



**TESIS
MAGISTER NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
INTA U. CHILE.**

TÍTULO:

Efecto de la Suplementación con Aceite de Pescado sobre los Parámetros del Metabolismo Lipídico y Glucídico en Ratones con Ablación de la Isoforma Cyp4a14 de Citocromo P450 Sometidos a Dieta Obesogénica.

**ALUMNA: Dra. María José Mackenna Ronco
DIRECTOR DE TESIS: Dr. Arnaldo Gatica Bello. PhD**

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Resumen, Abstract y lista de abreviaturas	3
Introducción.....	4-8
Métodos.....	9-15
Resultados.....	16-55
Discusión.....	56-62
Conclusiones.....	63
Referencias.....	64-67
Resumen de Tratamientos: Figura 1.....	68
Resumen de Composición de Dietas: Tablas IA y IB.....	69
Modelo Hipotético de la función de Cyp4a14: Fig. 2.....	70
ANEXO: Tablas ANOVA.....	71-79

RESUMEN:

El síndrome metabólico (SM) es una condición patológica de incidencia creciente en la población, que comprende diversos componentes como: obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial y resistencia a la insulina. Existe evidencia que apoya un rol benéfico de los ácidos grasos n-3 (AG n-3) del aceite de pescado en el control de las patologías asociadas al metabolismo de lípidos y glúcidos presentes en el SM. Los mecanismos moleculares involucrados en estos efectos no están definidos; sin embargo, se ha propuesto que los AG n-3 activarían al receptor de proliferadores peroxisomales alfa (PPAR α) a través de lo cual ejercerían su efecto hipolipemiante y antidiabetogénico. Estudios *in vitro* sugieren que los productos derivados del metabolismo de los AG n-3 por las monooxigenasas de citocromo P450 de la subfamilia 4a (Cyp4a) podrían actuar como activadores endógenos de PPAR α . De esta manera, la inactivación genética de dicha enzima debería disminuir los efectos benéficos de los AG n-3. Para probar esta hipótesis, ratones "wild type" (WT) y "knock out" de Cyp4a14 (Cyp4a14KO) fueron sometidos a dieta rica en grasas saturadas (60% de las calorías provenientes de la grasa) con el objetivo de inducir en ellos SM. En los animales con SM se evaluó la capacidad del aceite de pescado para mejorar las alteraciones producidas por la dieta rica en grasas saturadas en el metabolismo de lípidos y de glúcidos. La intervención dietaria se realizó bajo dos condiciones de dietas alta en grasa: 66% y 46% de las Kilocalorías (Kcal) de grasa. De nuestros resultados concluimos que la Cyp4a14 podría participar en el rol benéfico del aceite de pescado en el control del metabolismo hepático de triglicéridos y colesterol, en condiciones de dieta alta en grasa (66% grasa).

ABSTRACT

Metabolic Syndrome (MS) is a pathological condition with growing incidence in the population that includes obesity, dyslipidemia, hypertension and insulin resistance. There is evidence supporting a beneficial role of n-3 fatty acids (n-3 FA) from fish oil in the control of lipid and carbohydrate alterations associated to MS. The molecular mechanisms involved in those effects are not well defined, however, it has been suggested that n-3 FA exert their lipid-lowering and antidiabetogenic effect through activation of peroxisome proliferator receptor alpha (PPAR α). *In vitro* studies suggest that n-3 FA can be metabolized by cytochrome P450 monooxygenases of the subfamily 4a (CYP4a) to form endogenous activators of PPAR α . Given this, genetic inactivation of this enzyme should reduce the beneficial effects of n-3 FA.

To test this hypothesis, we treated wild type (WT) and Cyp4a14 knockout mice (Cyp4a14KO) with a diet rich in saturated fats (60% calories from fat) in order to induce the metabolic syndrome. After that, we evaluated the ability of fish oil to improve the changes produced in the metabolism of lipids and carbohydrates. Dietary intervention was done under two conditions of high-fat diet (66% and 46% Kilocalories (Kcal) from fat). From our results we conclude that Cyp4a14 monooxygenase could participate in the benefic rol of fish oil in the control of hepatic metabolism of triglycerides and cholesterol in conditions of high-fat diet (66% fat).

Abreviaturas utilizadas:

AA, ácido araquidónico; **ABC**, área bajo la curva; **AC**, aceite de coco; **AG n-3**, ácidos grasos omega 3; **AM**, aceite de maiz; **AP**, aceite de pescado; **Cyp4a14KO**, knock out de Cyp4a14; **CYP450**, citocromo P450; **DAG**, dieta alta en grasa; **DBG**, dieta baja en grasa; **DHA**, ácido docosahexaenoico; **DM-2**, diabetes mellitus 2; **EPA**, ácido eicosapentaenoico; **Kcal**, kilocalorías; **KO**, knock out; **PPAR α** , receptor de proliferadores peroxisomales alfa; **SM**, síndrome metabólico; **TG**, triglicéridos; **TTG**, test de tolerancia a la glucosa; **WT**, wild type; **% grasa**, % de las calorías provenientes de la grasa.

INTRODUCCIÓN.

El síndrome metabólico (SM) es una condición patológica de incidencia creciente en los países industrializados, debido al rápido crecimiento económico y al consecuente aumento de la obesidad. En el año 2003, afectó al 44% de la población mayor de 50 años en EEUU [1]. Chile no constituye una excepción, donde la prevalencia estimada el año 2003 fue de 37% de los chilenos sobre 45 años y 48% sobre los 65 años [2]. El SM incluye diferentes componentes: obesidad abdominal, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL y resistencia a la insulina. Su mayor importancia radica en su asociación con el desarrollo de enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2)[3]. La etiología del SM es multifactorial, con influencia tanto de factores genéticos como ambientales, por lo que en humanos constituye un modelo complejo de estudio, cuyas causas exactas están lejos aún de ser comprendidas completamente [4].

Dentro de los factores ambientales que influyen en el SM, la dieta es un factor fundamental. Tanto el exceso de grasas saturadas como de carbohidratos refinados en la dieta juegan un rol en aumentar la glicemia, los ácidos grasos libres e insulina plasmática. El abuso de estos dos componentes dietarios contribuye a generar obesidad e insulino-resistencia y en un número significativo de individuos al desarrollo de esteatosis hepática [5].

Basado en esto, varios de los componentes del síndrome metabólico son susceptibles de ser modificados con intervenciones nutricionales, como por ejemplo la disminución de la ingesta de grasas saturadas y el aumento del consumo de ácidos grasos (AG) poliinsaturados n-3, especialmente los presentes en el aceite de pescado, como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). El consumo de AG n-3 puede mejorar la acción de la insulina en los tejidos, revirtiendo los efectos adversos del exceso de grasas saturadas y azúcar. En pacientes con intolerancia a la glucosa o DM-2, la suplementación con AG n-3 mejoraría la sensibilidad a insulina [6]. El consumo de aceite de pescado mejora también el perfil lipídico y reduce la inflamación, la esteatosis y el daño hepático en personas con esteatohepatitis no alcohólica [5]. De esta forma, el reemplazo de grasas saturadas por AG n-3 podría ser una intervención dietaria útil, tanto para la prevención como para el tratamiento de las alteraciones metabólicas asociadas al SM.

Con el objetivo de una mayor comprensión de la patogénesis del SM en humanos y de los efectos benéficos de los ácidos grasos n-3 del pescado, el empleo de modelos murinos ha sido de mucha utilidad. El uso de dietas hipercalóricas ricas en grasas saturadas y/o carbohidratos han permitido reproducir diversos aspectos

del SM en roedores tales como obesidad, dislipidemia y resistencia a insulina; sin embargo, la fuente de grasa determina efectos distintos en los diversos parámetros metabólicos [7, 8].

Dietas ricas en AG n-3 son capaces de mejorar la resistencia a insulina asociada a obesidad tanto en roedores como en humanos [9]. En dichos modelos de obesidad inducida, se ha observado que los n-3 aumentan la sensibilidad a insulina a través de la reducción de la inflamación del tejido adiposo [10], aumento de adipoquinas anti-hiperglicémicas y disminución de adipoquinas pro-hiperglicémicas [11-14]. Los AG n-3 también tienen efecto en reducir los niveles de triglicéridos (TG) plasmáticos [15] y hepáticos en humanos y roedores [16-19]. Se ha observado que el consumo de AG n-3 mejora el perfil de lipoproteínas a través de la disminución de las LDL pequeñas y densas altamente aterogénicas [20] y aumento del metabolismo de lipoproteínas ricas en TG [21]. Lo anteriormente expuesto hace que los AG n-3, presentes en el aceite de pescado, estén siendo considerados como herramientas útiles en el tratamiento de patologías como dislipidemia, resistencia a la insulina y esteatohepatitis no alcohólica y su ingesta periódica haya sido incorporada en las recomendaciones de la FAO-OMS [22].

También, en modelos murinos el consumo de dieta alta en grasas saturadas induce varios aspectos del síndrome metabólico. En roedores, la dieta rica en grasas aumenta los niveles de TG plasmáticos y hepáticos al mes de tratamiento; sin embargo, se ha visto que al adicionar aceite de pescado a una dieta rica en grasa se previene, en forma significativa, este aumento de TG tanto en plasma como en hígado [23]. También en roedores, la dieta rica en grasas produce obesidad e intolerancia a la glucosa al cabo de dos meses de tratamiento [24]. Las alteraciones del metabolismo de la glucosa son también prevenidas al suplementar la dieta alta en grasas con aceite de pescado [25].

Los mecanismos moleculares mediante los cuales los AG n-3 del pescado ejercen sus efectos benéficos en el SM no están claros. Se ha propuesto que ellos modulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos mediante la activación de factores de transcripción, tales como los PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) [26], que modulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de AG y TG en diversos tejidos [27-29]. Se ha propuesto que los efectos hipolipemiantes y antidiabéticos de los n-3 se deben principalmente a la activación de PPAR α [18, 25, 30-32], la isoforma más abundante en el hígado y que estimula el catabolismo hepático de lípidos, induciendo genes involucrados en la captación de AG, β -oxidación y síntesis de cuerpos cetónicos [28, 33, 34]. Este receptor es esencial para la adaptación a condiciones de estrés metabólico, tales como ayuno crónico y dieta rica en grasas,

en las que se incrementa la beta-oxidación de ácidos grasos [35]. De acuerdo con ello, diversos ligandos sintéticos de PPAR α , de la familia de los fibratos, son utilizados en clínica para el tratamiento de dislipidemias [36].

Si bien la identidad de los activadores endógenos de PPAR α no se conoce, recientemente se ha demostrado *in vitro* que un grupo de compuestos derivados de ácido araquidónico (AA), producidos por las enzimas denominadas monooxigenasas de citocromo P450 (CYP450), podrían actuar como ligandos de alta afinidad de PPAR α [37].

Las monooxigenasas de AA pertenecen a la superfamilia de genes de Citocromo P450 y participan en el metabolismo *in vivo* de AA a epoxyácidos (EETs) y ω -hidroxi ácidos (20-HETES) [38], los cuales han sido implicados en el control de la presión arterial sistémica [39]. La subfamilia 4a de Citocromo P450 (Cyp4a) corresponde a un grupo de enzimas que ω -hidroxilan el carbono terminal de los ácidos grasos. Si bien ellas metabolizan AA, en general utilizan con alta eficiencia AG de cadena mediana, específicamente ácido láurico [40]. Así, los sustratos fisiológicos para estas enzimas no están totalmente definidos y parecen ser tejido específicos. Se ha propuesto que en el hígado y en otros tejidos con alta tasa metabólica, las isoformas Cyp4a participan de esta conversión de ácidos grasos a ácidos dicarboxílicos, para ser posteriormente metabolizados, mediante β -oxidación, en el peroxisoma y la mitocondria. Interesantemente, en el hígado de roedores, varios miembros de la subfamilia Cyp4a son transcripcionalmente inducidos por ligandos sintéticos de PPAR α , como los fibratos, por el ayuno prolongado, por dieta rica en grasa, etanol y diabetes en roedores [41-46], lo que sugiere que la inducción de estas enzimas podría estar relacionada con la actividad transcripcional de PPAR α y la producción de ligandos endógenos del receptor, derivados de ácidos grasos. También se ha propuesto que la inducción de estos genes por dieta rica en grasa podría contribuir a la metabolización de ácidos grasos a ácidos dicarboxílicos para prevenir la lipotoxicidad hepática y el desarrollo de esteatosis hepática. De la misma manera, en períodos de ayuno prolongado, estas enzimas ayudarían en la generación de energía a partir de los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo [40].

Se ha observado, *in vitro*, que las isoformas Cyp4a son capaces de metabolizar DHA y EPA para formar ω -hidroxi derivados con capacidad de activar a PPAR α [47, 48]. Así, es posible que parte de los efectos benéficos de los AG n-3 del aceite de pescado sobre el metabolismo de lípidos y glucosa, en condiciones de obesidad inducida por dieta rica en grasas, dependan de las isoformas Cyp4a y la formación de ω -hidroxi derivados con capacidad para activar a PPAR α . Este planteamiento debe ser evaluado *in vivo* para establecer inequívocamente la

participación de estas enzimas en los efectos benéficos de los n-3 AG sobre el metabolismo de lípidos y de carbohidratos.

Para estudios *in vivo*, el modelo murino es ampliamente utilizado debido a la posibilidad de abatir específicamente ciertos genes y evaluar los efectos fisiológicos y/o fisiopatológicos de ello. En ratones existen 3 isoformas de la familia Cyp4a: Cyp4a10, Cyp4a12 y Cyp4a14, de las cuales las isoformas 4a10 y 4a14 son inducidas en respuesta a ligandos sintéticos de PPAR α en ayuno crónico, diabetes y obesidad. [49]. Los ratones "knock out" (KO) para las isoformas Cyp4a10 y Cyp4a14 han sido desarrollados en el laboratorio del Dr. Jorge Capdevila y estudios realizados en ellos han demostrado la importancia de estas enzimas en el control de la presión arterial sistémica. De acuerdo con ello, ambos ratones KO presentan hipertensión arterial espontánea o inducida por sal [39, 50-52].

Si bien los antecedentes descritos previamente sugieren que las isoformas Cyp4a podrían participar en el control de la presión arterial en roedores, la participación de estas enzimas en la homeostasis de lípidos sistémica no se ha estudiado, ni tampoco su papel como generadores de lípidos bioactivos derivados de ácidos grasos n-3.

El laboratorio del Dr. Arnaldo Gatica cuenta con una colonia de ratones KO de la isoforma Cyp4a14, los cuales constituyen un excelente modelo para evaluar si Cyp4a14 es necesaria para los efectos benéficos del aceite de pescado sobre el metabolismo lipídico y glucídico, en condiciones de estrés metabólico, tales como el tratamiento con dieta rica en grasas.

En este contexto, la hipótesis de esta Tesis es que la inactivación genética de Cyp4a14 reduce los efectos benéficos del aceite de pescado en ratones sometidos a dieta obesogénica, rica en grasas saturadas.

Para evaluar esta hipótesis, ratones WT y Cyp4a14KO fueron tratados por 2 meses con dieta rica en grasa, de manera de desarrollar en ellos obesidad y resistencia a la insulina. Posteriormente, fueron tratados por 1 mes con dietas ricas en grasa, suplementadas con aceite de pescado. Al final del tratamiento se evaluó, para ambos genotipos, el efecto benéfico de la suplementación sobre diversos parámetros metabólicos relacionados con el metabolismo de lípidos y de la glucosa. Como controles, se utilizó dietas ricas en grasa suplementadas con aceite de coco hidrogenado (enriquecido en ácidos grasos saturados de cadena mediana y corta) y aceite de maíz (enriquecido en ácidos grasos n-6 mono y poliinsaturados). La intervención con aceites se realizó bajo dos condiciones experimentales, con dietas que contenían un 66% y un 46% de las calorías provenientes de la grasa (66% grasa y 46% grasa) incluida la suplementación con aceite y cuya composición

se describe en la sección métodos y se detalla en la tabla I anexada al final del documento.

HIPÓTESIS:

La inactivación genética de Cyp4a14 reduce los efectos benéficos del aceite de pescado en ratones sometidos a dieta obesogénica, rica en grasas saturadas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre el metabolismo de lípidos y de carbohidratos en ratones obesos silvestres y "knock out" para el gen de Cyp4a14 (Cyp4a14KO).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Evaluar parámetros morfométricos en los ratones WT y Cyp4a14KO, bajo condiciones de dieta rica en grasas (dieta obesogénica) y posteriormente suplementadas con aceite de coco hidrogenado, aceite maíz o de pescado.

2.- Evaluar los parámetros bioquímicos asociados con el metabolismo de lípidos en plasma e hígado en ratones WT y Cyp4a14KO, bajo condiciones de dieta obesogénica y posteriormente suplementadas con aceite de coco hidrogenado, aceite de maíz o de pescado.

3.- Evaluar los parámetros bioquímicos asociados con el metabolismo de la glucosa en los ratones WT y Cyp4a14KO, bajo condiciones de dieta rica en grasas saturadas y posteriormente suplementadas con aceite de coco hidrogenado, aceite de maíz o de pescado.

MÉTODOS:

I. ANIMALES, DIETAS Y DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se realizaron 4 experimentos independientes entre ellos, con un mínimo de 4 animales por tratamiento, lo que resultó en un total de 178 ratones intervenidos.

