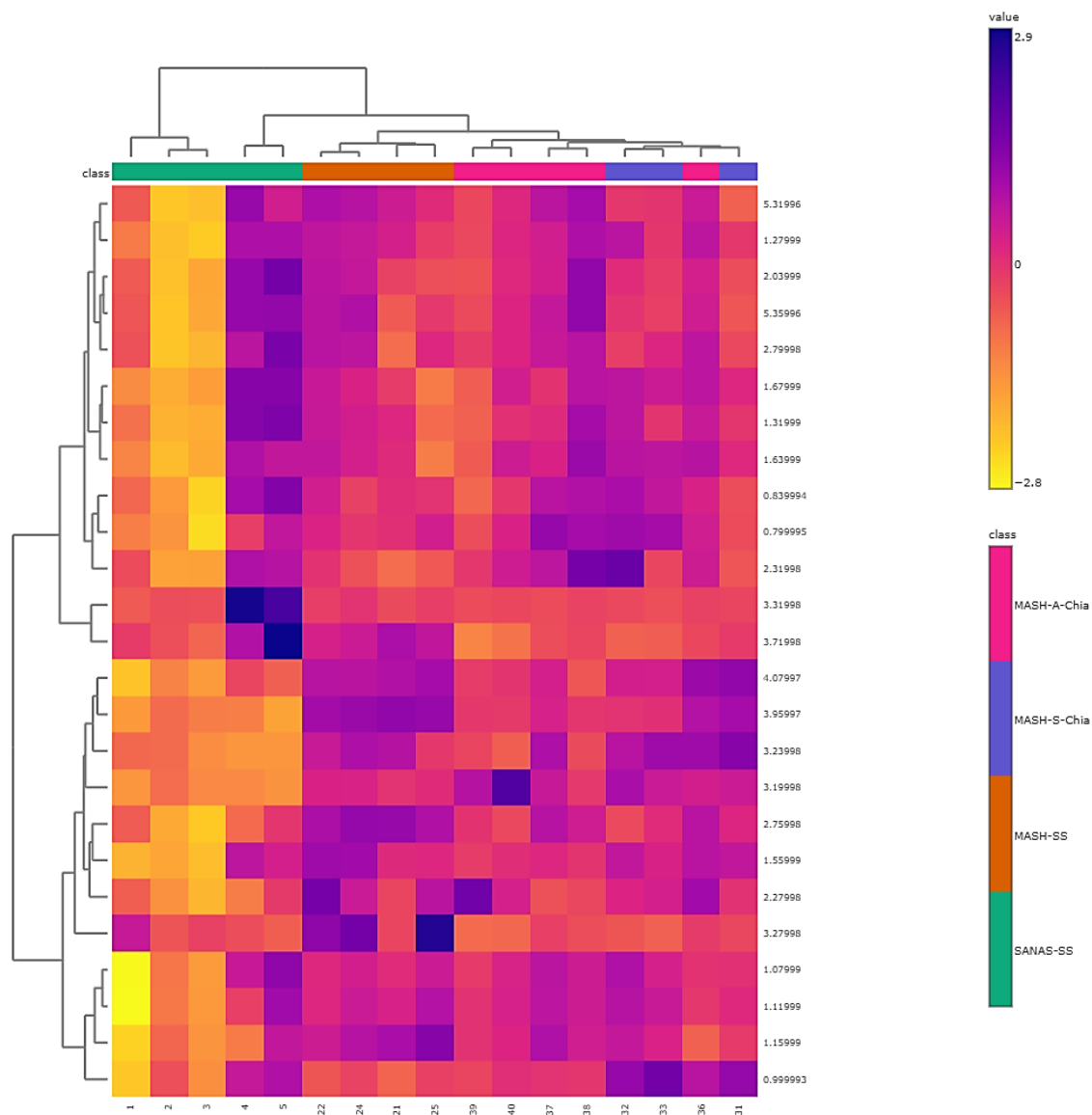


**Figura 40.** Importancia de la variable para la predicción (Vip scores, Variable Importance for Projection) del (A) PC-1, (B) PC-2, (C) PC-3, y (D) PC-4 seleccionados para el modelo predictivo.

Al comparar los desplazamientos químicos más significativos, en los cuatro componentes destaca la presencia recurrente de las siguientes señales: 1.27–1.32 ppm ( $-[CH_2]n-$ ) de cadenas largas, propias de ácidos grasos saturados en TGs predominantemente); 0.87–0.89 ppm ( $-CH_3$  terminales de ácidos grasos totales [TGs, DGs, AGLs]); 2.31–2.38 ppm ( $-CH_2-\alpha$  al carbonilo, característicos de TGs y fosfolípidos [PLs]); 3.19–3.24 ppm ( $-N^+[CH_3]_3$ , presentes en moléculas que contienen colina [fosfatidilcolina PC, esfingomielina SM]); 1.63–1.64 ppm ( $-CH_2-\beta$  al carbonilo, comunes en ésteres de ácidos grasos); 1.35–1.36 ppm (Metenos  $\beta$  de TGs o fosfolípidos). Según se observa, las señales predominantes corresponden a TGs, MUFAs, PUFAs, y PLs con grupos colina (PC, SM). Esto indica que la discriminación multivariada está fuertemente impulsada por cambios en el contenido total

de lípidos neutros, la estructura de las cadenas acilo, y el metabolismo de fosfolípidos de membrana, lo cual consistentemente puede atribuirse al modelo de  $\text{CCl}_4$ , puesto que el metabolismo hepático del  $\text{CCl}_4$  genera triclorometilo, un radical altamente inestable que genera daño a los fosfolípidos de membrana (Boll et al., 2001; Munir & Khan, 2023; Weber et al., 2003). Apoyando estos resultados en los hallazgos bioquímicos e histológicos se concluye que, aunque dicho daño no fue sustancial, si tuvo un impacto en los grupos lipídicos hepáticos, especialmente los membranales.

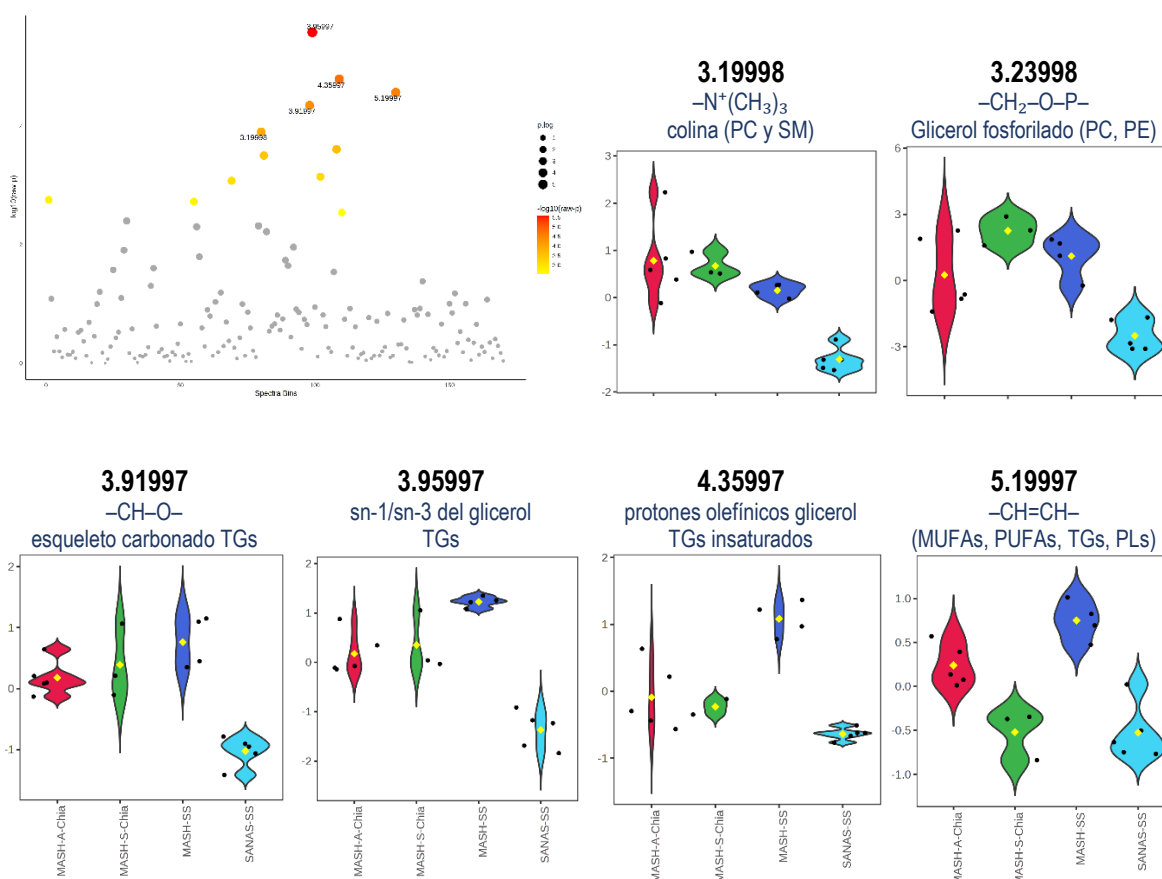
Continuando con el análisis, los desplazamientos con mayores puntajes VIP se utilizaron para construir un mapa de calor de agrupamiento o “clustering heatmap” (**Figura 41**) basado en z-scores, a fin de caracterizar el contenido relativo de lípidos de cada muestra y su regulación positiva o negativa con respecto al control. En la imagen, los recuadros color naranja o amarillo indican clases lipídicas disminuidas y los recuadros oscuros violetas o azules indican lípidos sobrerregulados. Destaca el agrupamiento adecuado de las muestras en cada grupo. Los grupos sanos reflejan un menor contenido relativo de lípidos, mientras que la inducción de MASH incrementó dicho contenido. Después del tratamiento con S-Chía o A-Chía no se observó una disminución marcada del contenido relativo de lípidos con respecto al grupo MASH + SS; sin embargo, se observa que ambos tratamientos se agruparon juntos, apoyando las observaciones del PCA y PLS-DA que denotaban una pobre variabilidad biológica entre los grupos suplementados con S-Chía o A-Chía, sugiriendo que los efectos preventivos de la S-Chía y el A-Chía son equivalentes bajo este enfoque.



**Figura 41.** Heatmap construido a partir de los z-scores de las variables con mayor VIP score ( $>1$ ). En cada columna se observa cada una de las muestras y en las filas se ubican las variables (desplazamientos químicos) de importancia (top 25). Los recuadros con colores más violetas o azules destacan los grupos lipídicos sobrerregulados según su desplazamientos químicos, y los recuadros con colores más cercanos al amarillo denotan grupos lipídicos regulados a la baja en el hígado de ratas Wistar suplementados con S-Chía, A-Chía.

El mapa de calor y los análisis anteriores mostraron ciertas diferencias entre el grupo de ratas sanas y los grupos con MASH, mientras que la suplementación con fracciones de chía mostró resultados discretos en la modificación de las firmas de lípidos. A fin de averiguar cuales, de dichas diferencias, aunque sutiles, eran estadísticamente significativas, se realizó un ANOVA de las 170 variables estudiadas. El análisis reconoció 12 variables como

significativas y 158 como no significativas. La **Figura 42** muestra los resultados de dicho análisis, y algunos violin plots de las variables con mayor significancia estadística (marcadas en colores amarillo, naranja y rojo en el gráfico de ANOVA). En la parte superior de cada violin plot se encuentra el desplazamiento químico significativo, la asignación espectral, y la clase lipídica a la cual pertenece dicho grupo funcional. Asimismo, en cada violín, el ancho del elemento gráfico denota la distribución de intensidad. Los puntos negros son las observaciones, y el punto amarillo central, la media. Además, los valores positivos sugieren mayor abundancia relativa y los valores negativos menor abundancia de esa clase lipídica.

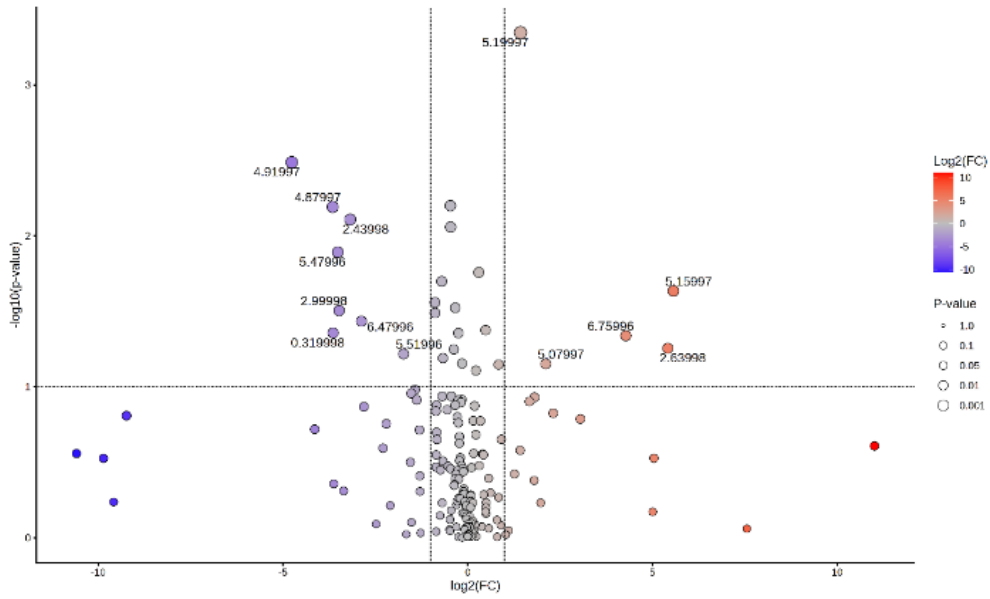


**Figura 42.** ANOVA que muestra las señales de grupos lipídicos que estadísticamente diferencian a los grupos en estudio. Los puntos con colores rojos o cercanos al rojo destacan desplazamientos químicos significativos. Los puntos grises y más pequeños no son significativos para el modelo. A la derecha se observan 6 violin plots de los principales desplazamientos químicos con diferencia estadística entre grupos según el ANOVA ( $p=0.05$ ). MUFAs – Ácidos grasos monoinsaturados; PC – Fosfatidilcolina; PE – Fosfatidiletanolamina; PLs – Fosfolípidos; PUFAs – Ácidos grasos poliinsaturados; SM - Esfingomielina; TGs – Triglicéridos

El grupo control SANAS + SS mostró la menor abundancia relativa en todas las clases de lípidos, mientras que el grupo MASH + SS presentó el mayor incremento en señales asociadas a TGs e insaturación lipídica. Los grupos suplementados con chía mostraron patrones intermedios, sugiriendo posible efecto modulador sobre metabolismo lipídico y fosfolípidos de membrana que pudieron alterarse a causa de la inflamación inducida por CCl<sub>4</sub>, la cual fue bastante sutil tanto en el análisis histológico como en el análisis molecular de genes proinflamatorios.

Como último punto del análisis, se quiso averiguar cuales señales químicas mostraban efectos estadísticamente diferenciales entre los grupos suplementados con S-Chía y A-Chía e inducidos con MASH. Para ello se realizó un análisis Fold Change y una prueba T entre ambas muestras, y los resultados de dichos análisis se utilizaron para construir un gráfico de volcán (volcano plot) que permite una visualización clara de las señales diferenciadas. La **Figura 43** muestra los resultados obtenidos en dichos análisis. Las señales incrementadas se observan en los valores positivos del Fold Change (a la derecha del plot, en color rojo), y las señales disminuidas se observan en los valores negativos del eje X (a la izquierda del plot en color azul/morado). Por otro lado, las señales que estadísticamente diferencian a los grupos suplementados con S-Chía de los suplementados con A-Chía se ubican por encima de la línea trazada en  $-\log_{10}(\text{valor } p) = 1$ , a la izquierda o a la derecha. Los puntos centrales en color gris son la mayoría de las señales asociadas a lípidos que no cambiaron significativamente entre tratamientos. Según este análisis estadístico, las clases de lípidos significativamente aumentados se ubicaron en: 2.63 ppm, correspondientes a protones bisalílicos, es decir en PUFAs; 5.07 ppm, 5.15 ppm y 5.19 ppm, las cuales se asocian con insaturaciones y protones olefínicos de ácidos grasos insaturados y TGs; 6.75 ppm, posiblemente asociadas a compuestos oxidativos. Por otro lado, las señales significativamente disminuidas fueron: 4.8–4.9 ppm, atribuidas al esqueleto del glicerol (presente en TGs y fosfolípidos); 2.43 ppm, propias de los metilenos ( $-\text{CH}_2$ )  $\alpha$  al carbonilo, los cuales se asocian con fosfolípidos y TGs igualmente, sugiriendo alteraciones en la membrana de los hepatocitos; dichos daños podrían ser mediados principalmente por

procesos oxidativos derivados de la administración de  $\text{CCl}_4$  que la suplementación no pudo mitigar por completo.



**Figura 1.** Volcano plot construido a partir de los valores de Fold Change y valor p que compara señales asociadas a especies lipídicas estadísticamente diferenciadas entre los grupos MASH + A-Chía vs MASH + S-Chía.

## 7. Conclusiones

Tanto la semilla de chía integra (SCI) como el aceite de chía (A-Chía) mostraron equivalentes y elevados contenidos de ALA y PUFAs, pero la semilla tuvo mayor capacidad antioxidante que el A-Chía bajo todos los métodos de análisis. La proporción omega-6:omega-3 se mejoró drásticamente en DE después de la reformulación con semilla de chía (dieta S-Chía).

### Dislipidemia

Ni S-Chía ni A-Chía causaron efectos negativos en animales sanos. Además, la DLP aguda no ocasionó esteatosis hepática ni daños severos al hígado. S-Chía mejoró todo el perfil lipídico y a nivel hepatofuncional disminuyó GGTP y evitó la lipoperoxidación. Los efectos de S-Chía y A-Chía sobre la arquitectura hepática fueron similares y sutiles pero comparables a los de AP.