Ratones machos WT o KO para la isoforma de Citocromo P450 Cyp4a14 (Cyp4a14KO), previamente genotipificados, ambos de "background" genético 129SVj fueron mantenidos en ciclos de luz –oscuridad de 12h, con acceso libre a comida y agua. Los ratones fueron alimentados con dieta baja en grasas saturadas (4,3g % del peso y 10% de las calorías) desde el destete (a los 21 días) hasta la edad de 2 meses. Posteriormente se mantuvieron en dieta rica en grasas saturadas, (35g % del peso y 60% de las calorías) durante 70 días; período suficiente para producir obesidad, intolerancia a la glucosa y dislipidemia en los ratones [23]. Cada grupo de animales obesos (WT y KO) se dividió en 3 subgrupos, a los que se les alimentó por 40 días más con una dieta rica en grasas suplementada con aceite de coco, de maíz o de pescado en una proporción de 10% p/p. Durante el periodo de suplementación con aceites se utilizó dos tipos de dieta rica en grasas: en la primera condición experimental (66% grasa) se utilizó la misma dieta rica en grasas saturadas usada durante el período de inducción de obesidad, que luego de la suplementación con aceites presentó un total de 66% de grasa. En la segunda condición experimental (46% grasa), se utilizó una mezcla de dieta baja en grasas y dieta alta en grasas, que luego de la suplementación, presentó un 46% de grasa. Esta última dieta presentó un aporte total de grasas disminuido, pero compensado por un aumento del aporte de carbohidratos sin modificar el aporte de proteínas. Una descripción detallada de la composición de las dietas se presenta en la tabla I anexada al final del documento.

Según un estudio realizado por Neschen, la suplementación de una dieta rica en grasa (59% grasa) con un 8% p/p de aceite de pescado, por dos semanas, es capaz de mejorar los parámetros tanto del metabolismo de lípidos como de la glucosa en ratones [17, 25]. Simončíkova y cols. obtuvieron también una notable mejoría en la acción insulínica y en los lípidos tanto plasmáticos y hepáticos al sustituir con un 10% p/p de aceite de pescado una dieta rica en grasa (70% grasa) a ratas con SM por 21 días [23]. De esta manera, estimamos que la suplementación con un 10% p/p de aceite de pescado por un mes, sería suficiente para obtener mejoras en los parámetros metabólicos de los ratones obesos de nuestros experimentos.

Los aceites utilizados como control fueron isocalóricos con el de pescado pero con una composición de ácidos grasos diferente. Así, el aceite de coco hidrogenado aportó principalmente ácidos grasos de cadena mediana y corta. El segundo control, aceite de maíz, aportó principalmente ácidos grasos mono y poli insaturados n-6.

Se obtuvieron de esta manera 5 grupos de tratamiento. Los 3 grupos suplementados con los distintos aceites variaron en el contenido de grasa total de las dietas durante el periodo de intervención con aceites entre las dos condiciones experimentales utilizadas (66% y 46% grasa).

Grupo AC: Sometido durante 2 meses a dieta alta en grasa y luego 40 días suplementada con 10% aceite de coco.

Grupo AM: Sometido durante 2 meses a dieta alta en grasa y luego 40 días suplementada con 10% aceite de maíz.

Grupo AP: Sometido durante 2 meses a dieta alta en grasa y luego 40 días suplementada con 10% aceite de pescado.

Grupo DBG. Sometido durante todo el tratamiento a dieta baja en grasa (10% grasa).

Grupo DAG: Sometido durante todo el tratamiento a dieta alta en grasa (60% grasa).

Cada grupo de tratamiento tuvo su representación tanto en WT como en KO (ver esquema de tratamientos en Figura 1 anexada al final del documento).

Dado que el aceite de coco hidrogenado no contiene ácidos grasos poliinsaturados, se espera que no afecte la señalización vía Cyp4a14. El aceite de maíz, rico en n-6 constituye un control interesante ya que los AG n-6, específicamente AA, son metabolizados por algunas isoformas de la familia Cyp4a, pero específicamente Cyp4a14 no metaboliza AA significativamente *in vitro* [37], de manera que los efectos de la suplementación con este tipo de aceite tampoco deberían verse alterados por la inactivación genética de Cyp4a14. Según lo descrito en la Hipótesis, los efectos de la suplementación con aceite de pescado en cambio, sí debieran verse afectados por la inactivación genética de Cyp4a14.

En este estudio se comparó la dieta suplementada con aceite de pescado con las suplementadas con aceite de coco y de maíz. Los grupos DBG y DAG son marcos de referencia para observar el efecto del tratamiento solo con dieta baja en grasa o con dieta alta en grasa durante todo el período de suplementación con aceites.

Las dietas base tienen composición conocida (open source diets) y son fabricadas por la empresa Research Diet, USA: dieta alta en grasas producto

D12492 y dieta baja en grasas producto D12450B de Research Diets. Los aceites utilizados son distribuidos por la empresa MP Biochemicals, USA y presentan una composición de ácidos grasos certificada: aceite de pescado refinado (*Menhaden*), catálogo MP 960120, aceite de coco hidrogenado catálogo MP 901404 y aceite de maíz catálogo MP 901414. La composición de las dietas y aceites está disponible en <http://www.researchdiets.com> y www.mpbio.com, respectivamente.

Las dietas se prepararon en un mezclador mecánico. Para los experimentos con 66% grasa se agregó dieta alta en grasa y el aceite correspondiente en una proporción p/p de 9:1. Para los experimentos con 46% grasa se preparó una nueva dieta alta en grasa, constituida por 60% de dieta baja en grasa más 40% de la dieta alta en grasa usada anteriormente. Esta nueva dieta se mezcló con el tipo de aceite correspondiente en la misma proporción p/p que en el caso anterior (9:1). Se preparó dieta en forma quincenal y éstas fueron almacenadas bajo nitrógeno en bolsas selladas y guardadas a -20°C hasta su uso. Se agregó dieta nueva cada 7 días a las respectivas jaulas de animales.

II. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.

II A. PESO DE ANIMALES, ÓRGANOS Y CONTROL DE INGESTA:

Control de ingesta alimenticia

Durante todo el período de tratamiento con dieta rica en grasa y durante la intervención con aceite se evaluó el peso de los animales y la ingesta alimenticia en forma semanal. Para ello se agregó la dieta previamente pesada a las jaulas de animales al inicio de la semana, al cabo de la cual se pesó la dieta remanente en cada jaula. Los resultados se expresaron como Kcal/día promedio por ratón y como gramos/día promedio por ratón.

Se realizaron mediciones de la ingesta y del peso de los animales en forma semanal durante las 15 semanas que duró el período de experimentación, esto es desde la edad de 2 meses hasta los 5-6 meses.

Parámetros morfométricos

Al final de cada experimento, los animales fueron puestos en ayuno por 6 horas, pesados y sacrificados. Se recolectó plasma y tejidos (grasa epididimal e hígado), los cuales fueron pesados y posteriormente congelados en Nitrógeno líquido.

II B. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS METABÓLICOS.

Para evaluar el efecto del tratamiento inicial con dieta rica en grasas en los animales WT y KO se realizaron diversas determinaciones: a los 60 días de tratamiento se tomaron muestras de sangre mediante punción del seno submaxilar. Al plasma obtenido se le evaluó los niveles de colesterol y triglicéridos según se describe más adelante. A los 70 días de tratamiento con dieta rica en grasas se realizó un test de tolerancia a la glucosa (TTG) según se describe más adelante.

Luego del período de suplementación con aceites, diez días previos al fin del tratamiento y sacrificio de los animales, éstos se sometieron a un nuevo TTG para evaluar el efecto de la intervención dietaria sobre la tolerancia a la glucosa.

Test de tolerancia a glucosa (TTG):

Los TTG se realizaron a través de la inyección intraperitoneal de glucosa en una dosis de 1,5 mg/g peso. Se colectaron muestras de sangre a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los niveles de glucosa en sangre fueron evaluados mediante glucómetro común marca One Touch Ultra a través de una gota de sangre obtenida desde la cola de los ratones. La aplicación del TTG se realizó siempre 10 días antes de la obtención de las otras muestras, ya sea de plasma o tejidos, para eliminar las eventuales influencias que pudiese tener la inyección de glucosa en parámetros metabólicos que fueron medidos posteriormente. Los resultados se expresaron como curvas de tolerancia a la glucosa y las áreas bajo la curva (ABC) fueron determinadas mediante el método de los trapecios.

Parámetros metabólicos en plasma:

Al final de los tratamientos con dietas suplementadas con aceites (grupos AC-AM-AP) o no suplementadas (grupos DBG y DAG), luego de 6 horas de ayuno, se midieron los niveles de glucosa plasmáticos, mediante el glucómetro antes señalado, a través de una gota de sangre obtenida desde la cola de los ratones. Posterior al pesaje y a la toma de glicemia de cada ratón, los animales se

sacrificaron de acuerdo con los protocolos sugeridos por el Comité de Bioética del INTA. Luego del sacrificio se extrajo sangre a través de una punción en la vena cava y se recolectó la sangre en jeringas tratadas con EDTA para evitar la coagulación. Se obtuvieron los plasmas mediante centrifugación a 800 x g por 8 min. Éstos se congelaron bajo nitrógeno líquido y se guardaron en un "freezer" a -80°C. para su utilización posterior.

Se determinaron los niveles plasmáticos de TG, colesterol total, ácidos grasos libres e insulina.

Los niveles de colesterol total y TG se determinaron para cada animal en duplicado a través de los kits colorimétricos Colestat enzimático AA líquida y TG Color GPO/PAP AA líquida respectivamente (Wiener laboratorios S.A.I.C, Argentina).

Los niveles de ácidos grasos libres se determinaron para cada animal, en duplicado, mediante el kit colorimétrico NEFA-HR(2) (Wako Chemicals, USA, Inc).

Los niveles plasmáticos de insulina fueron evaluados, en duplicado, a partir de "pools" de plasmas provenientes de 2 o 3 animales, utilizando un Kit de ELISA para Insulina de rata y ratón marca Millipore, USA.

Parámetros metabólicos en tejidos:

Se determinaron los niveles hepáticos de TG y colesterol total. Los hígados congelados fueron pulverizados en frío mediante un mortero de acero.

Aproximadamente 200 mg de tejido en polvo fueron homogeneizados en homogeneizador ultraturax y los lípidos totales extraídos mediante el método de Folch [53]. Los lípidos totales fueron secados bajo corriente de nitrógeno, resuspendidos en 1 ml. de cloroformo/metanol 2/1, sonicados en sonicador de baño por 30 segundos y divididos en alícuotas que contenían el volumen de esta dilución correspondiente a 50 mg. de tejido hepático. Estas alícuotas fueron secadas bajo corriente nitrógeno y luego resuspendidas en 500-750 ul de Tritón x-100 al 0,05% mediante sonicación exhaustiva con sonicador de vástago. Finalmente, alícuotas de esta suspensión se utilizaron para medir los niveles de colesterol total y TG utilizando los kits descritos previamente.

III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizaron 4 experimentos independientes, de al menos 4 animales por cada tratamiento, con un total de 178 animales. Este número se determinó en base al tiempo, espacio y capacidad de manejo de los animales de nuestro laboratorio.

Se realizó una descripción de las variables a medir en los distintos grupos de dieta a través de medidas de resumen. Los datos obtenidos se analizaron mediante test ANOVA para dos factores fijos, uno de los cuales fue el tipo de ratón (WT o KO), siendo el otro factor el tipo de aceite suplementado: aceite de coco, aceite de maíz y aceite de pescado. Esto, con el fin de observar los efectos del genotipo (tipo de ratón) y del grupo de dieta (aceite suplementado).

Para el análisis de muestras univariadas se utilizó el test de Kruskal-Wallis para la comparación entre los distintos grupos de dietas de un mismo genotipo y la Prueba de Mann-Whitney para la comparación de estos pares, y también para la comparación de pares entre genotipos (WT y KO) dentro de cada grupo de dieta. Los análisis estadísticos se consideraron significativos con un $p < 0,05$, excepto en la comparación entre los 3 distintos tipos de aceites, en que se realizó la corrección de Bonferroni, considerándose significativo $p < 0,017$.

Los grupos que siguieron durante todo el tratamiento, ya sea con dieta baja en grasa (DBG), como alta en grasa (DAG), se utilizaron como marco de referencia con respecto a las dietas suplementadas con los distintos tipos de aceites. A pesar de no tratarse de grupos con dietas isocalóricas entre sí, se realizó la comparación estadística entre DBG y DAG con el objetivo de observar las diferencias entre ambos tratamientos. Esto se realizó tanto en las mediciones tomadas a los 70 días de tratamiento (previo a la etapa de suplementación con aceites), como a las tomadas al final de los períodos de suplementación con aceites. Aunque se realizó la comparación entre los grupos DBG y DAG, no se realizó la comparación entre grupos de DBG y DAG con los grupos suplementados con aceites. Éstos últimos se compararon entre sí (AC-AM-AP) dentro de cada genotipo.

Para los test de tolerancia a la glucosa y las curvas de peso se usó el modelo lineal general para medidas repetidas, por tratarse de varias mediciones en distintos tiempos en un mismo animal o grupo de animales. En el caso del TTG se realizó un test de ANOVA para medidas repetidas. Luego, utilizando las áreas bajo la curva (ABC) se realizó la comparación entre grupos de dieta tratados con aceites de un mismo genotipo con el test de Kruskal-Wallis y la comparación de a pares con la prueba de Mann-Whitney. Ésta última también se utilizó para la comparación entre genotipos (WT y KO) dentro de cada grupo de dieta. En las curvas de peso,

también se realizaron test de ANOVA para medidas repetidas y luego se hicieron las comparaciones múltiples con el test *post-hoc* de Bonferroni.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SPSS 15.0 para Windows.

RESULTADOS

1.-Efecto de la dieta alta en grasas (60% grasa, 20% carbohidratos, 20% proteínas) sobre los ratones WT y 4a14KO.

Se determinó el efecto de la dieta alta en grasas (DAG) durante un periodo de 70 días para obtener animales obesos e intolerantes a la glucosa, se evaluaron parámetros morfométricos y metabólicos para determinar si el tratamiento con dieta alta en grasas produce efectos representativos de síndrome metabólico en los animales WT y Cyp4a14KO. Los resultados obtenidos son los siguientes:

1.1 Curva de peso durante los 70 días de tratamiento con DAG

En la etapa previa a la intervención dietaria con aceites, el tipo de dieta tuvo un efecto importante. Tanto los ratones WT como los KO de los grupos tratados con DAG presentaron un incremento de su peso corporal sostenido a través del tiempo, que fue mayor en comparación a los grupos tratados con DBG. Sin embargo, esta diferencia solo fue significativa en los KO ($p < 0,001$), ya que como puede observarse en la figura 3, los ratones KO tratados con DAG presentaron curvas de peso con una razón de crecimiento mayor que la de los WT igualmente tratados con DAG. Al inicio del tratamiento por 70 días, el peso de todos los ratones fue similar, sin observarse diferencias de peso significativas entre ninguno de los 4 grupos de ratones tratados.

Nota: los valores p mostrados en los resultados de las curvas de peso corresponden a diferencias de las curvas en su conjunto. Además, se determinó si existieron diferencias en el peso inicial de los ratones (primer punto de la curva de peso).

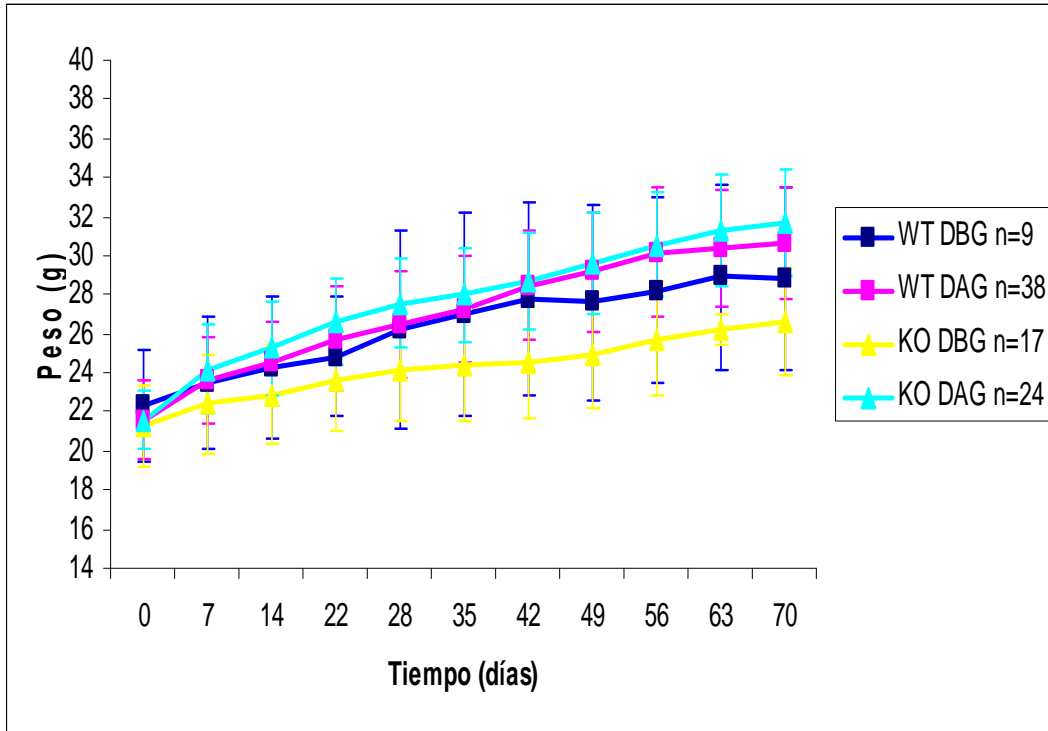
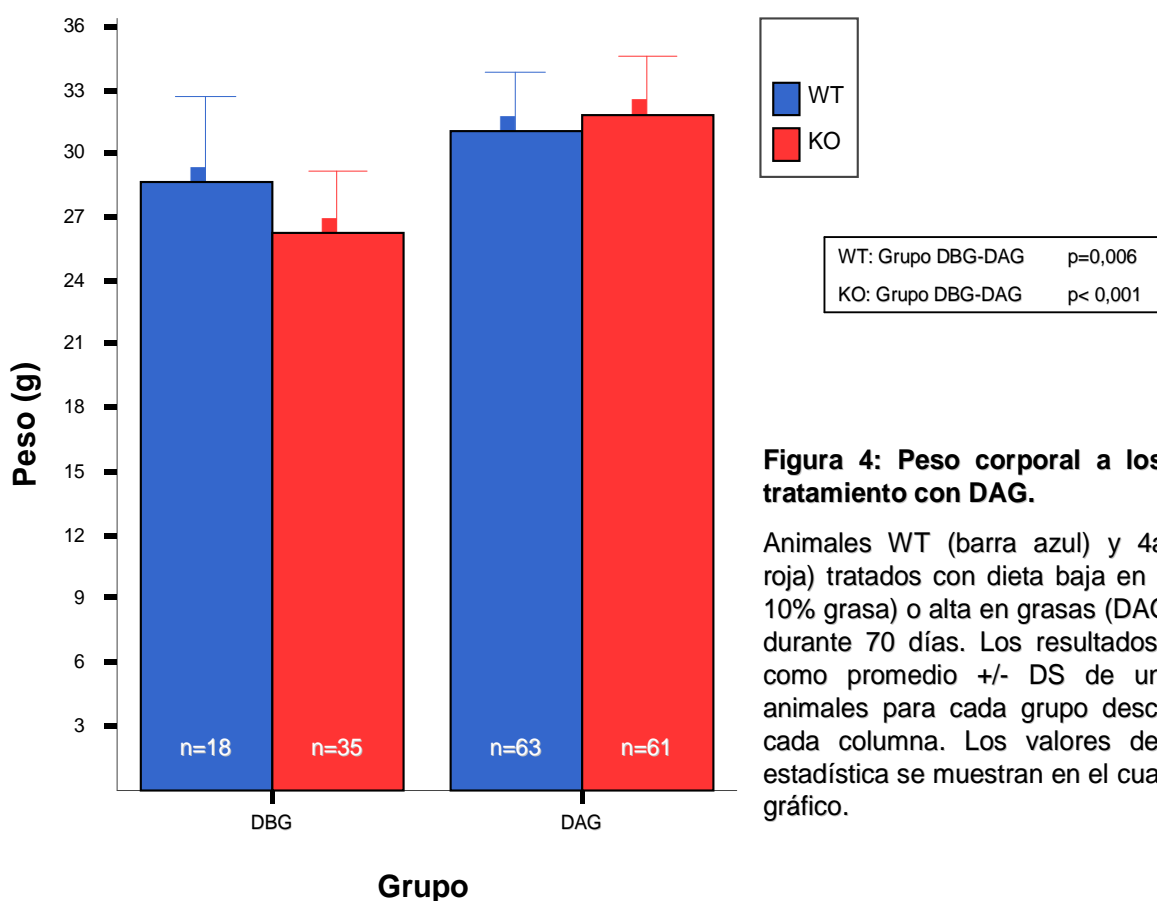