A nivel molecular, S-Chía redujo la lipogénesis mediada por SREBP-1C e incrementó la oxidación de ácidos grasos mediada por PPAR- $\alpha$ ; al mismo tiempo que redujo levemente la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B sin afectar a PPAR- $\gamma$ . Por su parte, A-Chía mostró la misma tendencia, pero con efectos más sutiles que S-Chía. Según sugiere el análisis lipidómico, la suplementación con ambas fracciones de chía ocasionó una redistribución de ácidos grasos y una modificación al perfil de instauración de estos. Además, ambas fracciones incrementaron la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y ralentizaron la lipogénesis *de novo*, lo cual sustenta fuertemente los efectos de las fracciones de chía sobre la expresión génica. Por último, no hubo diferencias importantes entre la regulación positiva o negativa de señales químicas entre S-Chía y A-Chía, pero S-Chía pudo diferenciarse más del control que A-Chía, por lo que S-Chía puede considerarse la mejor opción preventiva/terapéutica en contextos de DLP, por encima de A-Chía y probablemente sobre AP.

### MASH

Ni S-Chía ni A-Chía mostraron efectos importantes sobre el perfil lipídico, pero AP si los tuvo. S-Chía incrementó los niveles de fosfatasa alcalina mientras que A-Chía los redujo. AP, S-Chía y A-Chía redujeron algunos marcadores de colestasis de igual manera. Aunque A-Chía redujo ALT, ninguna fracción tuvo efectos sobre los niveles de lipoperoxidación o la actividad de la catalasa, pero ambas evitaron la depleción de glucógeno. Asimismo, ambas fracciones tuvieron efectos benéficos sutiles sobre la arquitectura hepática.

A nivel molecular, A-Chía redujo mejor la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y la lipogénesis mediada por SREBP-1c que S-Chía. El análisis lipidómico reveló efectos mínimos de la suplementación sobre las firmas lipídicas en MASH, lo cual fue congruente con el análisis bioquímico. En general, la discriminación multivariada estuvo fuertemente impulsada por cambios en el contenido total de lípidos neutros, la estructura de las cadenas acilo, y el metabolismo de fosfolípidos de membrana, lo cual puede atribuirse al daño generado por CCl<sub>4</sub>. A-Chia mostró mejores efectos preventivos sobre la alteración de lípidos hepáticos y S-Chía mostró efectos más modestos que se ubicaron por encima del grupo control MASH + SS, pero por debajo del grupo suplementado con A-Chía. En general, después de todo el conjunto de análisis se puede concluir que la suplementación con A-Chía pareció ser mejor combatiendo la desregulación estructural y funcional hepática ocasionada por la MASH experimental, pero S-Chía tuvo efectos benéficos que también merecen destacarse.

## 8. Referencias

- Abd El-Kader, S. M., & El-Den Ashmawy, E. M. S. (2015). Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World Journal of Hepatology*, 7(6), 846–858.  
<https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.846>
- Abdou, H. M., Yousef, M. I., & Newairy, A. A. (2018). Triton WR-1339-induced hyperlipidemia, DNA fragmentation, neurotransmitters inhibition, oxidative damage, histopathological and morphometric changes: the protective role of soybean oil. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-018-0065-z>
- Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. In *BBA Clinical* (Vol. 5, pp. 85–100). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
- Ahmed, A. Z., Mumbrekar, K. D., Satyam, S. M., Shetty, P., D'Souza, M. R., & Singh, V. K. (2021). Chia seed oil ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in female wistar rats: an electrocardiographic, biochemical and histopathological approach. *Cardiovascular Toxicology*, 21, 533–542.
- Aitken, R. J., Wingate, J. K., De Iuliis, G. N., Koppers, A. J., & McLaughlin, E. A. (2006). Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(10), 4154–4163. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1309>
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131(33), 11751–11761.  
<https://doi.org/10.1021/ja9018572>
- Alcocer, L., & García de León, A. (2013). Guía de tratamiento farmacológico de dislipidemias para el primer nivel de atención. *Revista Mexicana de Cardiología*, 24(3), 103–129. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmc/v24n3/v24n3a1.pdf>
- Anandhi, R., Annadurai, T., Anitha, T. S., Muralidharan, A. R., Najmunnisha, K., Nachiappan, V., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2013). Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of

an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(2), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0215-6>

Arefhosseini, S., Parimi, M., Tutunchi, H., & Ebrahimi-Mameghani, M. (2025). The effects of salvia hispanica (chia seeds) on insulin sensitivity, hematological inflammatory indices and liver function in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrition and Metabolism*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-025-01012-0>

Argüeso Armesto, R., Díaz Díaz, J., Díaz Peromingo, J., Rodríguez González, A., & Castro Mao, M. (2011). *Lípidos, colesterol y lipoproteínas Lipids, cholesterol and lipoproteins*.

Arrobas Velilla, T., Guijarro, C., Campuzano Ruiz, R., Rodríguez Piñero, M., Valderrama Marcos, J. F., Pérez Pérez, A., Botana López, M. A., Morais López, A., García Donaire, J. A., Obaya, J. C., Castilla Guerra, L., Pallares Carratalá, V., Egocheaga Cabello, I., Salgueira Lazo, M., Castellanos Rodrigo, M. M., Mostaza Prieto, J. M., Gómez Doblas, J. J., & Buño Soto, A. (2023). Consensus document for lipid profile determination and reporting in Spanish clinical laboratories. What parameters should be included in a basic lipid profile? *Nefrología*, 43(4), 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2023.02.002>

Askin, S., & Umudum, F. Z. (2024). Assessing lipid-lowering and plasma cholesteryl ester transfer protein activity of *Centranthus longiflorus* and  $\beta$ -Sitosterol following administration to triton WR1339- treated rats. *Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4471>

Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Vol. 11). The Association.

Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25(11), 995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.09.013>

Banaszak, M., Dobrzyńska, M., Kawka, A., Górna, I., Woźniak, D., Przysławski, J., & Drzymała-Czyż, S. (2024). Role of Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) as modulatory and anti-inflammatory agents in noncommunicable diet-related

- diseases – Reports from the last 10 years. In *Clinical Nutrition ESPEN* (Vol. 63, pp. 240–258). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2024.06.053>
- Barquera, S., & Campos, I. (2009). *Dislipidemias: epidemiología, evaluación, adherencia y tratamiento*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Bartlett, K., & Eaton, S. (2004). Mitochondrial  $\beta$ -oxidation. In *European Journal of Biochemistry* (Vol. 271, Number 3, pp. 462–469). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 239).
- Berberich, A. J., & Hegele, R. A. (2022). A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocrine Reviews*, 43(4), 611–653. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab037>
- Bereda, G. (2022). Pathophysiology and Management of Dyslipidaemia. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 43(2). <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2022.43.006869>
- Boll, M., D Weber, L. W., Becker, E., & Stampfl, A. (2001). Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. In *Z. Naturforsch. 56c* (Vol. 6). [www.znaturforsch.com](http://www.znaturforsch.com)
- Bougarne, N., Weyers, B., Desmet, S. J., Deckers, J., Ray, D. W., Staels, B., & De Bosscher, K. (2018). Molecular actions of PPAR $\alpha$  in lipid metabolism and inflammation. In *Endocrine Reviews* (Vol. 39, Number 5, pp. 760–802). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00064>
- Bowers Jr, G. N., & McComb, R. B. (1966). A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clinical Chemistry*, 12(2), 70–89.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2009). Cholesterol feedback: From Schoenheimer’s bottle to Scap’s MELADL. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 50, Number SUPPL.). <https://doi.org/10.1194/jlr.R800054-JLR200>

- Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., & Bacon, B. R. (1999). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging The Histological Lesions. *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 94(9).  
[https://journals.lww.com/ajg/fulltext/1999/09000/nonalcoholic\\_steatohepatitis\\_\\_a\\_proposal\\_for.31.aspx](https://journals.lww.com/ajg/fulltext/1999/09000/nonalcoholic_steatohepatitis__a_proposal_for.31.aspx)
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302–310). Elsevier.
- Carvajal, C. C. (2019). *BILIRRUBINA: METABOLISMO, PRUEBAS DE LABORATORIO E HIPERBILIRRUBINEMIA*. 36(1).
- Cassiana Paiz, R., Irene Juárez-Flores, B., Rogelio Aguirre Rivera, J., Cecilia Cárdenas Ortega, N., Antonio Reyes Agüero, J., García Chávez, E., & Álvarez Fuentes, G. (2010). Glucose-lowering effect of xoconostle (*Opuntia joconostle* A. Web., Cactaceae) in diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(22), 2326–2333.  
<https://doi.org/10.5897/JMPR10.294>
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., & Sanyal, A. J. (2017). *The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases*.  
<https://doi.org/10.1002/hep.29367/supinfo>
- Chalmeh, A., Rahmani Shahraki, A., Heidari, S. M. M., Badiei, K., Pourjafar, M., Nazifi, S., & Zamiri, M. J. (2016). The comparative efficacy of tyloxapol versus pentoxifylline against induced acute phase response in an ovine experimental endotoxemia model. *Inflammopharmacology*, 24(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s10787-015-0257-9>
- Cohen, G., Dembiec, D., & Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34(1), 30–38.
- Cornejo-Tenorio, G., & Ibarra-Manríquez, G. (2025). De la semilla al sorbo: la historia secreta de la chía y sus primas. *Revista Digital Universitaria*, 26(4).  
<https://doi.org/10.22201/ceide.16076079e.2025.26.4.9>

- Cortes, V. A., Busso, D., Maiz, A., Arteaga, A., Nervi, F., & Rigotti, A. (2014). Physiological and pathological implications of cholesterol. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 19).
- Cunningham, R. P., Moore, M. P., Moore, A. N., Healy, J. C., Roberts, M. D., Rector, R. S., & Martin, J. S. (2018). Curcumin supplementation mitigates NASH development and progression in female Wistar rats. *Physiological Reports*, *6*(14).  
<https://doi.org/10.14814/phy2.13789>
- Cusi, K., Abdelmalek, M. F., Apovian, C. M., Balapattabi, K., Bannuru, R. R., Barb, D., Bardsley, J. K., Beverly, E. A., Corbin, K. D., Elsayed, N. A., Isaacs, S., Kanwal, F., Pekas, E. J., Richardson, C. R., Roden, M., Sanyal, A. J., Shubbrook, J. H., Younossi, Z. M., & Bajaj, M. (2025). Metabolic Dysfunction–Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) in People With Diabetes: The Need for Screening and Early Intervention. A Consensus Report of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, *48*(7), 1057–1082.  
<https://doi.org/10.2337/dci24-0094>
- da Cunha de Sá, R. D. C., Simão, J. de J., da Silva, V. S., de Farias, T. M., Cruz, M. M., Antraco, V. J., Armelin-Correa, L., & Alonso-Vale, M. I. (2021). Fish oil enriched in epa, but not in dha, reverses the metabolic syndrome and adipocyte dysfunction induced by a high-fat diet. *Nutrients*, *13*(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu13030754>
- da Silva, B. P., Dias, D. M., de Castro Moreira, M. E., Toledo, R. C. L., da Matta, S. L. P., Lucia, C. M. Della, Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2016). Chia Seed Shows Good Protein Quality, Hypoglycemic Effect and Improves the Lipid Profile and Liver and Intestinal Morphology of Wistar Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, *71*(3), 225–230.  
<https://doi.org/10.1007/s11130-016-0543-8>
- D’Alessandro, M. E., Lombardo, Y. B., & Chicco, A. (2002). Effect of dietary fish oil on insulin sensitivity and metabolic fate of glucose in the skeletal muscle of normal rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *46*(3–4), 114–120.
- Dasilva, G., Pazos, M., García-Egido, E., Gallardo, J. M., Rodríguez, I., Cela, R., & Medina, I. (2015). Healthy effect of different proportions of marine  $\omega$ -3 PUFAs EPA and DHA

- supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1385–1392.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.007>
- Davari\_Sani, S. J., Seyed, ;, Beheshti-Nasr, M., Pejhan, A., Seyedeh, ;, Seyedi, Z., & Abedi, A. (2024). The Effect of Lavender on Lipid Profile Davari\_Sani et al Effects of Hydroalcoholic Lavender Extract on Lipid Profiles and Liver Enzymes in Rats Fed a High-Fat Diet. In *Iranian Heart Journal* (Vol. 25, Number 4).
- Day, C. P., & James, O. F. W. (1998). Steatohepatitis: a tale of two “hits”? In *Gastroenterology* (Vol. 114, Number 4, pp. 842–845). Elsevier.
- de Falco, B., Amato, M., & Lanzotti, V. (2017). Chia seeds products: an overview. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 16, Number 4, pp. 745–760). Springer Netherlands.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-017-9511-7>
- de Miranda, D. A., Pinheiro da Silva, F., Carnier, M., Mennitti, L. V., Figuerêdo, R. G., Hachul, A. C. L., Boldarine, V. T., Neto, N. I. P., Seelaender, M., Ribeiro, E. B., Oller do Nascimento, C. M., Carnier, J., & Oyama, L. M. (2019). Chia flour (*Salvia hispanica* L.) did not improve the deleterious aspects of hyperlipidic diet ingestion on glucose metabolism, but worsened glycaemia in mice. *Food Research International*, 121, 641–647.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.033>
- de Oliveira, L. L. H., de Assis, A. C. R., Giraldez, V. Z. R., Scudeler, T. L., & Soares, P. R. (2024). Dyslipidemia: A Narrative Review on Pharmacotherapy. In *Pharmaceuticals* (Vol. 17, Number 3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).  
<https://doi.org/10.3390/ph17030289>
- de Sousa, J. A., Pereira, P., Allgayer, M. da C., Marroni, N. P., de Barros Falcão Ferraz, A., & Picada, J. N. (2017). Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(1), 51–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.06.009>

- DeBose-Boyd, R. A., & Ye, J. (2018). SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 43, Number 5, pp. 358–368). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.005>
- Dey, P. (2025). The emerging phenotype of nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals: what's different? In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 16). Frontiers Media SA.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1693123>
- Ding, Q., Hao, Q., Zhang, Q., Yang, Y., Olsen, R. E., Ringø, E., Ran, C., Zhang, Z., & Zhou, Z. (2022). DHA Suppresses Hepatic Lipid Accumulation via Cyclin D1 in Zebrafish. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.797510>
- Domínguez-Avila, J. A., Salazar-López, N. J., Montiel-Herrera, M., Corella-Salazar, D. A., Rodrigo-García, J., Astiazaran-García, H., Villegas-Ochoa, M. A., & González-Aguilar, G. A. (2024). Avocado Paste Phenolics Mitigate a High-Fat Diet-Induced Plasma HDL Decrease in Male Wistar Rats, by Altering the mRNA Expression of Hepatic SCARB1. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s12013-023-01190-9>
- Draper, E., Reynolds, C. M., Canavan, M., Mills, K. H., Loscher, C. E., & Roche, H. M. (2011). Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- $\kappa$ B independent of PPAR $\gamma$ . *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(8), 784–790.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.06.009>
- Edelson, P. J., & Duncan, R. A. (1981). Lowry and Bradford assays for protein. In *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes* (pp. 337–343). Elsevier.
- Eidi, M., Eidi, A., Saeidi, A., Molanaei, S., Sadeghipour, A., Bahar, M., Bahar, K., & Branch, V. (2009). Effect of Coriander Seed (*Coriandrum sativum* L.) Ethanol Extract on Insulin Release from Pancreatic Beta Cells in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Phytother. Res*, 23, 404–406. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Enes, B. N., Moreira, L. de P. D., Toledo, R. C. L., Moraes, É. A., Moreira, M. E. de C., Hermsdorff, H. H. M., Noratto, G., Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S., & Martino, H. S. D. (2020). Effect of

- different fractions of chia (*Salvia hispanica* L.) on glucose metabolism, in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104026>
- Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 25(2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
- Escamilla-Núñez, M. C., Castro-Porras, L., Romero-Martínez, M., Zárate-Rojas, E., & Rojas-Martínez, R. (2023). Screening, previous diagnosis, and treatment of chronic non-communicable diseases in Mexican adults. Ensanut 2022. *Salud Publica de Mexico*, 65. <https://doi.org/10.21149/14726>
- Escobedo-De La Peña, J., De Jesús-Pérez, R., Schargrotsky, H., & Champagne, B. (2014). *Prevalencia de dislipidemias en la ciudad de México y su asociación con otros factores de riesgo cardiovascular. Resultados del estudio CARMELA ARTÍCULO ORIGINAL* (Vol. 150).
- Estefes-Duarte, J. A., Espinosa-Sánchez, A., Pérez-Hernández, N., Ortiz, M. I., & Fernández-Martínez, E. (2024). Mechanisms of Bioactive Lipids to Modulate Master Regulators of Lipid Homeostasis and Inflammation in Metabolic Syndrome. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.
- Estefes-Duarte, J. A., Hernández-Peña, N., Hernández-Soto, I., Betanzos-Cabrera, G., Muñoz-Pérez, V. M., & Fernández-Martínez, E. (2026). Functional Components of Foods: Health Effects and Therapeutic Mechanisms in Metabolic Syndrome. *Current Nutrition & Food Science*, 22. <https://doi.org/10.2174/0115734013441158251212074509>
- Farazandeh, M., Mahmoudabady, M., Asghari, A. A., & Niazmand, S. (2022). Diabetic cardiomyopathy was attenuated by cinnamon treatment through the inhibition of fibro-inflammatory response and ventricular hypertrophy in diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 46(8). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14206>