Figura 3: Curva de peso durante los 70 días de tratamiento con DAG.

Peso de ratones WT y 4a14KO tratados con dieta baja en grasas (DBG, 10% grasa) o alta en grasas (DAG, 60% grasa) durante 70 días. Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales que se muestra en la leyenda del gráfico. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

1.2 Peso a los 70 días de tratamiento con DAG

A los 70 días de tratamiento con dieta alta en grasas, la figura 4 muestra que los grupos tratado con DBG presentaron un peso promedio menor que los grupos tratados con DAG, siendo esto válido para ambos genotipos. El incremento de peso de los ratones WT con DAG con respecto a la DBG fue de 2,4 g. en promedio, lo que corresponde a un aumento de un 8,4% de su peso con respecto al grupo tratado con DBG, (28,6g +/- 4,0g y 31,0g +/- 2,7g; DBG y DAG respectivamente; $p=0,006$), y en los KO el incremento de peso fue 5,6 g, lo que corresponde al 21% de su peso con respecto al grupo control DBG. (26,2g +/- 2,8g y 31,8g +/- 2,7g; DBG y DAG respectivamente; $p<0,001$).



1.3 Ingesta alimenticia diaria promedio a los 70 días de tratamiento con DAG

Cantidad: Gramos/día (g/día)

El efecto del tipo de dieta fue significativo en la ingesta alimenticia medida en g/día promedio por ratón durante la etapa previa a la intervención con aceites. La figura 5A muestra que los dos grupos tratados con DBG presentaron una ingesta un 31% mayor que los grupos tratados con DAG, siendo esta diferencia significativa tanto para ratones WT (2,4g +/- 0,4g y 1,9g +/- 0,1g; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) como para ratones KO (2,4g +/- 0,2g y 1,8g +/- 0,2g; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$). En el grupo con DAG los ratones WT presentaron una ingesta un 3,6% mayor que los KO. (1,9g +/- 0,1g y 1,8g +/- 0,2g; WT Y KO respectivamente; $p = 0,005$).

Calorías: Kcal/día

La ingesta calórica promedio expresada en Kcal/día promedio por ratón durante la etapa previa a la intervención con aceites, se muestra en la figura 5B, en la cual se observa que la ingesta calórica fue similar entre los dos grupos de dietas (DBG y DAG). En el grupo con DBG no se encontraron diferencias significativas entre WT y KO. En el grupo con DAG los ratones KO presentaron una ingesta un 4,1% menor que los WT. (9,7Kcal +/- 1,0Kcal y 9,3Kcal +/- 1,1Kcal; WT y KO respectivamente; $p = 0,009$).

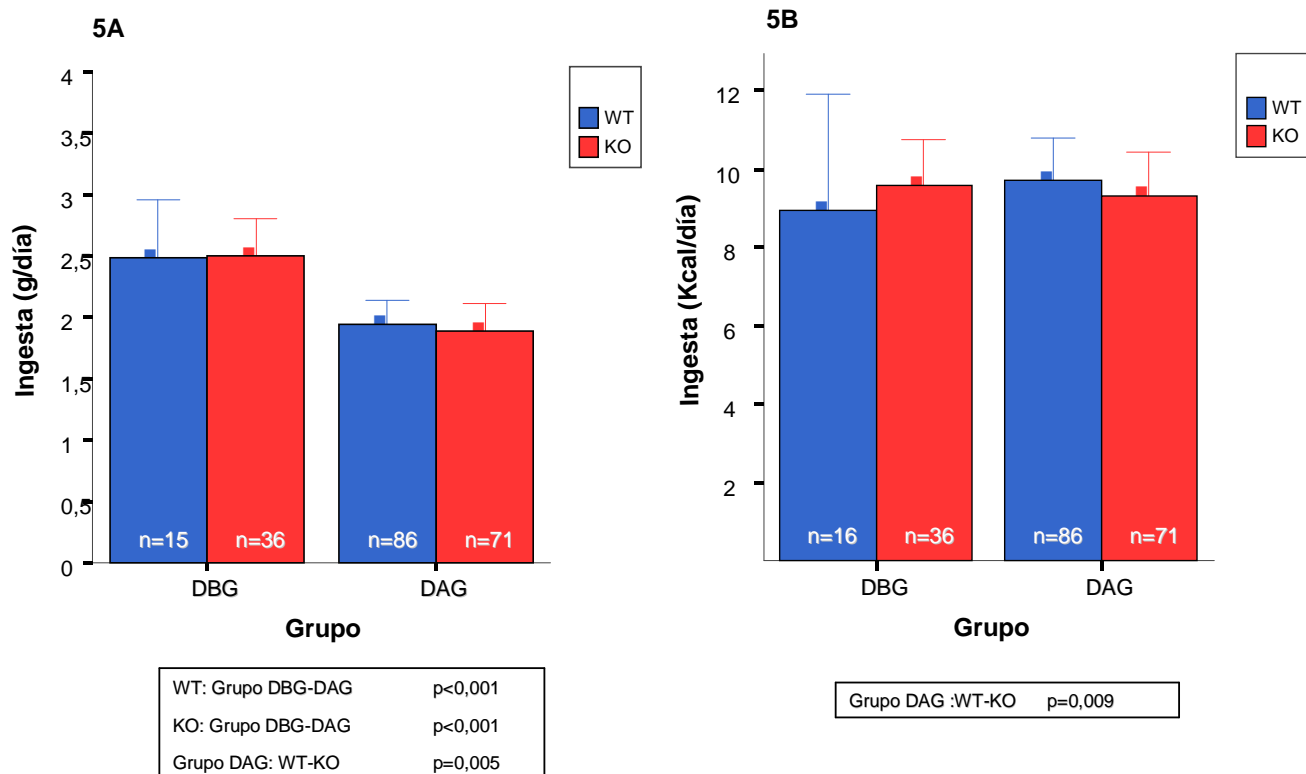


Figura 5: Ingesta alimenticia y calórica diaria promedio durante los 70 días de tratamiento con DAG.

Ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) tratados con dieta baja en grasas (DBG, 10% grasa) o alta en grasas (DAG, 60% grasa) durante 70 días. **5A:** Ingesta alimenticia expresada en g/día promedio +/- DS. **5B:** Ingesta calórica expresada en Kcal/día promedio +/- DS. El número de animales para cada grupo se muestra al pie de cada columna y los valores de significancia estadística se muestran en los cuadros adjuntos a los gráficos.

1.4 Triglicéridos plasmáticos a los 70 días de tratamiento con DAG

En la medición de los TG plasmáticos a los 70 días de tratamiento con dieta rica en grasas, previo a la intervención con aceites, observamos, tal como se muestra en la figura 6A, que al comparar la DBG con la DAG, tanto los ratones WT como los KO presentaron una tendencia a disminuir sus niveles de TG plasmáticos al ser suplementados con DAG. Los primeros disminuyeron sus niveles en un 15,6% y los segundos en un 12,4%; sin embargo, este cambio no fue significativo para ninguno de los genotipos WT o KO. Al comparar los ratones WT con los KO dentro de cada grupo de dieta, observamos que tanto en dieta DBG como en DAG los ratones KO presentaron niveles de TG plasmáticos mayores que los ratones WT. (0,5 +/- 0,06 y 0,7 +/- 0,1ug/ul; DBG, WT y KO respectivamente; $p=0,008$ y (0,5 +/- 0,06g; 0,6 +/- 0,1ug/ul; DAG, WT y KO respectivamente; $p=0,006$).

1.5 Colesterol plasmático a los 70 días de tratamiento con DAG

Como lo muestra la figura 6B, el tratamiento con DAG por 70 días aumentó los niveles de colesterol plasmáticos en forma significativa con respecto a los animales tratados con DBG para ambos genotipos. En los animales WT el incremento fue de un 44% (1,0 +/- 0,1 y 1,4 +/- 0,1ug/ul; DBG y DAG respectivamente; $p=0,008$) mientras que en los KO fue de un 96% (0,9 +/- 0,08 y 1,9 +/- 0,1ug/ul; DBG y DAG respectivamente; ($p<0,001$). Además, en el grupo tratado con DAG, los ratones KO presentaron niveles de colesterol un 24,7% más alto que los WT (1,4 +/- 0,1 y 1,9 +/- 0,1ug/ul; WT y KO respectivamente; $p=0,002$).

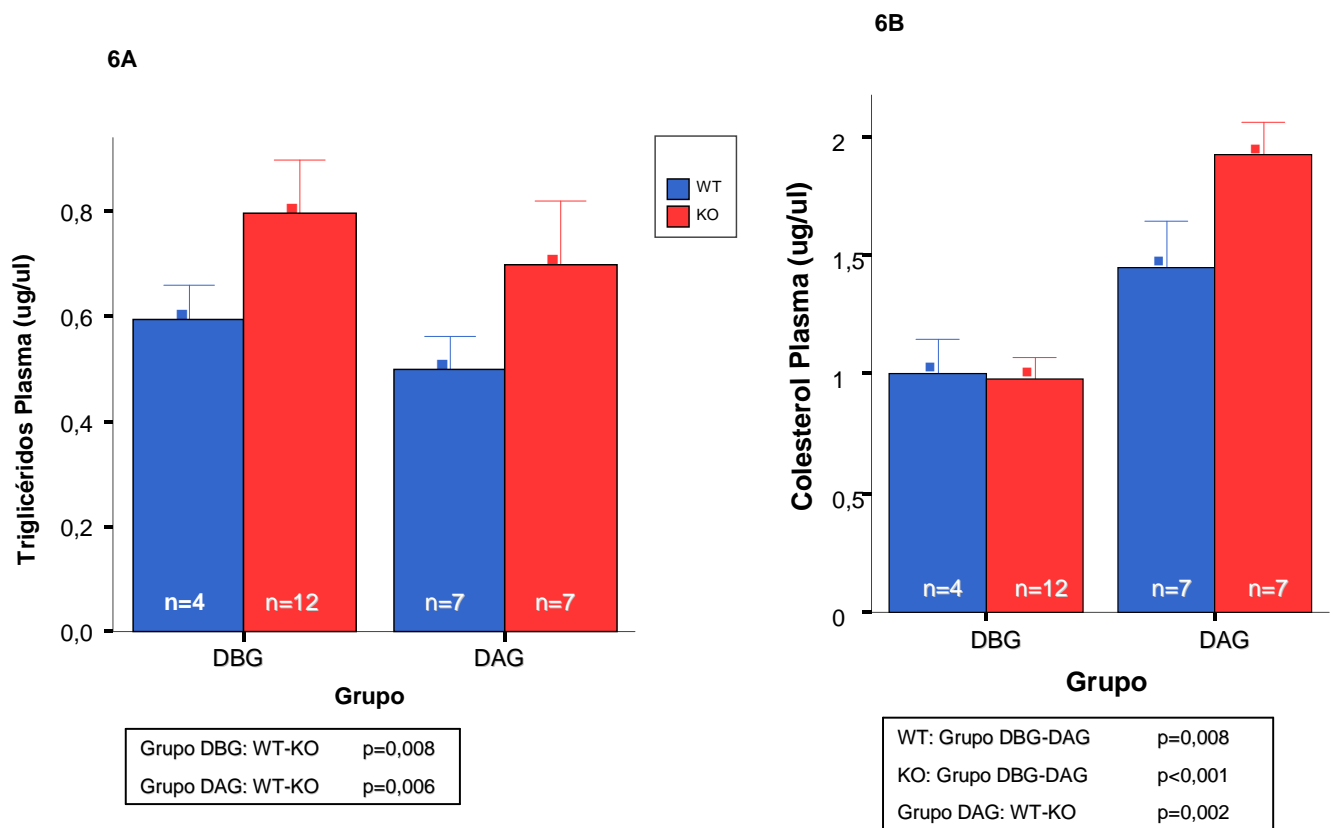


Figura 6: Lípidos plasmáticos a los 70 días de tratamiento con DAG.

Animales WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) tratados con dieta baja en grasas (DBG, 10% grasa) o alta en grasas (DAG, 60% grasa) durante 70 días. **6A:** Triglicéridos plasmáticos y **6B:** Colesterol plasmático. Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en los cuadros adjuntos a los gráficos.

1.6 Glucosa plasmática a los 70 días de tratamiento con DAG

Luego de 70 días de tratamiento con DAG, observamos, como muestra la figura 7, que ambos genotipos aumentaron en forma significativa sus niveles de glucosa en plasma con respecto a los grupos tratados con DBG (111 +/- 16 y 130 +/- 16mg/dL; WT; DBG y DAG respectivamente; $p=0,012$) y (120 +/-11 y 148 +/- 15mg/dL; KO; DBG y DAG respectivamente; $p<0,001$). En el grupo de ratones tratados con DAG, se observó que los KO presentaron niveles de glucosa plasmática más elevados que los WT (130 +/- 16 y 148 +/- 15mg/dL; WT y KO respectivamente; $p=0,001$).

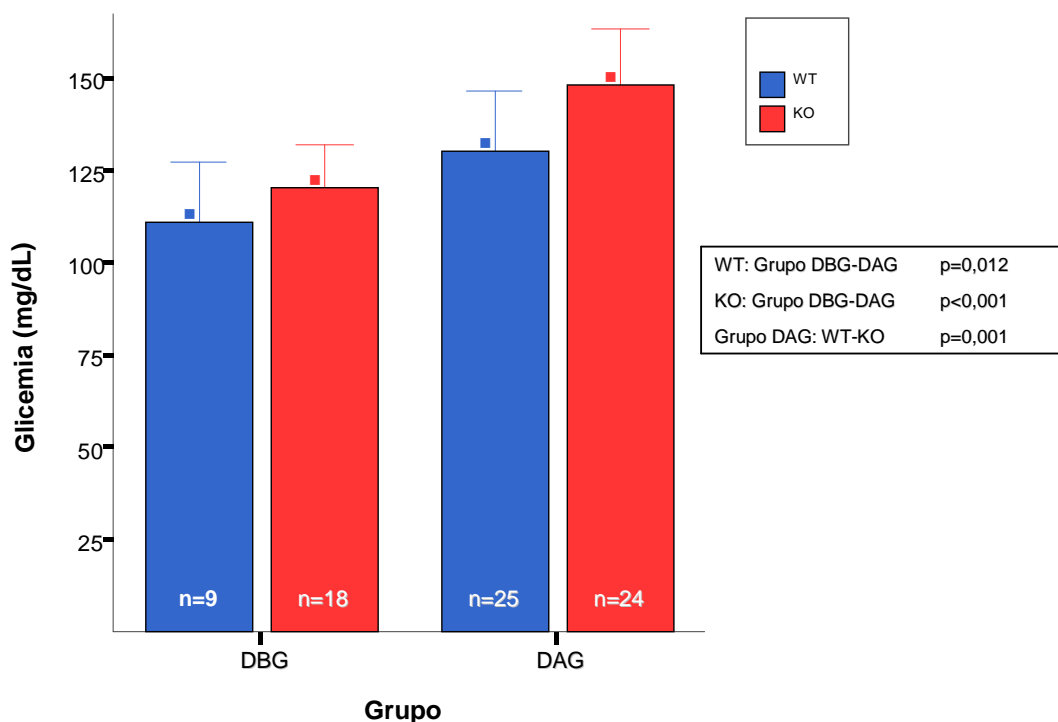


Figura 7: Glucosa plasmática a los 70 días de tratamiento con DAG.