- Farrugia, M. A., Pini, E., Tran, A., Chevalier, N., Anty, R., & Gual, P. (2025). Incretins and MASLD: at the Crossroads of Endocrine and Hepatic Disorders. In *Current Obesity Reports* (Vol. 14, Number 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13679-025-00646-8>
- Fatima, G., Khan, S., Shukla, V., Awaida, W., Li, D., & Gushchina, Y. S. (2025). Nutraceutical formulations and natural compounds for the management of chronic diseases. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1682590>
- Feingold, K. R. (2022). Lipid and Lipoprotein Metabolism. In *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* (Vol. 51, Number 3, pp. 437–458). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2022.02.008>
- Feng, P., Yan, Y., Chen, H., Ru, D., Wang, X., & Chen, Y. (2025). Erythrocyte DHA/EPA Ratio Surpasses Its Individual Fatty Acid Levels in Predicting Metabolic Syndrome in Chinese Adults: A Prospective Study. *Nutrients*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/nu17061096>
- Ferenci, P., Khan, A. G., Goh, K.-L., Glasgow, F., Hamid, S. S., Isakov, V., Lizarzabal, M., Pen, M. M., Ramos, J. F., Sarin, S., Stimac, D., Thomson, A. B., & Umar, M. (2014). *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis*. [www.jcge.com](http://www.jcge.com)
- Fernandes, S. S., Tonato, D., Mazutti, M. A., de Abreu, B. R., da Costa Cabrera, D., D'Oca, C. D. R. M., Prentice-Hernández, C., & Salas-Mellado, M. de las M. (2019). Yield and quality of chia oil extracted via different methods. *Journal of Food Engineering*, 262, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.06.019>
- Fernández, J. L. (2012). *Alteración en las pruebas de función hepática*. 42((Supl.1)), 36–38. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199325062014>
- Fernandez, N. J., & Kidney, B. A. (2007). Alkaline phosphatase: Beyond the liver. In *Veterinary Clinical Pathology* (Vol. 36, Number 3, pp. 223–233). <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00216.x>
- Fernández-Martínez, E., Lira-Islas, I. G., Cariño-Cortés, R., Soria-Jasso, L. E., Pérez-Hernández, E., & Pérez-Hernández, N. (2019). Dietary chia seeds (*Salvia hispanica*) improve acute

- dyslipidemia and steatohepatitis in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 43(9).  
<https://doi.org/10.1111/jfbc.12986>
- Firani, N. K., & Adi, P. (2017). Tomato fruit (*Solanum lycopersicum*) peel extract Improves fasting blood glucose and insulin resistance Index (HOMA-IR) in type 2 diabetes male rats. *International Congress of Diabetes and Metabolism, 2017*, 203.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane, G. H. (1957). *A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES*.
- Gallegos Garza, A. C., Bautista Martínez, B., García Abarca, R. S., Santibañez Silva, V., & Díaz Greene, E. J. (2024). Prevalencia de enfermedad por hígado graso asociada a disfunción metabólica en el Hospital Angeles Pedregal en un periodo de tres años. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 22(3), 281–285. <https://doi.org/10.35366/117516>
- García Monzón, C. (2001). Esteatohepatitis no alcohólica. *Gastroenterología y Hepatología*, 24(8), 395–402. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-esteatohepatitis-no-alcoholica-13019822>
- Garrel, C., Alessandri, J. M., Guesnet, P., & Al-Gubory, K. H. (2012). Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), 123–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.007>
- Gerges, S. H., Wahdan, S. A., Elsherbiny, D. A., & El-Demerdash, E. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease: An overview of risk factors, pathophysiological mechanisms, diagnostic procedures, and therapeutic interventions. In *Life Sciences* (Vol. 271). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119220>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058–1070.
- Glossmann, H., & Neville, D. M. (1972).  $\gamma$ -Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*, 19(4), 340–344.

- Grancieri, M., Martino, H. S. D., & Gonzalez de Mejia, E. (2019). Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 18, Number 2, pp. 480–499). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12423>
- Grancieri, M., Verediano, T. A., Sant'Ana, C. T., de Assis, A., Toledo, R. L., de Mejia, E. G., & Martino, H. S. D. (2022). Digested protein from chia seed (*Salvia hispanica* L) prevents obesity and associated inflammation of adipose tissue in mice fed a high-fat diet. *PharmaNutrition*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100298>
- Gratacós-Ginès, J., Ariño, S., Sancho-Bru, P., Bataller, R., & Pose, E. (2025). MetALD: Clinical aspects, pathophysiology and treatment. In *JHEP Reports* (Vol. 7, Number 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101250>
- Grujić-Milanović, J. D., Miloradović, Z. Z., Mihailović-Stanojević, N. D., Banjac, V. V., Vidosavljević, S., Ivanov, M. S., Karanović, D. J., Vajić, U. J. V., & Jovović, D. M. (2021). Excessive consumption of unsaturated fatty acids leads to oxidative and inflammatory instability in Wistar rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111691>
- Guerra Ruiz, A. R., Crespo, J., López Martínez, R. M., Iruzubieta, P., Casals Mercadal, G., Lalana Garcés, M., Lavin, B., & Morales Ruiz, M. (2021). Measurement and clinical usefulness of bilirubin in liver disease. In *Advances in Laboratory Medicine* (Vol. 2, Number 3, pp. 352–361). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/almed-2021-0047>
- Gurevitz, C., & Rosenson, R. S. (2024). Metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease, hypertriglyceridaemia, and cardiovascular risk. *European Journal of Preventive Cardiology*. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwae388>
- Gusarov, I., & Nudler, E. (2018). Glycogen at the Crossroad of Stress Resistance, Energy Maintenance, and Pathophysiology of Aging. In *BioEssays* (Vol. 40, Number 9). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bies.201800033>

- Hagström, H., Shang, Y., Hegmar, H., & Nasr, P. (2024). Natural history and progression of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *9*(10), 944–956. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(24\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(24)00193-6)
- Ham, I., Yang, G., Lee, J., Lee, K. J., & Choi, H. Y. (2009). Hypolipidemic effect of MeOH extract of *Bambusae Caulis* in Taeniam in hyperlipidemia induced by Triton WR-1339 and high cholesterol diet in rats. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *31*(3), 439–445. <https://doi.org/10.1080/08923970902769638>
- Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017a). PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- $\alpha$ . In *Future Cardiology* (Vol. 13, Number 3, pp. 259–278). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fca-2016-0059>
- Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017b). PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- $\beta/\delta$  and PPAR- $\gamma$ . In *Future Cardiology* (Vol. 13, Number 3, pp. 279–296). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
- Harris, W. S. (2004). Omega-3 fatty acids. In *Encyclopedia of Dietary Supplements* (pp. 493–504). CRC Press. <https://doi.org/10.1081/E-EDS-120022075>
- Hassani, F. V., Shirani, K., & Hosseinzadeh, H. (2016). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. In *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (Vol. 389, Number 9, pp. 931–949). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1256-0>
- Heck, S. O., Zborowski, V. A., Chagas, P. M., da Luz, S. C. A., & Bortolatto, C. F. (2020). p-Chlorodiphenyl diselenide attenuates plasma lipid profile changes and hepatotoxicity induced by nonionic surfactant tyloxapol in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *30*(1), 73–80. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1669240>
- Hernandez-Baixauli, J., Chomiciute, G., Alcaide-Hidalgo, J. M., Crescenti, A., Baselga-Escudero, L., Palacios-Jordan, H., Foguet-Romero, E., Pedret, A., Valls, R. M., Solà, R., Mulero, M., &

- Del Bas, J. M. (2023). Developing a model to predict the early risk of hypertriglyceridemia based on inhibiting lipoprotein lipase (LPL): a translational study. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49277-w>
- Hinds, T. D., & Stec, D. E. (2018). Bilirubin, a cardiometabolic signaling molecule. In *Hypertension* (Vol. 72, Number 4, pp. 788–795). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11130>
- Hirano, T. (2018). Pathophysiology of diabetic dyslipidemia. In *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* (Vol. 25, Number 9, pp. 771–782). Japan Atherosclerosis Society. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17023>
- Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2009). PCSK9: A convertase that coordinates LDL catabolism. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 50, Number SUPPL.). <https://doi.org/10.1194/jlr.R800091-JLR200>
- Hrnčič, M. K., Ivanovski, M., Cör, D., & Knez, Ž. (2020). Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An overview-phytochemical profile, isolation methods, and application. In *Molecules* (Vol. 25, Number 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25010011>
- Hussain, M. M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 25, Number 3, pp. 200–206). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000084>
- Huynh, D. T. M., Huynh, T., Le, M. N. T., & Mai, H. N. (2024). Investigation of acute and sub-chronic oral toxicity and effects of *Allium ascalonicum* L. extract on Triton WR1339-induced hyperlipidemia on Swiss albino mice. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2024.100407>
- Hwang, S. H., Kang, I. J., & Lim, S. S. (2017). Antidiabetic effect of fresh Nopal (*Opuntia ficus-indica*) in low-dose streptozotocin-induced diabetic rats fed a high-fat diet. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4380721>
- Igarashi, T., Aursand, M., Hirata, Y., Gribbestad, I. S., Wada, S., & Nonaka, M. (2000). Nondestructive quantitative determination of docosahexaenoic acid and n-3 fatty acids in

fish oils by high-resolution 1 H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 737–748.

Ignacio Ponte-Negretti, C., Isea-Pérez, J., Lanás, F., Medina, J., Gómez-Mancebo, J., Morales, E., Acevedo, M., Pirskorz, D., Machado, L., Lozada, A., Bryce, A., Lorenzatti, A., Carrera, C., López-Jaramillo, P., Pinto, X., & Wyss-Quintana, F. S. (2017). Dislipidemia aterogénica en Latinoamérica: prevalencia, causas y tratamiento. Un consenso. In *Rev Mex Cardiol* (Vol. 28, Number 2). [www.medigraphic.com/revmexcardiol](http://www.medigraphic.com/revmexcardiol)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)

Intraperitoneal Drug Administration. (1994). *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 12(C), 46–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81871-3.50010-2>

Jamshed, H., & Gilani, A. H. (2014). Almonds inhibit dyslipidemia and vascular dysfunction in rats through multiple pathways. *Journal of Nutrition*, 144(11), 1768–1774. <https://doi.org/10.3945/jn.114.198721>

Janero, D. R. (1990). MALONDIALDEHYDE AND THIOBARBITURIC ACID-REACTIVITY AS DIAGNOSTIC INDICES OF LIPID PEROXIDATION AND PEROXIDATIVE TISSUE INJURY. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 9).