Animales WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) tratados con dieta baja en grasas (DBG, 10% grasa) o alta en grasas (DAG, 60% grasa) durante 70 días. Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

1.7 Test de tolerancia a la glucosa a los 70 días de tratamiento con DAG

Al realizarse el TTG al final del período en que se sometió a los animales a una dieta rica en grasa, previo a la suplementación con aceites, se observó un efecto significativo de la DAG en la tolerancia a la glucosa en comparación con los grupos tratados con DBG. Como muestra la figura 8, los ratones WT y los KO del grupo tratado con DAG presentaron curvas de glicemia mayores y por lo tanto ABC mayores que sus respectivos controles tratados con DBG. (21413 +/- 286 y 31026 +/- 5464; WT; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y (19757 +/- 2503 y 34812 +/- 4622; KO; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$). Dentro del grupo tratado con DAG, los ratones KO presentaron un área bajo la curva un 11% mayor que los WT (31026 +/- 5464 y 34812 +/- 4622; WT y KO respectivamente; $p = 0,01$).

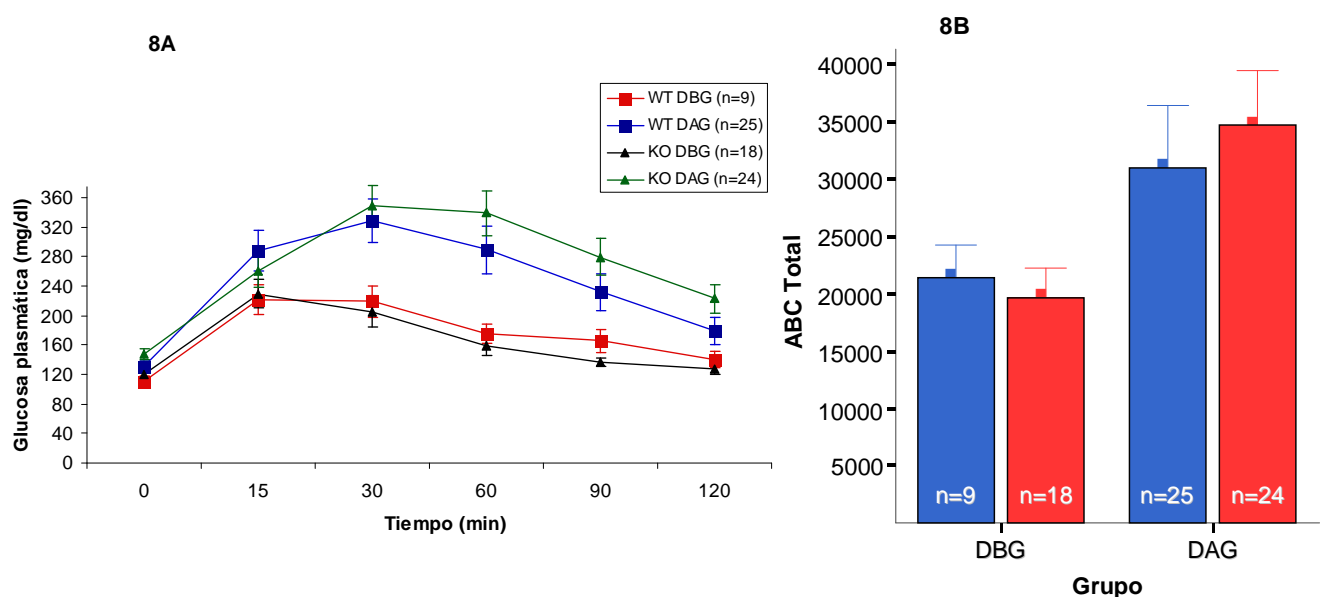


Figura 8: TTG a los 70 días de tratamiento con DAG.

8A: Curvas de tolerancia a la glucosa de los animales WT y 4a14KO tratados con dieta baja en grasas (DBG, 10% grasa) o alta en grasas (DAG, 60% grasa) durante 70 días. **8B:** Área bajo la curva (ABC) de los animales WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) tratados con DBG o DAG. Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

WT: Grupo DBG-DAG	$p < 0,001$
KO Grupo DBG-DAG	$p < 0,001$
Grupo DAG: WT-KO	$p = 0,01$

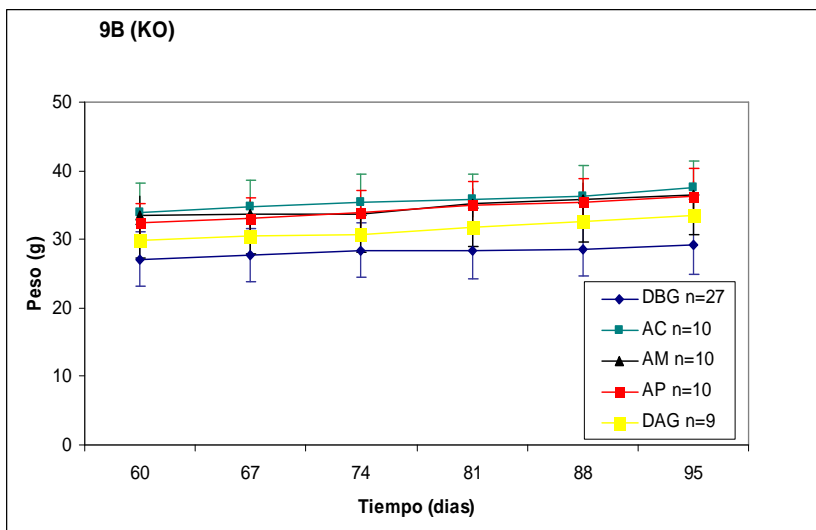
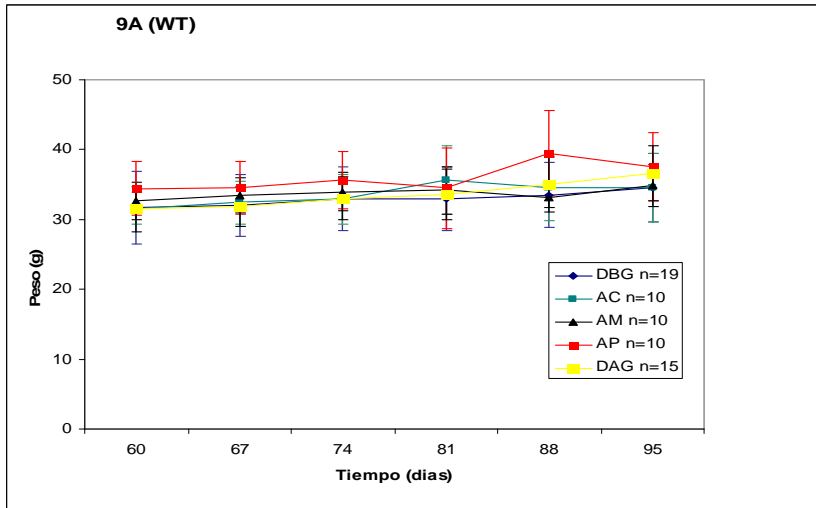
2.0 Suplementación con aceites de distinta composición de ácidos grasos, bajo condiciones de dieta muy alta en grasa (66% grasa, 17% carbohidratos, 17% proteínas)

En los animales ya tratados con dieta alta en grasas durante 70 días y que presentaban un grado importante de: obesidad, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (descrito en la sección 1 de los resultados) se evaluó el efecto de la suplementación de la dieta muy alta en grasas (60% grasa) con un 10% p/p de tres tipos de aceites con distinta composición de ácidos grasos. Se evaluaron diversos parámetros morfométricos y metabólicos al final del período de intervención de un mes. Además, se muestran los resultados de 2 grupos control no intervenidos, los grupos que continuaron con dieta alta en grasas (DAG, 60% grasa) o baja en grasas (DBG, 10% grasa) durante el mes de intervención con aceites. Los resultados obtenidos son los siguientes:

2.1 Curva de peso durante el período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

Tal como muestra la figura 9A, el peso inicial de todos los ratones WT fue similar entre todos los grupos, sin observarse una diferencia en la curva de peso de ratones tratados con DBG con respecto a los tratados con DAG ni al inicio ni a lo largo del seguimiento durante esta etapa. En los ratones KO, tal como lo muestra la figura 9B, el grupo tratado con DBG inició esta etapa con un peso por debajo de todos los demás grupos que habían sido previamente tratados con DAG ($p < 0,001$), y se mantuvo con una curva de peso por debajo del grupo tratado con DAG a lo largo de todo el seguimiento ($p < 0,001$). Solo en los ratones WT hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con aceites. El grupo tratado con AP, se presentó con una curva de peso por sobre los otros grupos tratados con aceites a lo largo del seguimiento durante esta etapa ($p = 0,012$ con AC y $p < 0,001$ con AM). Entre el AC y el AM también hubo diferencias significativas en los WT, con menor crecimiento en este último grupo ($p = 0,005$). En los KO no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los ratones tratados con los distintos tipos de aceites. Diferencias entre genotipos se observaron en el grupo tratado con AM, en que los KO mantuvieron una curva de peso por sobre los WT ($p = 0,01$), y en los grupos con AP, DBG y DAG, en que los KO mantuvieron una curva de peso por debajo de los WT ($p = 0,005$, $p = 0,002$ y $p = 0,047$ respectivamente).

Nota: los valores p mostrados en los resultados de las curvas de peso corresponden a diferencias de las curvas en su conjunto. Además, se determinó si existieron diferencias en el peso inicial de los ratones (primer punto de la curva de peso).



KO: Grupo DBG -DAG	p<0,001
WT: Grupo AC-AM	p=0,005
WT: Grupo AC-AP	p=0,012
WT: Grupo AM-AP	p<0,001
Grupo AM: WT-KO	p=0,01
Grupo AP: WT-KO	p=0,005
Grupo DBG: WT-KO	p=0,002
Grupo DAG: WT-KO	p=0,047

Figura 9: Curvas de peso durante el periodo de suplementación con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa en Ratones WT (9A) y 4a14KO (9B) durante la etapa de suplementación por un mes. Los resultados se expresan como promedio de peso (g) y error estándar (SE) para un número de animales de cada grupo (n) en la leyenda de cada gráfico. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto a los gráficos.

2.2 Peso promedio al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

La figura 10 muestra que al comparar la DBG con la DAG, no se observaron diferencias de peso al final del tratamiento, entre los ratones tratados con DBG y los tratados con DAG, en WT ni en KO. Entre los grupos suplementados con distintos aceites (AC-AM-AP) no se observaron diferencias en el peso en ninguno de los dos genotipos. Tampoco hubo diferencias significativas entre genotipos WT y KO dentro de algún grupo de dieta.

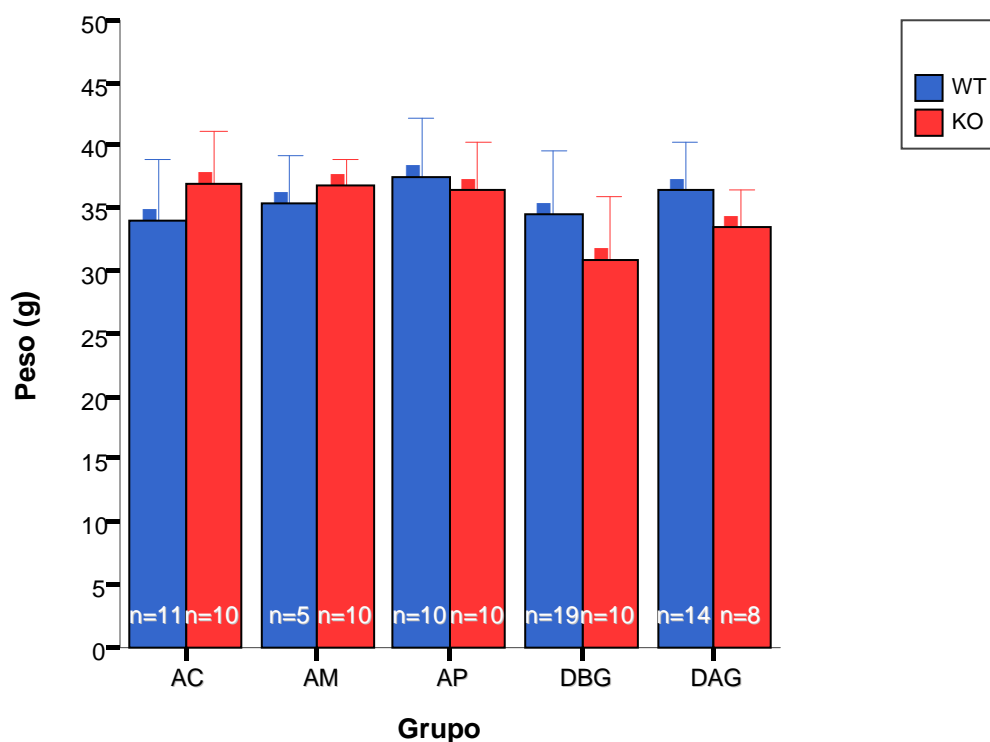


Figura 10: Peso al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

Peso en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio \pm DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

2.3 Ingesta alimenticia diaria promedio durante el período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

Cantidad: gramos/día (g/día)

La figura 11A muestra la ingesta alimenticia de los animales medida en g/día promedio por ratón durante la etapa de la suplementación con aceites. En ella se observa que el grupo tratado con DBG presentó una ingesta mayor que el grupo tratado con DAG, siendo esto válido tanto para ratones WT como para los KO. (WT: 2,7 +/- 0,1g y 2,0 +/- 0,3g; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y (KO: 2,4 +/- 0,2g y 1,8 +/- 0,1g; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,001$). Entre los grupos suplementados con distintos tipos de aceites (AC-AM-AP), no se observó diferencias ni en ratones WT ni en KO. En el grupo tratado con DBG, la ingesta promedio en g/día en ratones KO fue menor que en ratones WT (2,7 +/- 0,1g y 2,4 +/- 0,2g; WT y KO respectivamente; $p = 0,001$).

Calorías: Kcal/día:

La figura 11B muestra que la ingesta calórica de los animales medida en Kcal/día promedio por ratón durante la etapa de la suplementación con aceites, fue similar en todos los grupos, ya sea entre los grupos tratado con DBG y DAG o entre los grupos suplementados con distintos aceites. Al comparar los distintos genotipos dentro de cada grupo de dieta, solo se observó una diferencia significativa en el grupo tratado con DBG entre ratones WT y KO, siendo la ingesta en los KO menor que en los WT. (10,4 +/- 0,7 y 9,3 +/- 0,8Kcal; WT y KO respectivamente; $p = 0,001$).

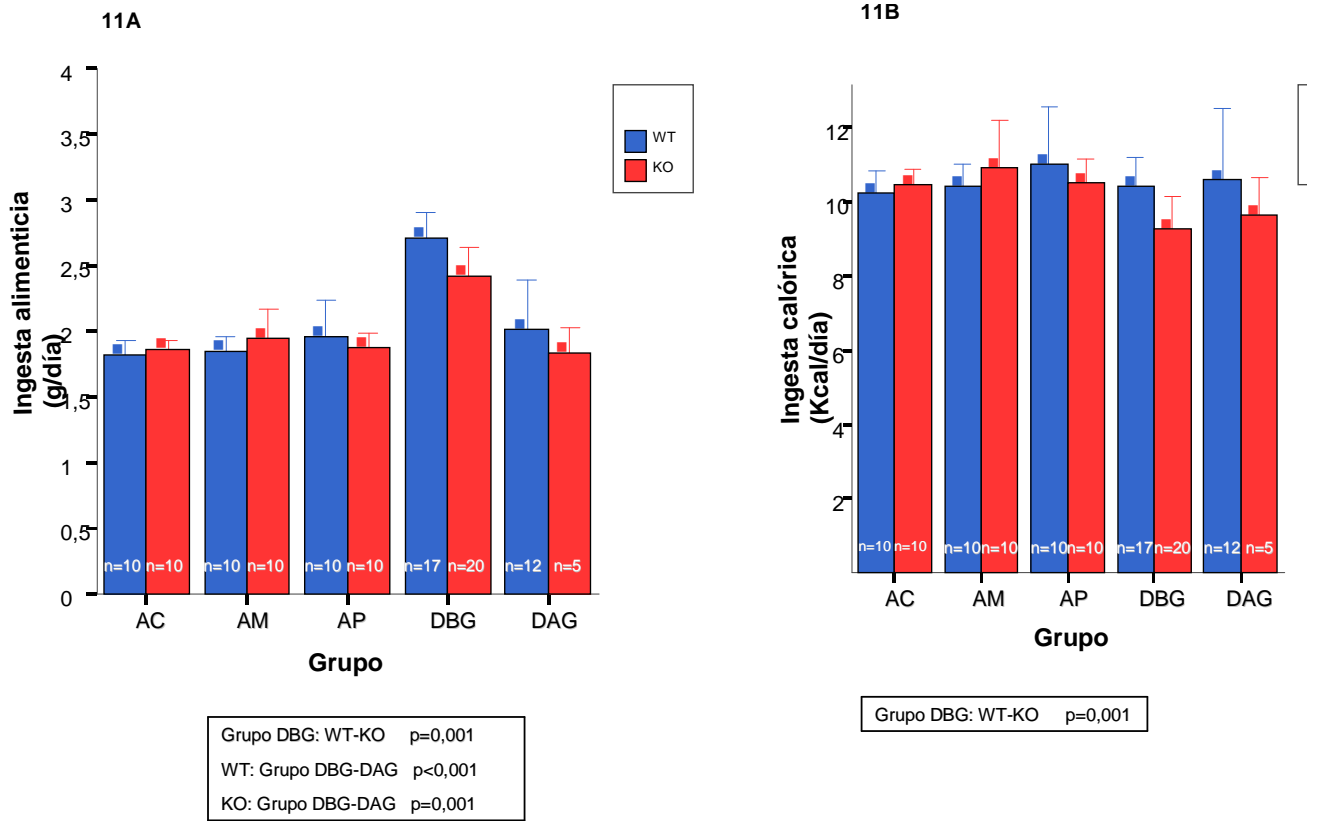


Figura 11: Ingesta alimenticia y calórica diaria promedio durante el período de suplementación con aceites en condiciones de 66% grasa. Ingesta diaria promedio en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) durante la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. **11A:** ingesta alimenticia (g/día) y **11B:** Ingesta calórica (Kcal/día). Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en los cuadros adjuntos a los gráficos.

2.4 Tamaño del hígado al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

En la Figura 12 se muestra el tamaño del hígado expresado como porcentaje del peso total al final del período de suplementación con distintos tipos de aceites. En ella se observa que el tratamiento con DAG no modificó el tamaño del hígado con respecto a la DBG en ratones WT ni en KO. Entre las dietas suplementadas con aceites no hubo diferencias en ratones WT ni en los KO. Al comparar entre genotipos dentro de cada grupo de dieta, en el grupo con DBG se observa que los KO tienen un tamaño hepático mayor siendo esta diferencia significativa con respecto a los WT (2,9 +/- 0,2 y 3,1 +/- 0,2; WT y KO respectivamente; $p=0,012$).

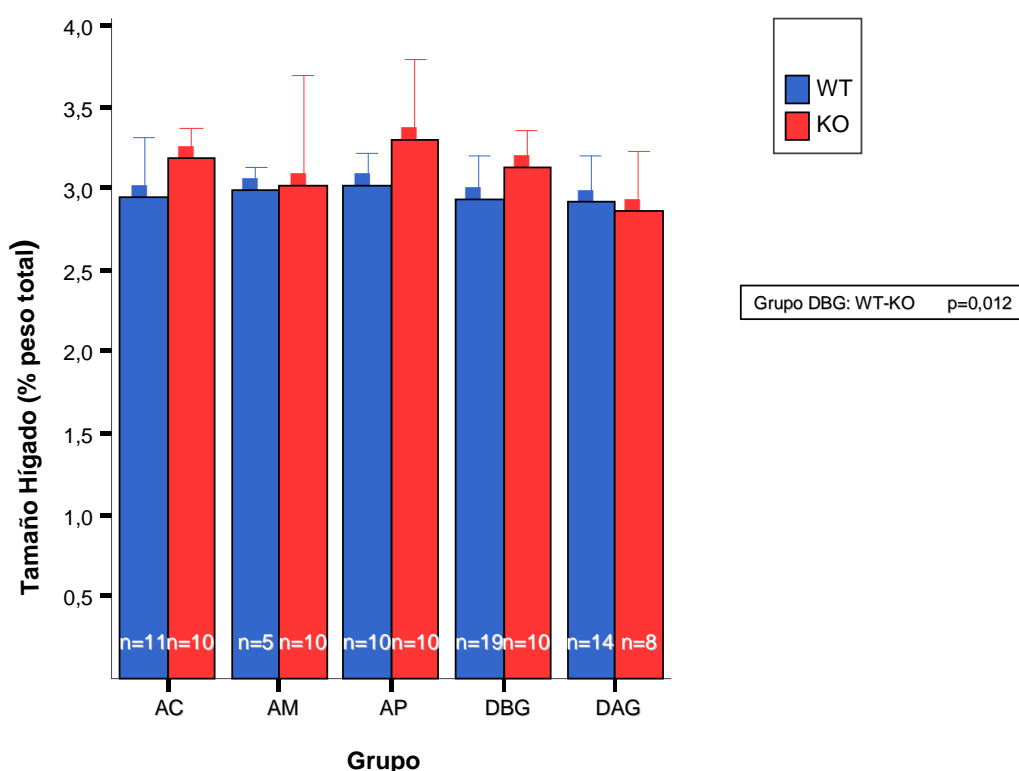


Figura 12: Tamaño del hígado al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa. Tamaño del hígado en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como porcentaje del peso total promedio +/- DS en un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.5 Masa de la grasa epididimal al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% de grasa

En la figura 13 se muestra la masa de la grasa expresado como porcentaje del peso total al final del período de intervención dietaria con distintos aceites en condiciones de dieta con un 66% de grasa. En ella se observa que el grupo tratado con DAG aumentó su porcentaje de grasa total con respecto al grupo tratado con DBG, siendo esto válido tanto para ratones WT como para los KO. (WT: 4,8 +/- 0,5% y 6,2 +/- 0,9%; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$ y KO: 4,1 +/- 1% y 5,4 +/- 0,6%; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,001$). Entre los grupos suplementados con aceites no se observan diferencias significativas en ningún genotipo. Al realizarse la comparación entre ratones WT y KO dentro de cada grupo de dieta, se observó en los grupos tratados con AM, con DBG y con DAG mayor % de grasa en los ratones WT que en los KO. (AM: 6,8 +/- 0,6% y 5,9 +/- 0,3%; WT y KO respectivamente; $p = 0,014$, DBG: 4,8 +/- 0,5% y 4,1 +/- 1%; WT y KO respectivamente; $p = 0,005$ y DAG: 6,22 +/- 0,9% y 5,4 +/- 0,6%; WT y KO respectivamente; $p = 0,048$).

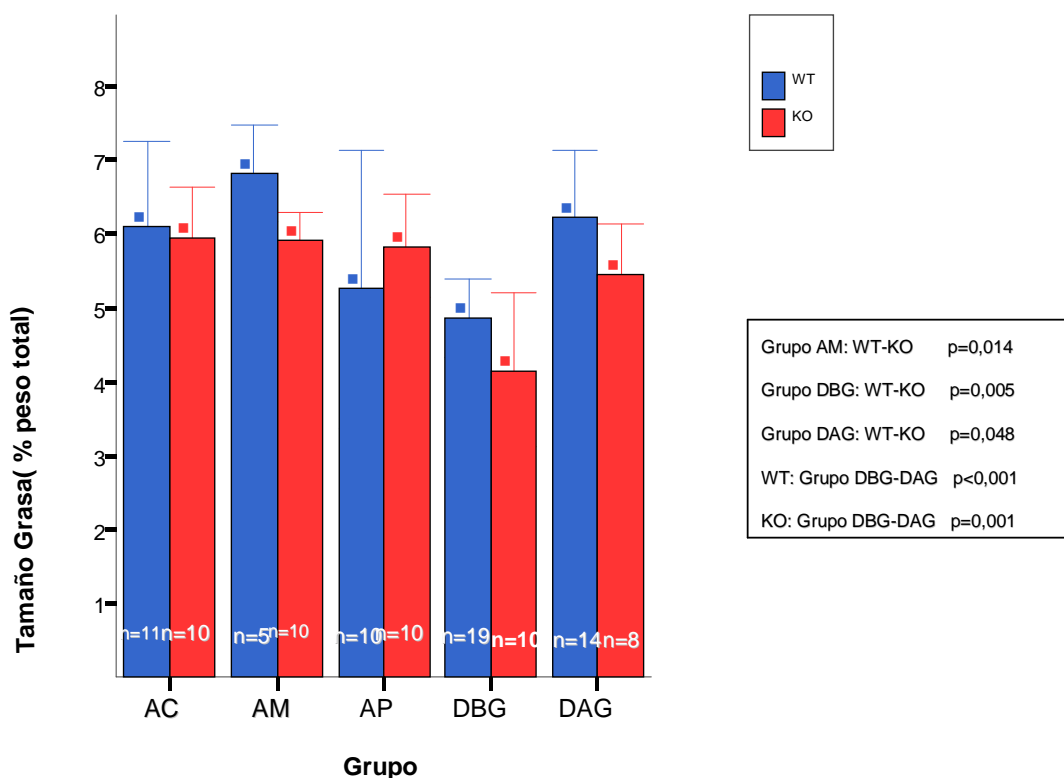


Figura 13: Masa de la grasa epididimal al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% de grasa. Masa de la grasa en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% de grasa. Los resultados se expresan como porcentaje del peso total promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

Parámetros bioquímicos plasmáticos

2.6 Triglicéridos plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

La figura 14 muestra los niveles de TG plasmáticos medidos al final del período de intervención dietaria con distintos tipos de aceites en condiciones de dieta con un 66% de grasa. En ella se observa que al ser tratados con DAG, ambos genotipos disminuyeron sus niveles de TG en plasma con respecto al grupo tratado con DBG, siendo esto significativo solo para los ratones KO ($1,0 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; DBG y DAG respectivamente; $p=0,007$). En respuesta a la suplementación con aceites de distinta composición de AG, no hubo diferencias significativas en los niveles de TG en plasma entre los 3 grupos suplementados con aceites ni en ratones WT ni en KO y tampoco diferencias entre genotipos dentro de ningún grupo.

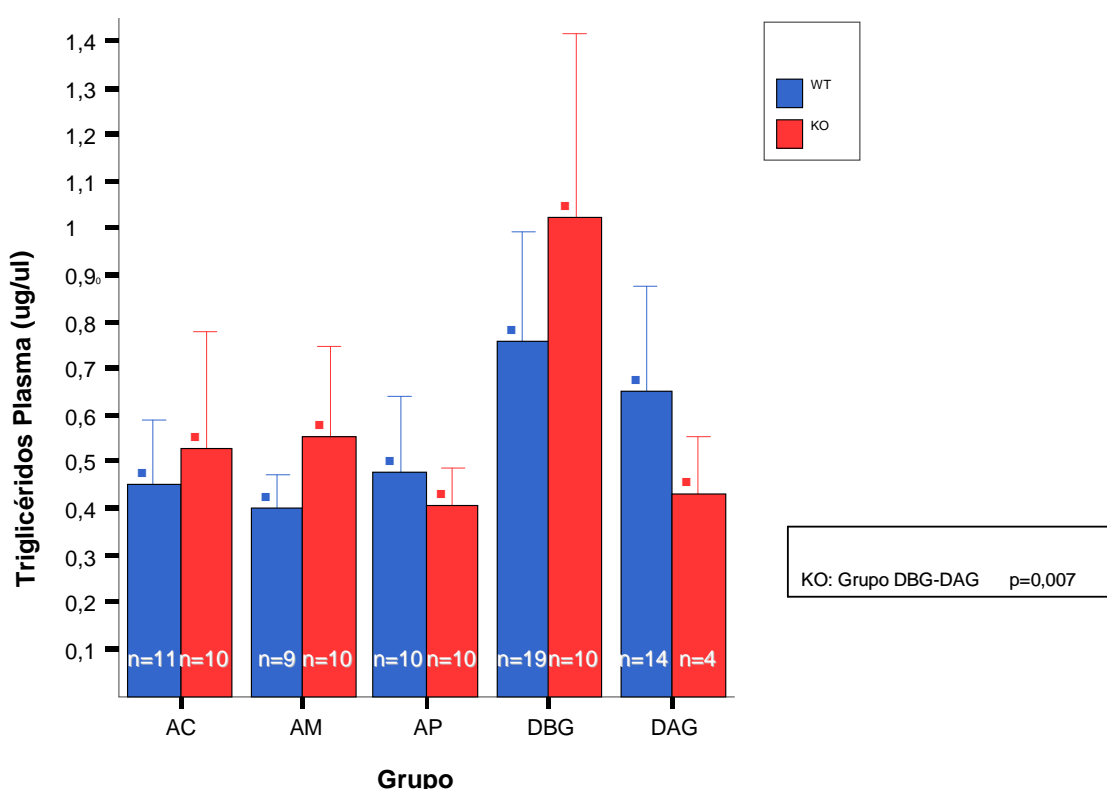


Figura 14: Triglicéridos plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa. Triglicéridos plasmáticos en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio \pm DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.7 Colesterol plasmático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

En la figura 15 se observan los niveles de colesterol plasmático obtenidos al final del tratamiento con suplementación de distintos aceites en condiciones de dieta muy rica en grasa. Se observa que ambos genotipos de ratones mostraron un alza en un 22% en sus niveles de colesterol al ser tratados con DAG en comparación con DBG, siendo esta alza significativa para los ratones WT ($1,5 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; DBG y DAG respectivamente; $p=0,002$), mientras que en los KO solo se observó una tendencia al alza, aunque no se alcanzó la significancia estadística ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$; DBG y DAG respectivamente; $p=0,062$). Entre los grupos suplementados con aceites no se observaron diferencias significativas para ningún genotipo. En las comparaciones entre genotipos dentro de cada grupo de dieta sí hubo diferencias entre WT y KO: en los grupos tratados con AC y AM los ratones KO presentaron mayores niveles de colesterol con respecto a sus correspondientes WT (AC: $1,4 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$; WT y KO respectivamente; $p=0,014$), (AM: $1,3 \pm 0,2$ y $1,6 \pm 0,2$; WT y KO respectivamente; $p=0,022$), y en los grupos tratados con DBG y DAG en cambio, los niveles de colesterol fueron menores en los ratones KO (DBG: $1,5 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; $p=0,015$) y (DAG: $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$; WT y KO respectivamente; $p=0,008$).

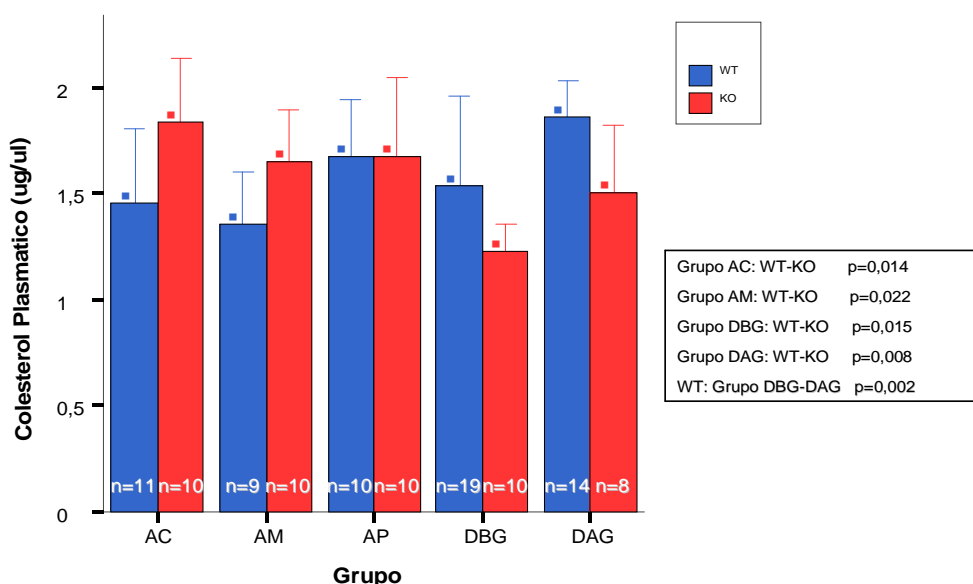


Figura 15: Colesterol plasmático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Colesterol plasmático en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio \pm DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.8 Ácidos grasos libres plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

Tal como se muestra en la figura 16, los niveles de AGL plasmáticos disminuyeron en respuesta a la DAG con respecto a la DBG en ambos genotipos, 32% en WT y 63% en KO (WT: 0,4 +/- 0,1ug/ul y 0,2 +/- 0,06ug/ul; DBG y DAG respectivamente; $p=0,007$ y KO: 0,9 +/- 0,3 y 0,3 +/- 0,1ug/ul; DBG y DAG respectivamente; $p=0,002$). Los niveles de AGL fueron más elevados en los ratones KO que en los WT en todos los grupos, siendo esta diferencia significativa para los grupos tratados con AM (0,4 +/- 0,1ug/ul y 0,9 +/- 0,3ug/ul; WT y KO respectivamente; $p=0,005$), AP (0,4 +/- 0,7ug/ul y 0,6 +/- 0,2ug/ul; WT y KO respectivamente; $p=0,027$) y DBG (0,4 +/- 0,1 y 0,9 +/- 0,3ug/ul; WT y KO respectivamente; $p=0,003$). Entre los grupos suplementados con aceites no se observaron diferencias significativas en ratones WT ni en los KO.