Kachalov, K. S., Solomina, A. S., Rodina, A. V, Kulakova, A. V, Zhanataev, A. K., & Durnev, A. D. (2024). Induction of hyperglycemia and accompanying biochemical and genotoxic changes in mice of different strains by tyloxapol. *Molekulyarnaya Meditsina (Molecular Medicine)*, 22(3), 45–52.

Karantonis, H. C., Nomikos, T., & Demopoulos, C. A. (2009). Triacylglycerol Metabolism. In *Current Drug Targets* (Vol. 10). <http://www>.

Kasarala, G., & Tillmann, H. L. (2016). Standard liver tests. In *Clinical Liver Disease* (Vol. 8, Number 1, pp. 13–18). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cld.562>

Katunzi-Kilewela, A., Kaale, L. D., Kibazohi, O., & Rweyemamu, L. M. P. (2021). Nutritional, health benefits and usage of chia seeds (*Salvia hispanica*): A review. *African Journal of Food Science*, 15(2), 48–59. <https://doi.org/10.5897/ajfs2020.2015>

- Kew, M. C. (2000). Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. In *Lancet* (Vol. 355, Number 9204, pp. 591–592). Elsevier B.V.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)00219-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)00219-6)
- Khalid, H. (2022). A Review: Molecular mechanism of CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity. *Biochemistry & Physiology: Open*, 11(8), 1000391. <https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000391>
- Khalid, W., Arshad, M. S., Aziz, A., Rahim, M. A., Qaisrani, T. B., Afzal, F., Ali, A., Ranjha, M. M. A. N., Khalid, M. Z., & Anjum, F. M. (2023). Chia seeds (*Salvia hispanica* L.): A therapeutic weapon in metabolic disorders. In *Food Science and Nutrition* (Vol. 11, Number 1, pp. 3–16). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3035>
- Kim, S. J., Cho, S. H., & Yun, J. M. (2025). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and nonalcoholic fatty liver disease in adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition*, 50, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2025.05.013>
- Kim, S. W., Rho, C. R., Kim, J., Xie, Y., Prince, R. C., Mustafa, K., Potma, E. O., Brown, D. J., & Jester, J. V. (2020). Eicosapentaenoic acid (EPA) activates PPAR $\gamma$  signaling leading to cell cycle exit, lipid accumulation, and autophagy in human meibomian gland epithelial cells (hMGEC): EPA Regulates Meibocyte Differentiation. *Ocular Surface*, 18(3), 427–437.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.04.012>
- Kleiner, D. E., & Makhlouf, H. R. (2016). Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. In *Clinics in Liver Disease* (Vol. 20, Number 2, pp. 293–312). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.011>
- Kothari, M., & Jeyaraj, S. (2017). EFFECT OF CHIA SEED SUPPLEMENTATION ON THE ANTHROPOMETRIC MEASUREMENTS AND SERUM LIPID PROFILE IN WOMEN WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA. *Jeyaraj et al. World Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 929. <https://doi.org/10.20959/wjpr201701-7615>
- Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V., & Sankaran, U. (2021). Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review. In *Laboratory Animal Research* (Vol. 37, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00101-4>

- Kuo, J. H. S., Jan, M. S., & Chiu, H. W. (2006). Cytotoxic properties of tyloxapol. *Pharmaceutical Research*, 23(7), 1509–1516. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0281-y>
- Lambert, L. J., Muzumdar, M. D., Rideout, W. M., & Jacks, T. (2017). Basic Mouse Methods for Clinician Researchers: Harnessing the Mouse for Biomedical Research. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 291–312). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00014-X>
- Li, Y., Wang, X., & Shen, Z. (2017). Review Article Traditional Chinese medicine for lipid metabolism disorders. In *Am J Transl Res* (Vol. 9, Number 5). [www.ajtr.org](http://www.ajtr.org)
- Lima Rocha, J. É., Mendes Furtado, M., Mello Neto, R. S., da Silva Mendes, A. V., Brito, A. K. da S., Sena de Almeida, J. O. C., Rodrigues Queiroz, E. I., de Sousa França, J. V., Silva Primo, M. G., Cunha Sales, A. L. de C., Vasconcelos, A. G., Cabral, W. F., Kückelhaus, S. A. S., Leite, J. R. de S. de A., Lustosa, A. K. M. F., Lucarini, M., Durazzo, A., Arcanjo, D. D. R., & E Martins, M. do C. de C. (2022). Effects of Fish Oil Supplementation on Oxidative Stress Biomarkers and Liver Damage in Hypercholesterolemic Rats. *Nutrients*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/nu14030426>
- Liu, Y., Colby, J. K., Zuo, X., Jaoude, J., Wei, D., & Shureiqi, I. (2018). The role of ppar- $\delta$  in metabolism, inflammation, and cancer: Many characters of a critical transcription factor. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Number 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19113339>
- Liu, Z., Que, S., Xu, J., & Peng, T. (2014). Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: A review. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 11, Number 9, pp. 925–935). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijms.8951>
- Llopis, J. M. L., Brown, D., & Saiz, B. (2020). Chenopodium quinoa and salvia hispanica provide immunonutritional agonists to ameliorate hepatocarcinoma severity under a high-fat diet. *Nutrients*, 12(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12071946>
- Lluís, L., Taltavull, N., Muñoz-Cortés, M., Sánchez-Martos, V., Romeu, M., Giralt, M., Molinar-Toribio, E., Torres, J. L., Pérez-Jiménez, J., Pazos, M., Méndez, L., Gallardo, J. M., Medina, I.,

- & Nogués, M. R. (2013). Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids in Health and Disease*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-140>
- López Farré, A., & Macaya, C. (2006). Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los omega 3. *Revista Española de Cardiología*, 6, 31D-37D.
- Lu, W., Li, S., Li, J., Wang, J., Zhang, R., Zhou, Y., Yin, Q., Zheng, Y., Wang, F., Xia, Y., Chen, K., Liu, T., Lu, J., Zhou, Y., & Guo, C. (2016). Effects of Omega-3 Fatty Acid in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1459790>
- Lv, J., Wang, C., Zhang, X., Lv, Z., & Yu, M. (2020). <sup>1</sup>H NMR Quantification of DHA and EPA in Fish Oil. *Journal of Ocean University of China*, 19(5), 1193–1197. <https://doi.org/10.1007/s11802-020-4395-3>
- Mahley, R. W., & Ji, Z.-S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E Supplementary key words remnants • apolipoprotein E • hepatic li-pase • heparan sulfate proteoglycans • lipoprotein lipase. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 40).
- Majewski, M., Ognik, K., & Juśkiewicz, J. (2020). The antioxidant status, lipid profile, and modulation of vascular function by fish oil supplementation in nano-copper and copper carbonate fed Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103595>
- Manickam, E., Sinclair, A. J., & Cameron-Smith, D. (2010). *Open Access RESEARCH Suppressive actions of eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes*. <http://www.lipidworld.com/content/9/1/57>
- Marineli, R. da S., Lenquiste, S. A., Moraes, É. A., & Maróstica, M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76, 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.039>

- Marineli, R. da S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT*, *59*(2P2), 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>
- Martin, A., Lang, S., Goeser, T., Demir, M., Steffen, H. M., & Kasper, P. (2022). Management of Dyslipidemia in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In *Current Atherosclerosis Reports* (Vol. 24, Number 7, pp. 533–546). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11883-022-01028-4>
- Medina-Urrutia, A., Lopez-Urbe, A. R., El Hafidi, M., González-Salazar, M. D. C., Posadas-Sánchez, R., Jorge-Galarza, E., Del Valle-Mondragón, L., & Juárez-Rojas, J. G. (2020). Chia (*Salvia hispanica*)-supplemented diet ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and its metabolic abnormalities in humans. *Lipids in Health and Disease*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01283-x>
- Méndez, L., Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., Pérez-Jiménez, J., Nogués, R., Romeu, M., & Medina, I. (2013). Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine  $\omega$ 3 PUFAs. *Free Radical Biology and Medicine*, *55*, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.004>
- Mickiewicz, B., Vogel, H. J., Wong, H. R., & Winston, B. W. (2013). Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *187*(9), 967–976. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1726OC>
- Miquilena Colina, M. E., & García Monzón, C. (2011). *Obesidad y enfermedad hepática*.
- Mistry, D., & Stockley, R. A. (2010). Gamma-glutamyl transferase: the silent partner? *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *7*(4), 285–290.
- Moctezuma-Velázquez, C. (2018a). Current treatment for non-alcoholic fatty liver disease. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 83, Number 2, pp. 125–133). Asociación Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2017.10.003>