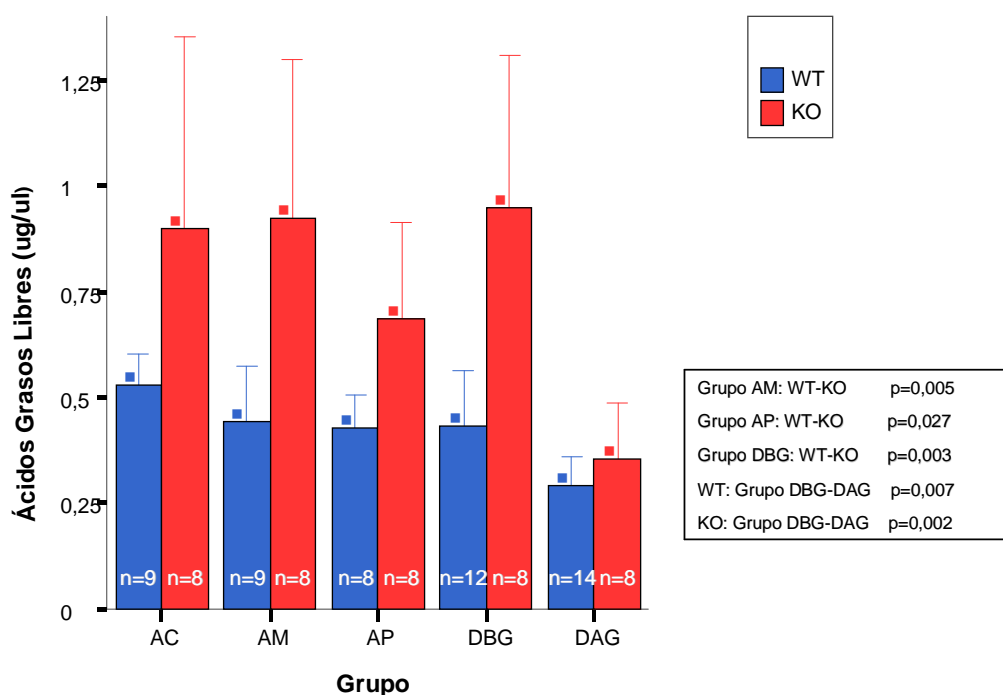


Figura 16: Ácidos grasos libres plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Ácidos grasos libres en plasma en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.9 Glucosa plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

Al realizarse la medición de glucosa plasmática al final del período de tratamiento con 66% de grasa, tal como se muestra en la figura 17, no se observaron diferencias entre los niveles de glucosa del grupo sometido a DBG con el grupo sometido a DAG. Entre los ratones suplementados con aceites, los WT del grupo con AP presentaron niveles aparentemente más elevados que los otros grupos suplementados con AC y AM, siendo esta diferencia significativa solo con el grupo de AM (120 +/- 9mg/dL y 109 +/- 9mg/dL; AP y AM respectivamente; $p=0,015$). Al comparar las diferencias entre ratones WT y KO dentro de cada grupo de dieta, observamos que en los grupos tratados con AC y AM la glucosa plasmática fue más elevada en los ratones KO (AC: 112 +/- 9ug/uL y 128 +/- 18ug/uL; WT y KO respectivamente; $p=0,021$) y (AM: 109 +/- 9ug/uL y 119 +/- 10Ug/uL; WT y KO respectivamente; $p=0,038$).

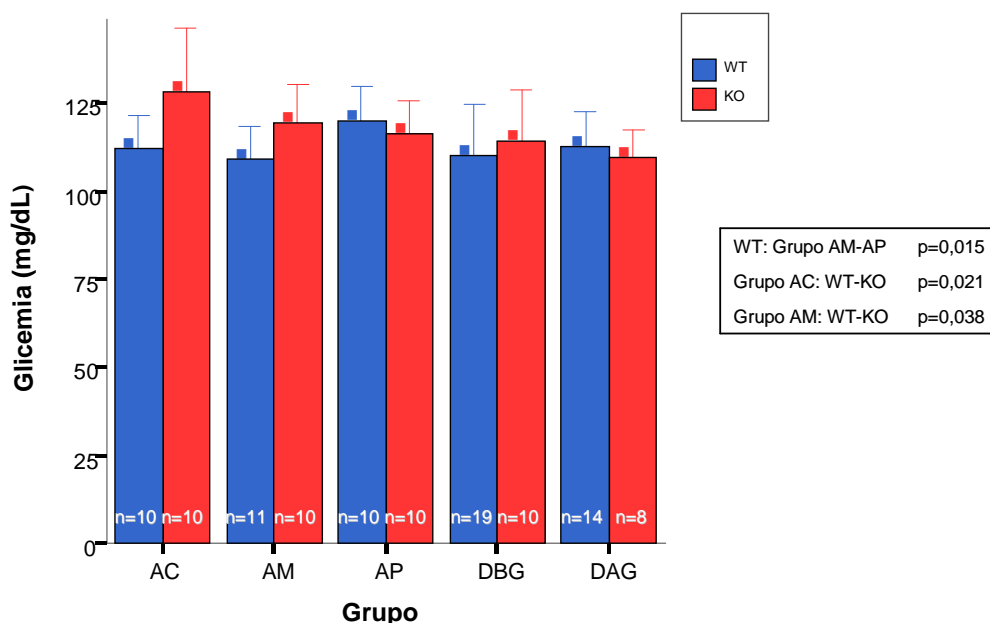


Figura 17: Glucosa plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Glucosa plasmática en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.10 Insulina plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

La figura 18 muestra los niveles plasmáticos de insulina medidos al final del período de suplementación con aceites en condiciones de dieta muy alta en grasas. Al comparar la DBG con la DAG, vemos que en los KO, disminuyó la insulina plasmática con la DAG (1,0 +/- 0,8ug/ml y 0,6 +/- 0,1ug/ml; DBG y DAG respectivamente; $p=0,043$). En los WT no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos suplementados con distintos aceites ni en ratones WT ni en KO. Al comparar ambos genotipos dentro de cada grupo de dieta, se observó que en el grupo tratado con AP la insulina plasmática fue menor en los KO que en los WT (1,1 +/- 0,2ug/ml y 0,8 +/- 0,2ug/ml; WT y KO respectivamente; $p=0,05$), al igual que en el grupo tratado con DAG (1,3 +/- 0,7ug/ml y 0,6 +/- 0,1ug/ml; WT y KO respectivamente; $p=0,014$).

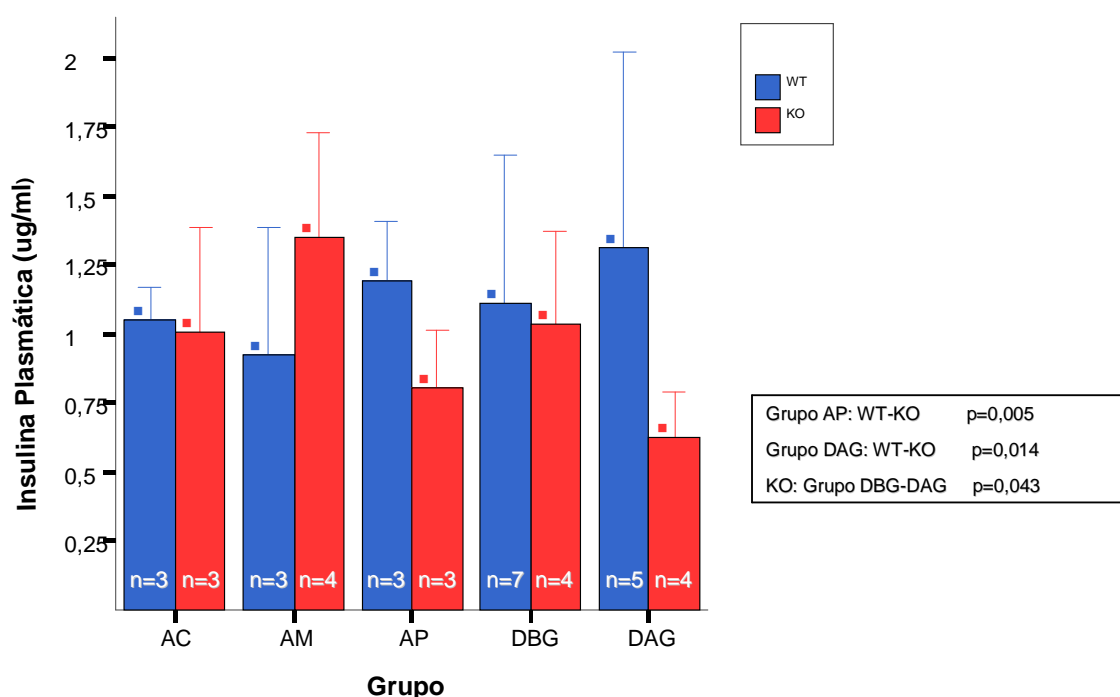


Figura 18: Insulina plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Insulina plasmática en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.11 Test de tolerancia a la glucosa al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

La figura 19 muestra el test de tolerancia a la glucosa realizado al final del período de suplementación con aceites, con un 66% de grasa. Se observa que en ambos genotipos, el grupo tratado con DAG, es más intolerante a la glucosa que el grupo tratado con DBG. (WT: 21398 +/- 2885 y 31125 +/- 6227; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$ y KO: 21851 +/- 3532 y 28769 +/- 3481; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$). Esto se observa tanto en los gráficos de las curvas de glucosa a distintos tiempos (Fig. 19A y 19B) como en el gráfico que compara las áreas bajo la curva (ABC) de cada uno de los grupos (Fig.19C). Al comparar los grupos suplementados con aceites de distinta composición de AG, no hubo diferencias entre ellos en ratones WT ni en KO en el ABC. Tampoco hubo diferencias significativas al comparar ambos genotipos dentro de cada grupo de dieta.

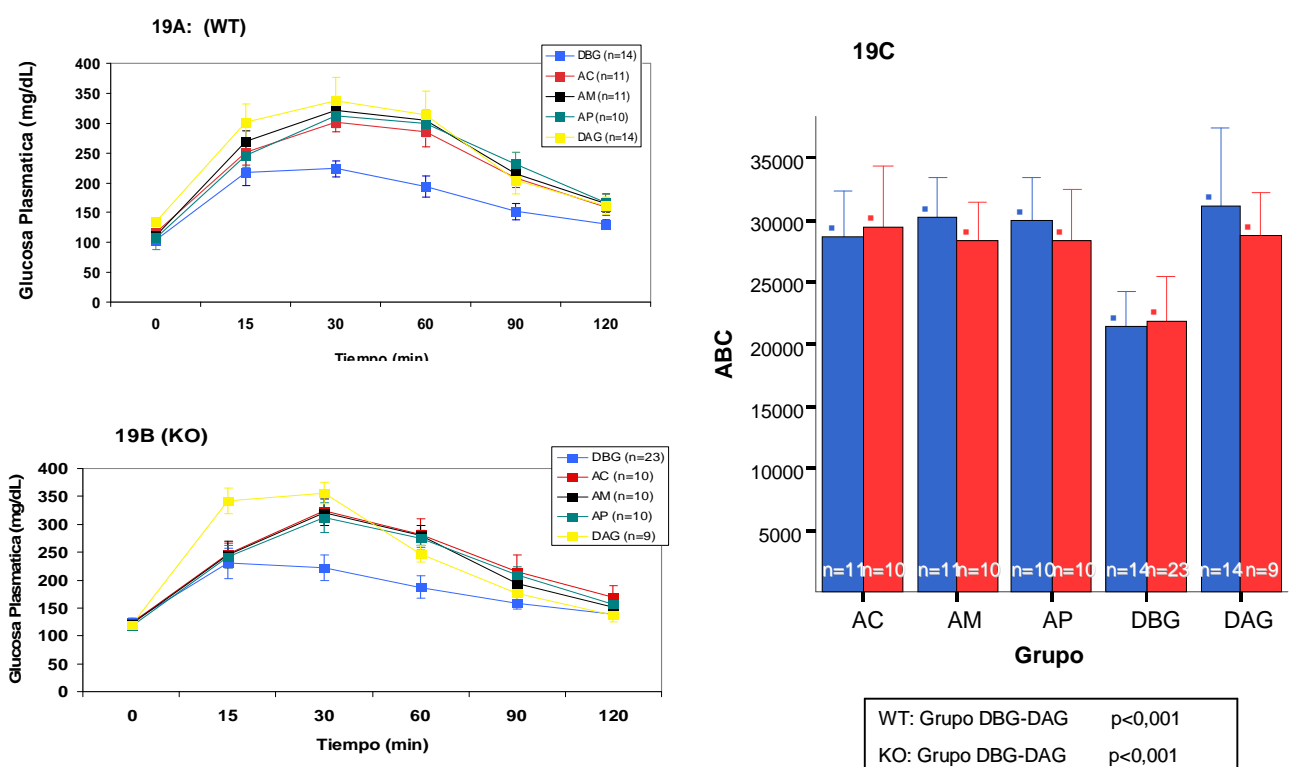


Figura 19: TTG al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Curvas de tolerancia a la glucosa de los animales WT (19A) y 4a14KO (19B) al final del período de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. 19C: Área bajo la curva (ABC) de los animales WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja). Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

Parámetros bioquímicos hepáticos:

2.12 Triglicéridos hepáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

Como se observa en la Figura 20, los TG hepáticos aumentaron en forma considerable al someter a los ratones a dieta rica en grasa, en comparación con la DBG, en ambos genotipos. (WT: 42 +/- 19ug/mg y 169 +/- 44ug/mg; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y (KO: 21 +/- 13,8ug/mg y 128 +/- 51ug/mg; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,003$). Entre ratones de un mismo genotipo tratados con las dietas suplementadas con aceites, no se observaron diferencias significativas en ningún genotipo. Al comparar ratones WT y KO dentro de cada grupo, se observó que en el grupo tratado con AP los ratones WT presentaron un promedio de TG menor que los KO, (86 +/- 16ug/mg y 141 +/- 33ug/mg; WT y KO respectivamente; $p = 0,009$). En el grupo tratado con DBG, los KO presentaron TG en hígado más bajos. (42 +/- 19ug/mg y 21 +/- 13ug/mg; WT y KO respectivamente; $p = 0,042$).

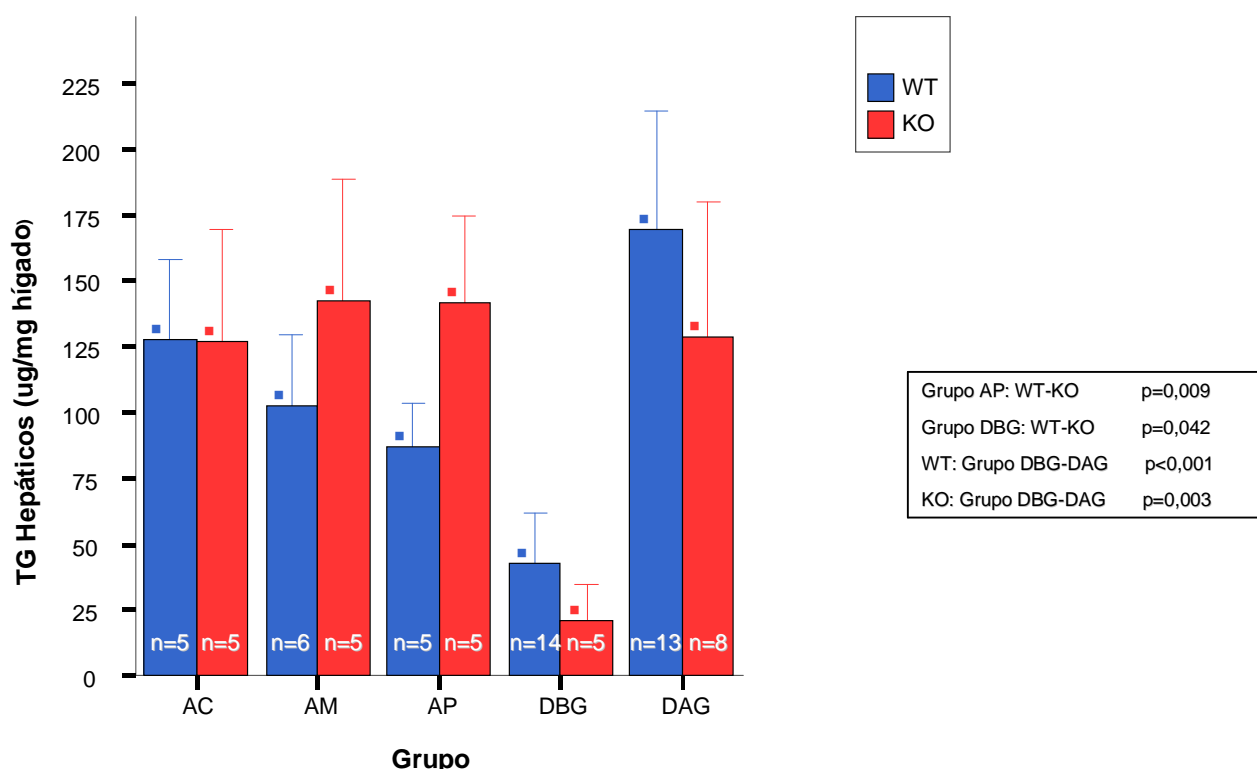


Figura 20: Triglicéridos hepáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

2.13 Colesterol hepático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa

La figura 21 muestra que los niveles de colesterol hepático aumentaron en el grupo tratado con DAG con respecto a la DBG, siendo esto estadísticamente significativo para los ratones WT (5,9 +/- 1,7ug/mg y 12,2 +/- 5,7ug/mg; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y mostrando una tendencia al aumento en los KO (6,3 +/- 2,3ug/mg y 8,8 +/- 2,5ug/mg; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,057$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con aceites ni en ratones WT ni en KO. En las comparaciones entre ambos genotipos dentro de cada grupo de dieta, en el grupo tratado con AP los ratones KO presentaron niveles de colesterol hepático un 22% más elevado que los WT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (7,6 +/- 0,8ug/mg y 9,3 +/- 0,9ug/mg; WT y KO respectivamente; $p = 0,028$).

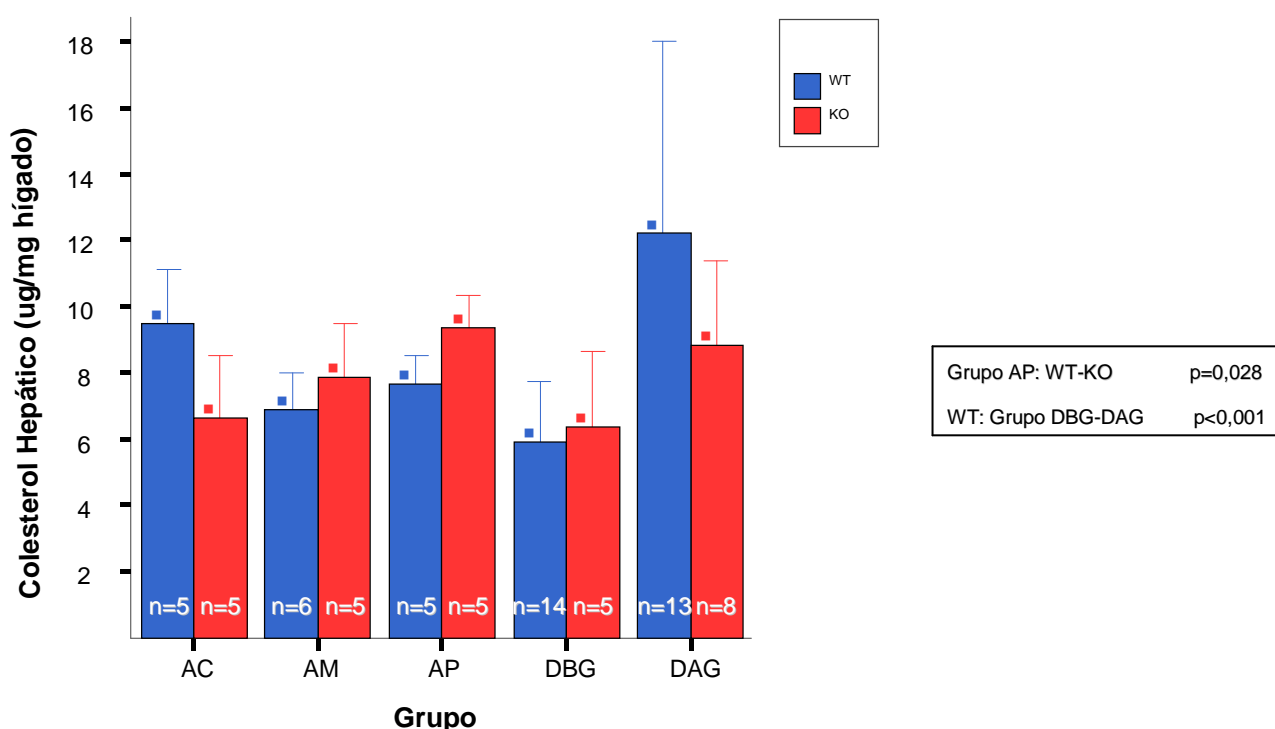


Figura 21: Colesterol hepático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 66% grasa.

Colesterol hepático en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 66% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.0 Suplementación con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de dieta alta en grasas (46% grasa, 38% carbohidratos, 16% proteínas)

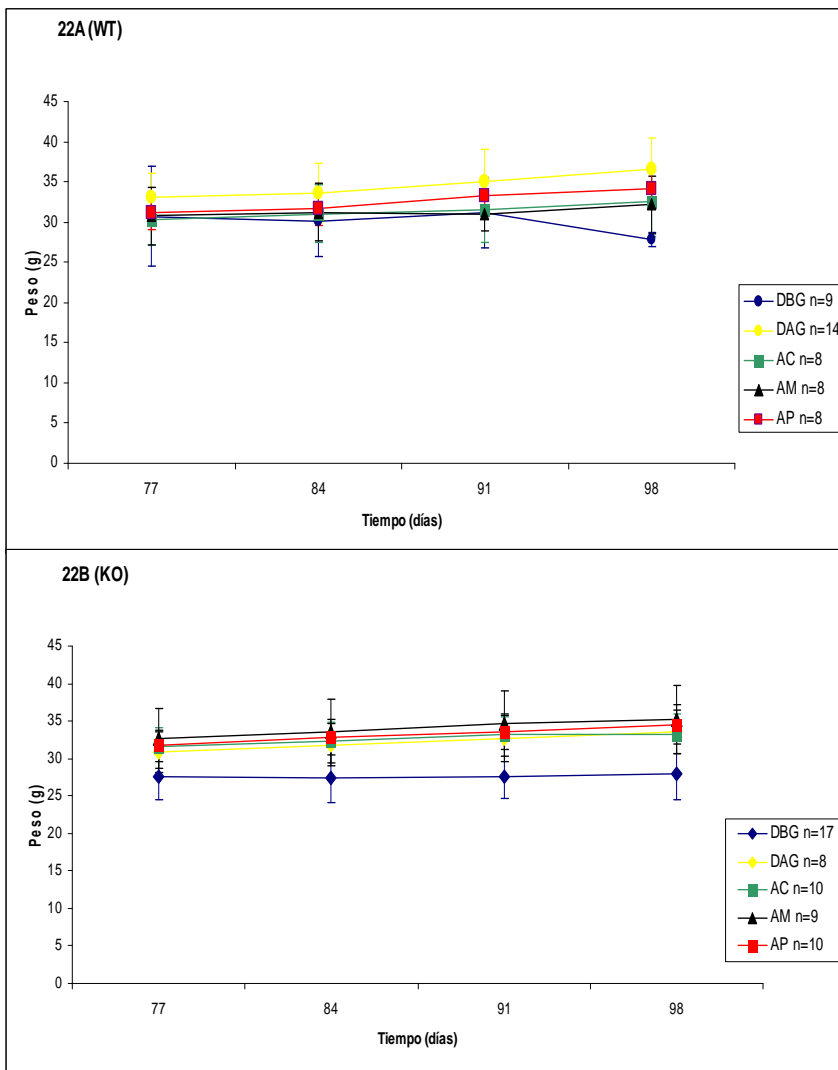
En los animales obesos e intolerantes a la glucosa descritos en la sección 1 de los resultados se evaluó el efecto de la suplementación de una dieta alta en grasas (34% grasa), con un 10% p/p de aceites de distinta composición de ácidos grasos. Esto resultó en una dieta con un total de 46% de grasa. (A diferencia de los resultados descritos en la sección 2, donde los experimentos con suplementación con aceites se realizaron bajo condiciones de 66% de grasa). Se evaluaron diversos parámetros morfométricos y metabólicos al final del período de intervención de un mes, los resultados obtenidos son los siguientes:

Nota: recordar que los grupos tratados con DBG (10% grasa) y DAG (60% grasa) corresponden a los mismos animales, por lo tanto los resultados son los mismos mostrados en la sección anterior.

3.1 Curvas de peso durante el período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

Tal como muestra la figura 22A, el peso inicial de todos los ratones WT fue similar entre todos los grupos. No se observó una diferencia en la curva de peso entre ratones tratados con DBG y tratados con DAG a lo largo del seguimiento durante esta etapa. En los ratones KO, tal como se comentó en la sección 2.1, el grupo tratado con DBG inició esta etapa con un peso por debajo de todos los demás grupos que habían sido previamente tratados con DAG ($p < 0,001$), y se mantuvo con una curva de peso por debajo del grupo tratado con DAG a lo largo de todo el seguimiento ($p < 0,001$). No hubo diferencias en las curvas de peso de los grupos tratados con aceites ni en ratones WT ni en KO. Diferencias entre genotipos se observaron en el grupo tratado con AM, en que los KO mantuvieron una curva de peso por sobre los WT ($p = 0,014$) y en los grupos con DBG y DAG en que los KO mantuvieron una curva de peso por debajo de los WT ($p = 0,002$ y $p = 0,047$ respectivamente).

Nota: los valores p mostrados en los resultados de las curvas de peso corresponden a diferencias de las curvas en su conjunto. Además, se determinó si existieron diferencias en el peso inicial de los ratones (primer punto de la curva de peso).



Grupo AM: WT-KO	p=0,014
Grupo DBG: WT-KO	p=0,002
Grupo DAG: WT-KO	p=0,047

Figura 22: Curvas de peso durante periodo de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Ratones WT (22A) y 4a14KO (22B) durante la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales descrito en la leyenda de cada gráfico. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto a los gráficos.

3.2 Peso promedio al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

La figura 23 muestra que entre el grupo tratado con DBG y el grupo tratado con DAG, no hubo diferencias significativas al final del tratamiento para ninguno de los genotipos. Tampoco hubo diferencias significativas de peso entre grupos tratados con distintos tipos de aceites en ningún genotipo, ni entre genotipos dentro de algún grupo de dieta.

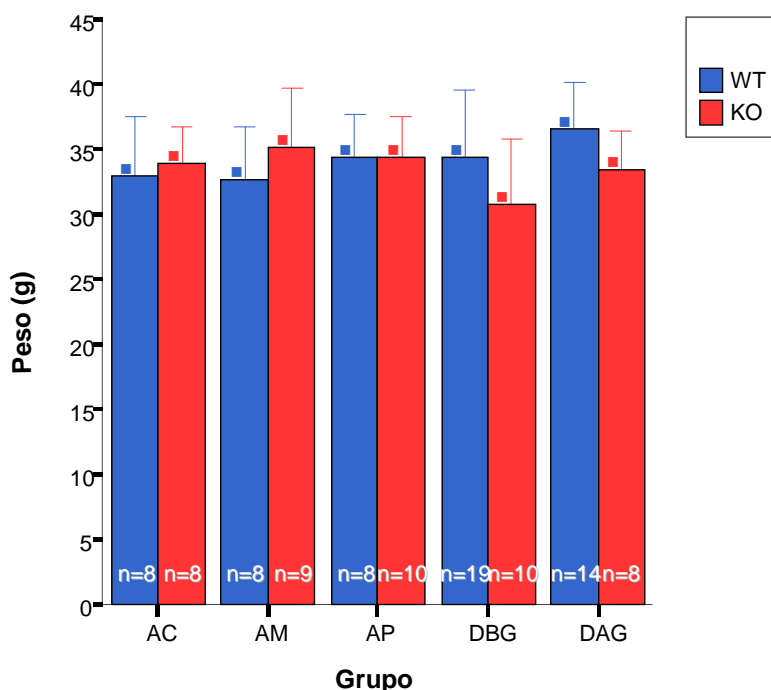


Figura 23: Peso promedio al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Peso en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

3.3 Ingesta alimenticia diaria promedio durante el período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

Cantidad: gramos/día (g/día)

Los resultados expresados en la figura 24A muestran que el grupo tratado con DBG presentó una ingesta mayor que los demás grupos, tanto en ratones WT como en KO. (WT: 2,7 +/- 0,1g y 2,0 +/- 0,3g; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y (KO: 2,4 +/- 0,2g y 1,8 +/- 0,1g; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,001$). Entre los grupos suplementados con distintos aceites no hubo diferencias en la ingesta alimenticia expresada en gramos/día promedio por animal. Al comparar dentro de cada grupo de dieta ambos genotipos, solo en el grupo tratado con DBG hubo diferencias significativas entre ratones WT y KO, siendo menor la ingesta en los KO (2,6 +/- 0,1g y 2,3 +/- 0,1g; WT y KO respectivamente; $p = 0,012$).

Calorías: Kcal/día:

En la figura 24B se observa que la ingesta calórica fue similar entre los grupos tratados con DBG y DAG para ambos genotipos. Entre los grupos suplementados con aceites no hubo diferencias en la ingesta en Kcal/día promedio por ratón para ningún genotipo. Al comparar ratones WT con KO dentro de cada grupo de dieta, observamos que para los 3 grupos tratados con aceites, la ingesta calórica fue mayor en los ratones KO que en los WT. (AC: 10 +/- 1,3kcal y 12 +/- 0,5kcal; WT y KO respectivamente; $p = 0,001$), (AM: 9,4 +/- 2,5kcal y 12,6 +/- 1,2kcal; WT y KO respectivamente; $p = 0,002$) y (AP: 10 +/- 1,3kcal y 11,8 +/- 0,5kcal; WT y KO respectivamente; $p = 0,001$). En los grupos tratados con DBG y DAG la ingesta calórica fue menor en los KO, siendo significativa la diferencia solo en el grupo con DBG (10 +/- 0,7kcal y 9 +/- 0,7kcal; WT y KO respectivamente; $p = 0,012$).

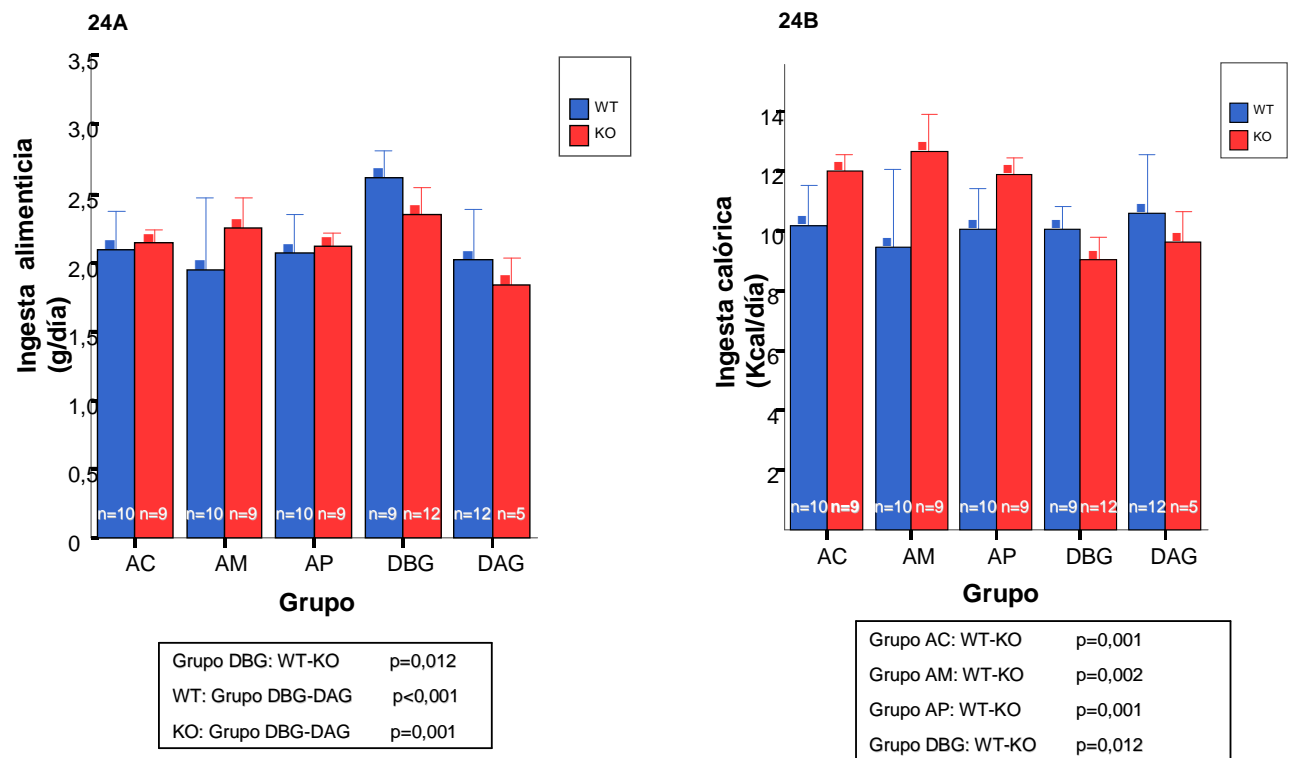


Figura 24: Ingesta alimenticia y calórica diaria promedio durante el período de suplementación con aceites en condiciones de 46% grasa. Ingesta diaria promedio en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) durante la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. **24A:** ingesta alimenticia (g/día) y **24B:** Ingesta calórica (Kcal/día). Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna y los valores de significancia estadística se muestran en los cuadros adjuntos a los gráficos.

3.4 Tamaño del hígado al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

En la figura 25 podemos observar que no hubo diferencias en el tamaño hepático entre la DBG y la DAG, para los animales WT ni KO. En los ratones KO el tamaño del hígado expresado como porcentaje del peso total de los animales fue menor en el grupo tratado con AM que en el grupo tratado con AC (3,3 +/- 0,3% y 2,8 +/- 0,1%; AC y AM respectivamente; $p=0,009$). En el grupo tratado con AP no se observan diferencias ni con los otros grupos suplementados con aceites ni entre WT y KO del mismo grupo. Solo en el grupo tratado con DBG hubo diferencias entre WT y KO, siendo de mayor peso estos últimos. (2,9 +/- 0,2 y 3,1 +/- 0,2; WT y KO respectivamente; $p=0,004$).