- Moctezuma-Velázquez, C. (2018b). Current treatment for non-alcoholic fatty liver disease. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 83, Number 2). [www.elsevier.es/rgmx](http://www.elsevier.es/rgmx)
- Morán Salvador, E. (2008). *Papel del receptor nuclear PPAR $\gamma$  en la inflamación y la esteatosis hepática*.
- Moreira, L. de P. D., Enes, B. N., José, V. P. B. de S., Toledo, R. C. L., Ladeira, L. C. M., Cardoso, R. R., Duarte, V. da S., Hermsdorff, H. H. M., de Barros, F. A. R., & Martino, H. S. D. (2022). Chia (*Salvia hispanica* L.) Flour and Oil Ameliorate Metabolic Disorders in the Liver of Rats Fed a High-Fat and High Fructose Diet. *Foods*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/foods11030285>
- Munir, F., & Khan, M. K. A. (2023). Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Experimental Model. *Pakistan BioMedical Journal*, 10–15. <https://doi.org/10.54393/pbmj.v6i07.900>
- Muscari, A., Puddu, G. M., & Puddu, P. (2002). Lipid-Lowering Drugs: Are Adverse Effects Predictable and Reversible? In *Cardiology* (Vol. 97). [www.karger.com](http://www.karger.com)
- Namdar, A. B., Omidvar, D., Amerizadeh, F., Kabiri, M., Namdar, H. B., & Ravanshad, S. (2024). The efficacy of flaxseed oil on non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled trial. *Journal of Herbal Medicine*, *48*. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2024.100967>
- Nishimoto, T., Pellizzon, M. A., Aihara, M., Stylianou, I. M., Billheimer, J. T., Rothblat, G., & Rader, D. J. (2009). Fish oil promotes macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(10), 1502–1508. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.187252>
- Noubiap, J. J., Nansseu, J. R., Nyaga, U. F., Ndoadougou, A. L., Ngouo, A. T., Tounouga, D. N., Tianyi, F. L., Foka, A. J., Lontchi-Yimagou, E., Nkeck, J. R., & Bigna, J. J. (2026). Worldwide trends in metabolic syndrome from 2000 to 2023: a systematic review and modelling analysis. *Nature Communications*, *17*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-67268-5>

- Nyakudya, T. T., Tshabalala, T., Dangarembizi, R., Erlwanger, K. H., & Ndhlala, A. R. (2020). The potential therapeutic value of medicinal plants in the management of metabolic disorders. In *Molecules* (Vol. 25, Number 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25112669>
- Oda, E. (2012). Metabolic syndrome: Its history, mechanisms, and limitations. In *Acta Diabetologica* (Vol. 49, Number 2, pp. 89–95). <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0309-6>
- Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). 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 Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *89*(5), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.09.010>
- Oliva, M. E., Ingaramo, P., Vega Joubert, M. B., Ferreira, M. del R., & D'Alessandro, M. E. (2021). Effects of Salvia hispanica L. (chia) seed on blood coagulation, endothelial dysfunction and liver fibrosis in an experimental model of Metabolic Syndrome. *Food & Function*, *12*(24), 12407–12420. <https://doi.org/10.1039/D1FO02274A>
- Organización Panamericana de la Salud. (2025, 19 de diciembre). *La OMS lanza la Biblioteca Global de Medicina Tradicional*. <https://www.paho.org/es/noticias/19-12-2025-oms-lanza-biblioteca-global-medicina-tradicional>
- Pandurangan, S. B., Al-Maiman, S. A., Al-Harbi, L. N., & Alshatwi, A. A. (2020). Beneficial fatty acid ratio of Salvia hispanica L. (Chia Seed) potentially inhibits adipocyte hypertrophy, and decreases adipokines expression and inflammation in macrophage. *Foods*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030368>
- Panyod, S., Wu, W. K., Hsieh, Y. C., Tseng, Y. J., Peng, S. Y., Chen, R. A., Huang, H. S., Chen, Y. H., Shen, T. C. D., Ho, C. T., Liu, C. J., Chuang, H. L., Huang, C. C., Wu, M. S., & Sheen, L. Y. (2024). Ginger essential oil prevents NASH progression by blocking the NLRP3 inflammasome and remodeling the gut microbiota-LPS-TLR4 pathway in mice. *Nutrition and Diabetes*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41387-024-00306-1>

- Pavía, A. A., Aguilar, C., Alexanderson, E., Ahumada, M., Alcocer, M., Arenas, J. L., del Rosario Arenas, L., Borges, O., Benavides, M. A., & Cardona, E. (2020). Consenso de la Sociedad Mexicana de Cardiología en el diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias y aterosclerosis. *Medicina Interna de México*, *36*(3), 390–413.
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*, *98*, 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev>
- Piao, L., Choi, J., Kwon, G., & Ha, H. (2017). Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, *21*(3), 317–325.
- Pirillo, A., Casula, M., Olmastroni, E., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2021). Global epidemiology of dyslipidaemias. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 18, Number 10, pp. 689–700). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00541-4>
- Popović, T., Borozan, S., Arsić, A., Martačić, J. D., Vučić, V., Trbović, A., Mandić, L., & Glibetić, M. (2012). Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male wistar rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *96*(6), 1020–1029. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01216.x>
- Pouwels, S., Sakran, N., Graham, Y., Leal, A., Pintar, T., Yang, W., Kassir, R., Singhal, R., Mahawar, K., & Ramnarain, D. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. In *BMC Endocrine Disorders* (Vol. 22, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1>
- Purva, A., Gaur, K., & Shahid Khan, M. (2020). A Review on Dyslipidemia: Types, Risk Factors and Management. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, *8*(2), 96–98. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.682>
- Radu, F., Potcovaru, C. G., Salmen, T., Filip, P. V., Pop, C., & Fierbințeanu-Braticievici, C. (2023). The Link between NAFLD and Metabolic Syndrome. In *Diagnostics* (Vol. 13, Number 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040614>

- Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E. A., & Elam, M. B. (2008). SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 19, Number 2, pp. 65–73). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.10.009>
- Rasouli, M., Tahmouri, H., & Mosavi-Mehr, M. H. (2016). The long term kinetic of plasma lipids and lipoproteins in tyloxapol injected rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(6), BF01–BF05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18890.7993>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Reitman, S., & Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28(1), 56–63.
- Riazi, K., Azhari, H., Charette, J. H., Underwood, F. E., King, J. A., Afshar, E. E., Swain, M. G., Congly, S. E., Kaplan, G. G., & Shaheen, A.-A. (2022). The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 7(9), 851–861. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00165-0)
- Rossi, A. S., Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats. *The British Journal of Nutrition*, 109(9), 1617–1627. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003558>
- Rühl, R., & Landrier, J. F. (2016). Dietary regulation of adiponectin by direct and indirect lipid activators of nuclear hormone receptors. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 60, Number 1, pp. 175–184). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500619>
- Ruiz-Manriquez, J., Olivas-Martinez, A., Chávez-García, L. C., Fernández-Ramírez, A., Moctezuma-Velazquez, C., Kauffman-Ortega, E., Castro-Narro, G., Astudillo-García, F., Escalona-Nandez, I., Aguilar-Salinas, C. A., Navarro-Alvarez, N., & Torre, A. (2022). Prevalence of Metabolic-associated Fatty Liver Disease in Mexico and Development of a

- Screening Tool: The MAFLD-S Score. *Gastro Hep Advances*, 1(3), 352–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.gastha.2021.12.011>
- Sachi, S., Jahan, M. P., Islam, P., Rafiq, K., & Islam, M. Z. (2024). Evaluation of hematoprotective, hepatoprotective, and anti-inflammatory potentials of chia seed (*Salvia hispanica* L.) extract in rats. *Veterinary and Animal Science*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2024.100349>
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. In *Life Sciences* (Vol. 203, pp. 255–267). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>
- Sala-Vila, A., Fleming, J., Kris-Etherton, P., & Ros, E. (2022). Impact of  $\alpha$ -Linolenic Acid, the Vegetable  $\omega$ -3 Fatty Acid, on Cardiovascular Disease and Cognition. *Advances in Nutrition*, 13(5), 1584–1602. <https://doi.org/10.1093/advances/nmac016>
- Sánchez Orozco, L. V., Sánchez Meza, J., Campos Valdez, M., Campos Valdez, A., Rosales Domínguez, J. A., Godínez Rubí, J. M., Rodríguez Reyes, S. C., Martínez López, E., Gurrola Díaz, C. M., Salazar Montes, A. M., Ramos Marquez, M. E., Zúñiga González, G. M., & Casas Godoy, L. (2025). MORINGA OLEIFERA LEAF AQUEOUS EXTRACT IMPROVES SURVIVAL IN A LIVER CANCER MODEL IN WISTAR RATS. *Annals of Hepatology*, 30, 102061. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aohep.2025.102061>
- Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., & Robuck, P. R. (2010). Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 362(18), 1675–1685. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0907929>
- Sato, R. (2010). Sterol metabolism and SREBP activation. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 501, Number 2, pp. 177–181). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.004>
- Schreurs, M., Kuipers, F., & Van Der Leij, F. R. (2010). Regulatory enzymes of mitochondrial  $\beta$ -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. In *Obesity Reviews* (Vol. 11, Number 5, pp. 380–388). <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x>

- Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., & Muntwyler, E. (1950). *The estimation of glycogen with the anthrone reagent*.
- Selma-Gracia, R., Megušar, P., Haros, C. M., & Llopis, J. M. L. (2021). Immunonutritional bioactives from chenopodium quinoa and salvia hispanica l. Flour positively modulate insulin resistance and preserve alterations in peripheral myeloid population. *Nutrients*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/nu13051537>
- Senior, J. R. (2012). Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *92*(3), 332–339. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.108>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, *113*(4), 1202–1205.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: An overview. In *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (Vol. 29, Number 3, pp. 269–278). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
- Shearer, G. C., Savinova, O. V., & Harris, W. S. (2012). Fish oil - How does it reduce plasma triglycerides? In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1821, Number 5, pp. 843–851). <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2011.10.011>
- Shimano, H., & Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 13, Number 12, pp. 710–730). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.91>
- Shin, S. K., Cho, H. W., Song, S. E., & Song, D. K. (2018). Catalase and nonalcoholic fatty liver disease. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 470, Number 12, pp. 1721–1737). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2195-z>
- Simic, I., & Reiner, Z. (2015). Adverse Effects of Statins - Myths and Reality. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(9), 1220–1226. <https://doi.org/10.2174/1381612820666141013134447>

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158.
- Song, S., Attia, R. R., Connaughton, S., Niesen, M. I., Ness, G. C., Elam, M. B., Hori, R. T., Cook, G. A., & Park, E. A. (2010). Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and PPAR gamma coactivator (PGC-1 $\alpha$ ) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *325*(1–2), 54–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.05.019>
- Soon, G. S. T., & Torbenson, M. (2023). The Liver and Glycogen: In Sickness and in Health. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Number 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24076133>
- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahua Díaz, D. (2016). *Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad*.  
<http://mexicomaxico.org/Estadisticas/Estadisticas.htm>
- Souza, A. L., Martínez, F. P., Ferreira, S. B., & Kaiser, C. R. (2017). A complete evaluation of thermal and oxidative stability of chia oil: The richest natural source of  $\alpha$ -linolenic acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *130*(3), 1307–1315.  
<https://doi.org/10.1007/s10973-017-6106-x>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, *8*, 3–16.  
<https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Taher, Z. A., Taher, A. A., & Radi, S. (2024). An Update on Dyslipidemia Management and Medications: A Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.56255>
- Tall, A. R. (1993). *Plasma cholesteryl ester transfer protein*.
- Tan, W., Mao, L., Yu, S., Huang, J., Xie, Q., Hu, M., & Mao, L. (2024). DHA and EPA improve liver IR in HFD-induced IR mice through modulating the gut microbiotas-LPS-liver axis. *Journal of Functional Foods*, *112*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105917>

- Targher, G., Byrne, C. D., & Tilg, H. (2024). MASLD: a systemic metabolic disorder with cardiovascular and malignant complications. In *Gut* (Vol. 73, Number 4, pp. 691–702). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330595>
- Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., Rutledge, D. N., & Savarin, P. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. In *Molecular BioSystems* (Vol. 11, Number 1, pp. 13–19). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4mb00414k>
- Troesch, B., Eggersdorfer, M., Laviano, A., Rolland, Y., Smith, A. D., Warnke, I., Weimann, A., & Calder, P. C. (2020). Expert opinion on benefits of long-chain omega-3 fatty acids (DHA and EPA) in aging and clinical nutrition. In *Nutrients* (Vol. 12, Number 9, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12092555>
- Vacca, M., Kamzolas, I., Harder, L. M., Oakley, F., Trautwein, C., Hatting, M., Ross, T., Bernardo, B., Oldenburger, A., Hjuler, S. T., Ksiazek, I., Lindén, D., Schuppan, D., Rodriguez-Cuenca, S., Tonini, M. M., Castañeda, T. R., Kannt, A., Rodrigues, C. M. P., Cockell, S., ... Brass, C. (2024). An unbiased ranking of murine dietary models based on their proximity to human metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Nature Metabolism*, 6(6), 1178–1196. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01043-6>
- Vargas Alfaro, M. D., Razo Mendoza, L. F., & Alejos Gómez, I. (2024). Prevalencia de Dislipidemia en Pacientes con Diagnóstico de Obesidad sin otra Comorbilidad Asociada en la UMF47 en el Año 2022. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(5), 8341–8360. [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v8i5.14243](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5.14243)
- Venkatesh, S., Thilagavathi, J., & Shyam sundar, D. (2008). Anti-diabetic activity of flowers of *Hibiscus rosasinensis*. *Fitoterapia*, 79(2), 79–81. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.06.015>
- Vuksan, V., Jenkins, A. L., Brissette, C., Choleva, L., Jovanovski, E., Gibbs, A. L., Bazinet, R. P., Au-Yeung, F., Zurbau, A., Ho, H. V. T., Duvnjak, L., Sievenpiper, J. L., Josse, R. G., & Hanna, A. (2017). Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) in the treatment of overweight and obese patients

- with type 2 diabetes: A double-blind randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(2), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.11.124>
- Weber, L. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 33, Number 2).
- Whitfield, J. B. (2001). Gamma glutamyl transferase. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 38, Number 4, pp. 263–355). CRC Press LLC.  
<https://doi.org/10.1080/20014091084227>
- Wijayanti, L., Muniroh, M., Al-Baarri, A. N., Fitranti, D. Y., Mahati, E., & Afifah, D. N. (2023). Effect of GLITEROS specific-diabetes enteral formula modification based on tempe flour, jicama flour and sunflower seed flour on score pancreatic damage, number and diameter of the islets of langerhans of hyperglycemic rats pancreatic cells with streptozotocin induction. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00163-y>
- Wong, F. W.-Y., Chan, W.-Y., & Lee, S. S.-T. (1998). Resistance to Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice Which Lack CYP2E1 Expression. In *Toxicol. Appl. Pharmacol* (Vol. 153).
- Wong, S., Al-Sarraf, A., Ignaszewski, A., & Frohlich, J. (2012). Dr DS Fredrickson: Founding father of the field of lipidology. *BCMJ*, 45(7), 336–340.
- Yang, X., Li, X., Hu, M., Huang, J., Yu, S., Zeng, H., & Mao, L. (2024). EPA and DHA differentially improve insulin resistance by reducing adipose tissue inflammation—targeting GPR120/PPAR $\gamma$  pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 130.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109648>
- Yang, Y., Ji, M., Lin, Z., Li, P., Wu, R., Liu, X., & Liu, L. (2025). Bile duct ligation impairs visual acuity in rats by ammonia-and bilirubin-induced retinal degeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*, 46(2), 380–392.

- Yeh, M. M., & Brunt, E. M. (2008). Pathology of fatty liver: differential diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Diagnostic Histopathology*, *14*(12), 586–597.  
<https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2008.09.005>
- Yenuganti, V. R. ao, Ravinder, R., & Singh, D. (2014). Conjugated linoleic acids attenuate LPS-induced pro-inflammatory gene expression by inhibiting the NF- $\kappa$ B translocation through PPAR $\gamma$  in buffalo granulosa cells. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *72*(3), 296–304. <https://doi.org/10.1111/aji.12261>
- Yin, J., Zhang, H., & Ye, J. (2008). *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets: Traditional Chinese Medicine in Treatment of Metabolic Syndrome*.
- Yoshikawa, T., Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Yatoh, S., Kitamine, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Sekiya, M., Takahashi, A., Hasty, A. H., Sato, R., Sone, H., Osuga, J. I., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2003). Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Molecular Endocrinology*, *17*(7), 1240–1254.  
<https://doi.org/10.1210/me.2002-0190>
- Younossi, Z. M., Zelber-Sagi, S., Lazarus, J. V., Wong, V. W. S., Yilmaz, Y., Duseja, A., Eguchi, Y., Castera, L., Pessoa, M. G., Oliveira, C. P., El-Kassas, M., Tsochatzis, E., Fan, J. G., Spearman, C. W., Tacke, F., Castellanos Fernandez, M. I., Alkhoury, N., Schattenberg, J. M., Romero-Gómez, M., ... Alqahtani, S. A. (2025). Global Consensus Recommendations for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease and Steatohepatitis. *Gastroenterology*, *169*(5), 1017-1032.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2025.02.044>
- Yuan, D., Bai, N., Zhu, Q., Song, S., He, A., Wang, J., & Chen, Y. (2025). Hepatic HSD17B6 is dispensable for diet-induced fatty liver disease in mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *41*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2025.101924>
- Yuan, G., Chen, X., & Li, D. (2015). Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR  $\gamma$ ) by conjugated fatty acid in obesity and inflammatory bowel disease.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1883–1895.

<https://doi.org/10.1021/jf505050c>

Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., Diaz-Delfin, J., de Madariaga, M. A., & Domingo, J. C. (2008). Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR $\gamma$ :RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 1172–1182. <https://doi.org/10.1189/jlb.1007688>

Ziamanesh, F., Mohammadi, M., Ebrahimpour, S., Tabatabaei-Malazy, O., Mosallanejad, A., & Larijani, B. (2023). Unraveling the link between insulin resistance and Non-alcoholic fatty liver disease (or metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease): A Narrative Review. In *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* (Vol. 22, Number 2, pp. 1083–1094). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40200-023-01293-3>