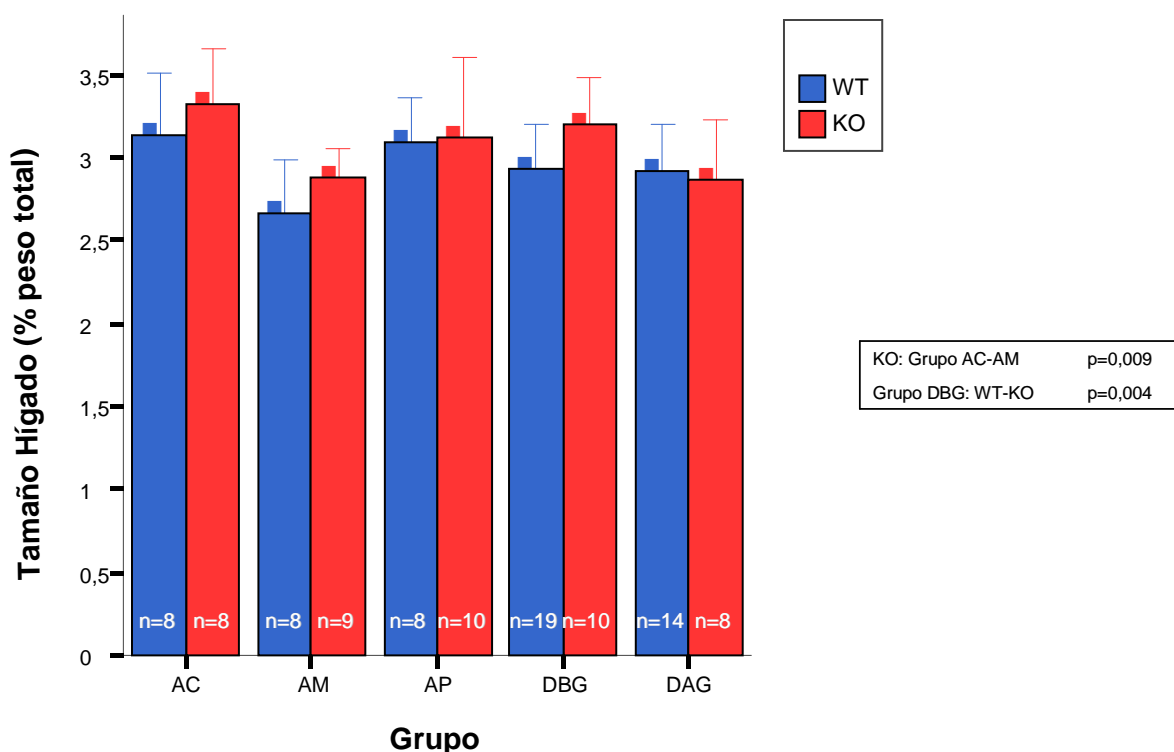


Figura 25: Tamaño del hígado al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa. Tamaño del hígado en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como porcentaje del peso total promedio +/- DS en un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.5 Masa de la grasa epididimal al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

En la figura 26 se muestra que el grupo tratado con DBG tienen un porcentaje menor de grasa corporal que los grupos tratados con dieta rica en grasa control o suplementada con aceites, siendo esto válido para ambos genotipos. (WT: 4,8 +/- 0,5% y 6,2 +/- 0,9%; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$ y KO: 4,1 +/- 1% y 5,4 +/- 0,6%; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,001$). Entre los grupos suplementados con aceites no se observan diferencias significativas en ratones WT ni en KO. En los grupos tratados con DBG y DAG, los ratones KO presentaron un menor porcentaje de grasa corporal que los ratones WT (DBG: 4,8 +/- 0,5% y 4 +/- 0,7%; WT y KO respectivamente; $p = 0,002$ y DAG: 6,2 +/- 0,9% y 5,4 +/- 0,6%; WT y KO respectivamente; $p = 0,048$)

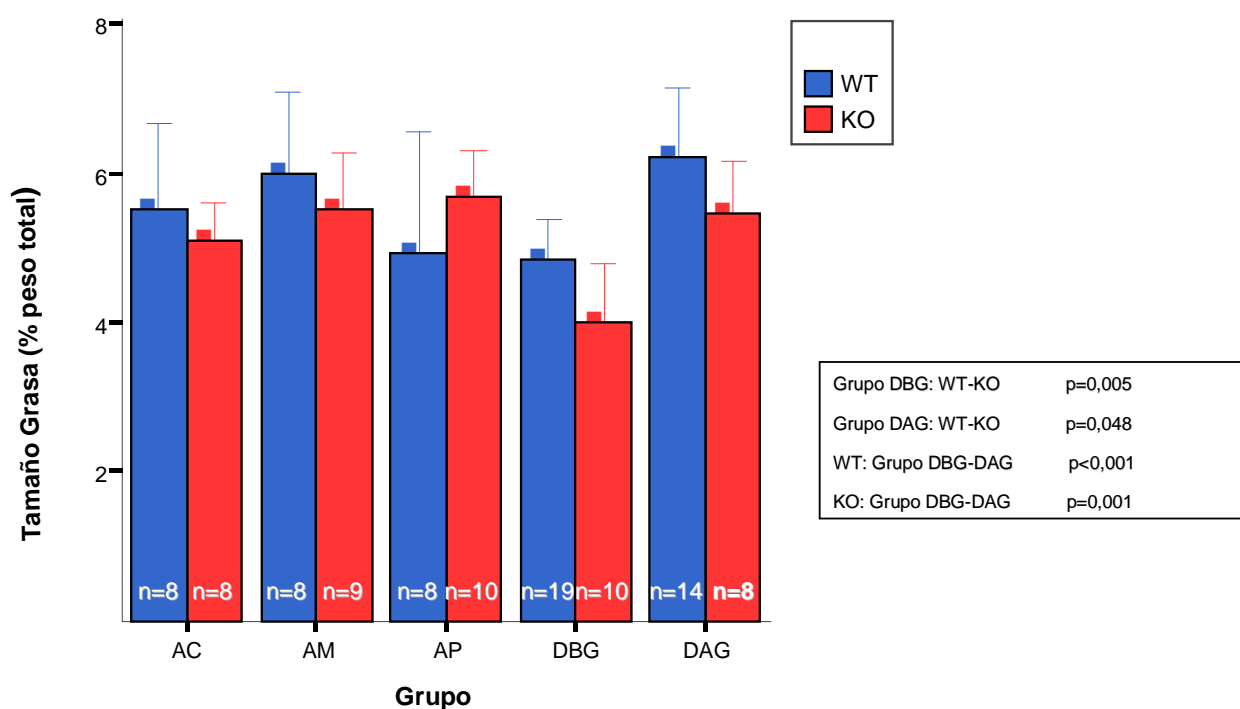


Figura 26: Masa de la grasa epididimal al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Tamaño de la grasa en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como porcentaje del peso total promedio +/- DS en un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

Parámetros Bioquímicos plasmáticos

3.6 Triglicéridos plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

La figura 27 muestra los niveles de TG plasmáticos medidos al final del período de intervención dietaria con distintos tipos de aceites en condiciones de dieta con un 46% de Kcal de grasa. En ella se observa que al ser tratados con DAG, ambos genotipos disminuyeron sus niveles de TG en plasma con respecto al grupo tratado con DBG, siendo esto significativo solo en los KO. ($1,0 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; DBG y DAG respectivamente; $p=0,007$). (Resultado descrito previamente en la sección 2.6). Al comparar los 3 grupos suplementados con aceites, se observó que el grupo tratado con AP presentó niveles más bajos que los otros 2 grupos, siendo esta diferencia significativa con el grupo tratado con AC tanto en ratones WT como en KO (WT: $0,8 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $0,47 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{ul}$; AC y AP respectivamente; $p=0,012$ y KO: $0,75 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $0,45 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; AC y AP respectivamente; $p=0,001$), y con el grupo con AM solamente entre los ratones KO ($0,69 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $0,45 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; AM y AP respectivamente; $p=0,009$). Al comparar dentro de cada grupo de dieta entre genotipos WT y KO, no se observaron diferencias significativas.

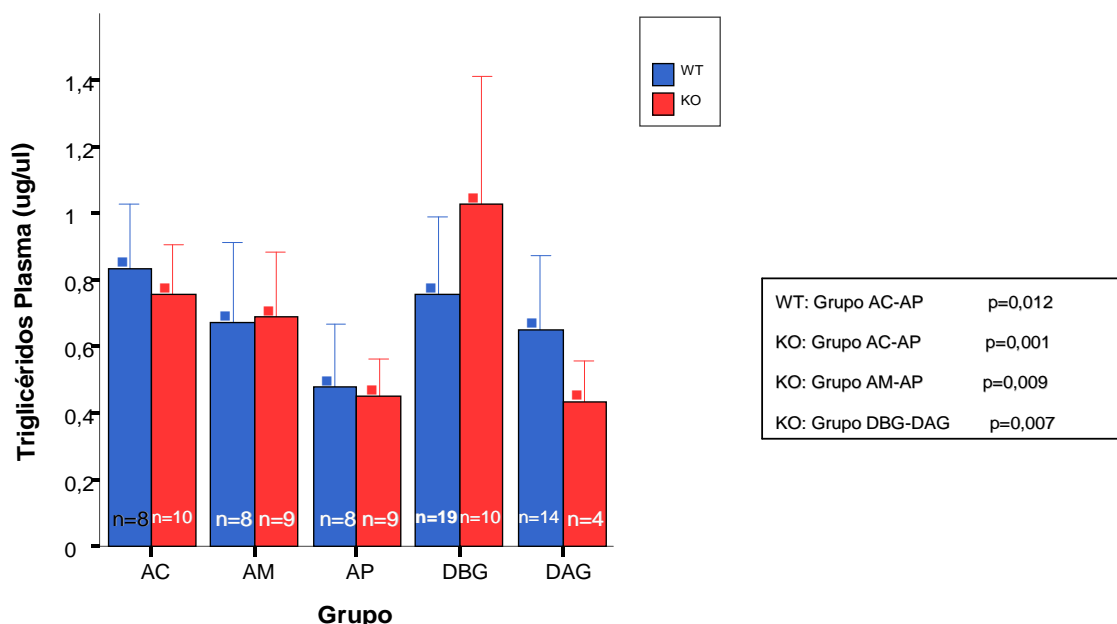


Figura 27: Triglicéridos plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

Triglicéridos plasmáticos en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio \pm DS de un número de animales descrito al pie de cada columna y los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.7 Colesterol plasmático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

En la figura 28 se muestran los niveles de colesterol plasmático obtenidos al final del tratamiento con suplementación de distintos aceites en condiciones de dieta rica en grasa. Se observa que ambos genotipos de ratones mostraron un alza en sus niveles de colesterol en un 22% al ser tratados con DAG en comparación con DBG. Tal como fue descrito en la sección 2.7, esta alza solo fue significativa para los ratones WT ($1,5 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; DBG y DAG respectivamente; $p=0,002$), y en los KO solo mostró una tendencia al alza, aunque no se alcanzó la significancia estadística ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$; DBG y DAG respectivamente; $p=0,062$). Entre los 3 grupos tratados con aceites no se observaron diferencias significativas en los ratones WT. En los ratones KO, sin embargo, el grupo tratado con AP presentó niveles de colesterol más bajos en comparación con el grupo con AC ($1,69 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; AC y AP respectivamente; $p=0,001$) y con el grupo con AM ($1,63 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,24 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{ul}$; AM y AP respectivamente; $p=0,004$). Al comparar entre WT y KO dentro de cada grupo de dieta, en los grupos suplementados con aceites no se observaron diferencias entre ratones WT y KO; sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre WT y KO para los controles DBG y DAG, donde los ratones KO presentaron niveles de colesterol plasmático más bajos que los WT. (DBG: $1,53 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,22 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{ul}$; WT y KO respectivamente; $p=0,015$ y DAG: $1,86 \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{ul}$ y $1,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{ul}$; WT y KO respectivamente; $p=0,008$).

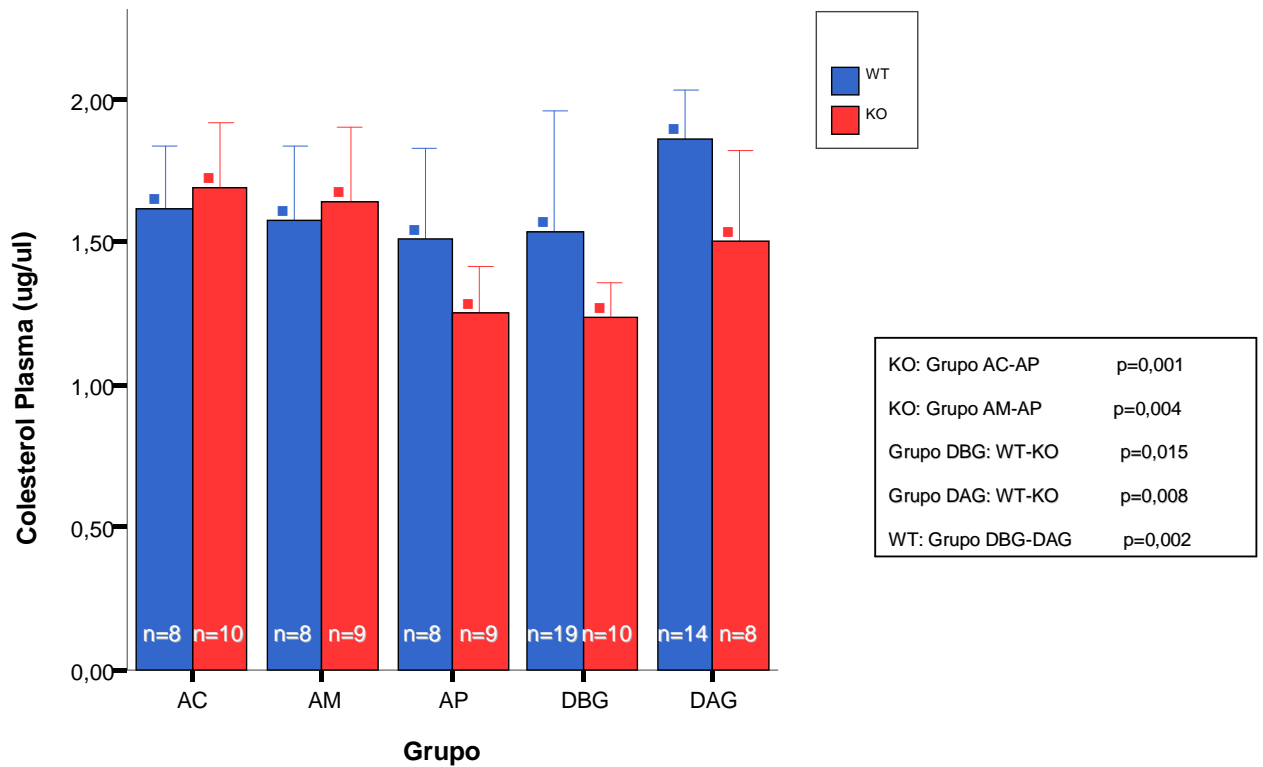


Figura 28: Colesterol plasmático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa. Colesterol plasmático en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna y los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.8 Ácidos grasos libres plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Tal como puede observarse en la figura 29, los niveles de AGL plasmáticos disminuyeron en respuesta a la DAG con respecto a la DBG en ambos genotipos, 32% en WT y 63% en KO (WT: 0,4 +/- 0,1ug/ul y 0,2 +/- 0,06ug/ul; DBG y DAG respectivamente; $p=0,007$ y KO: 0,9 +/- 0,3 y 0,3 +/- 0,1ug/ul; DBG y DAG respectivamente; $p=0,002$). No hubo diferencias entre los grupos suplementados con aceites en ninguno de los genotipos. Al comparar ambos WT v/s KO dentro de cada grupo de dieta, diferencias significativas solo se observaron en el grupo tratado con DBG donde los KO presentaron niveles más elevados de AGL (0,49 +/- 0,1ug/ul y 0,83 +/- 0,4ug/ul; DBG y DAG respectivamente; $p=0,003$).

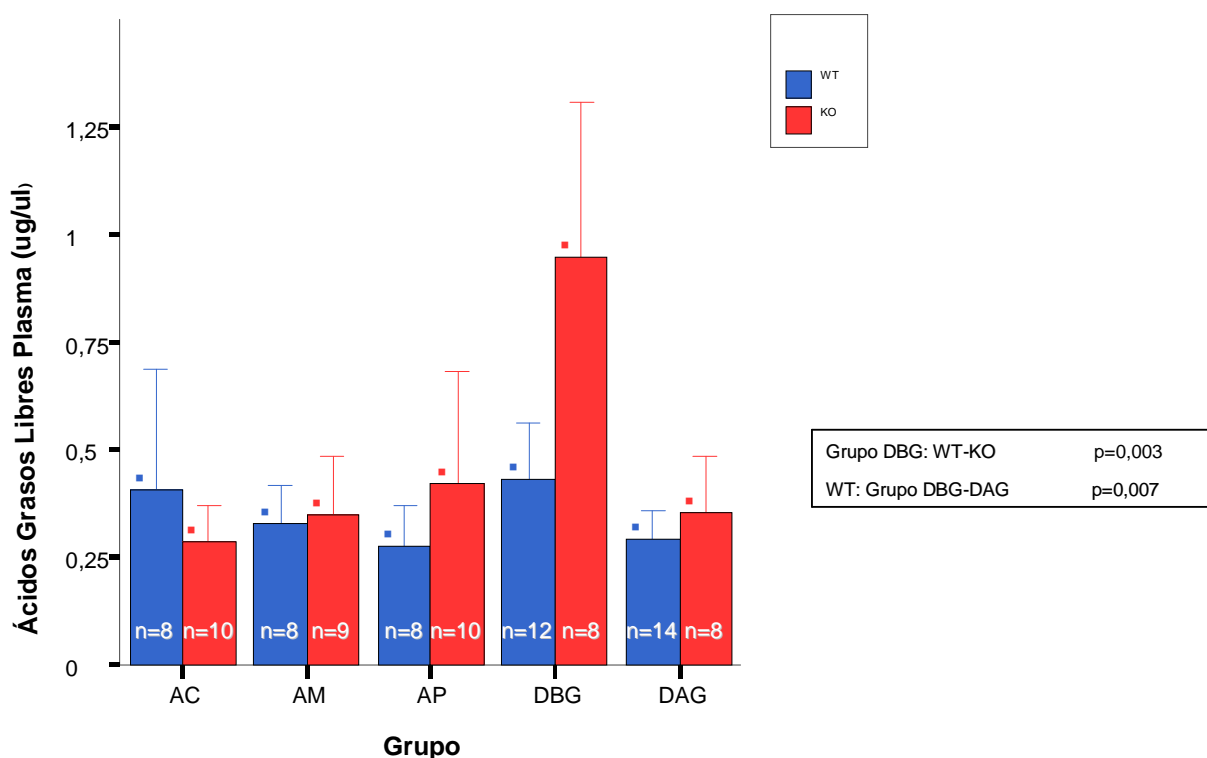


Figura 29 : Ácidos grasos libres plasmáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Ácidos grasos libres en plasma en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna y los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.9 Glucosa plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

Al realizarse la medición de glucosa plasmática al final del período de tratamiento con 46% de grasa, tal como se muestra en la figura 30, no se observaron diferencias entre los niveles de glucosa del grupo sometido a DBG con el grupo sometido a DAG (Resultado descrito en sección 2.9). Los niveles de glucosa plasmática al final del tratamiento fueron similares en todos los grupos, independientemente del tratamiento que siguieron.

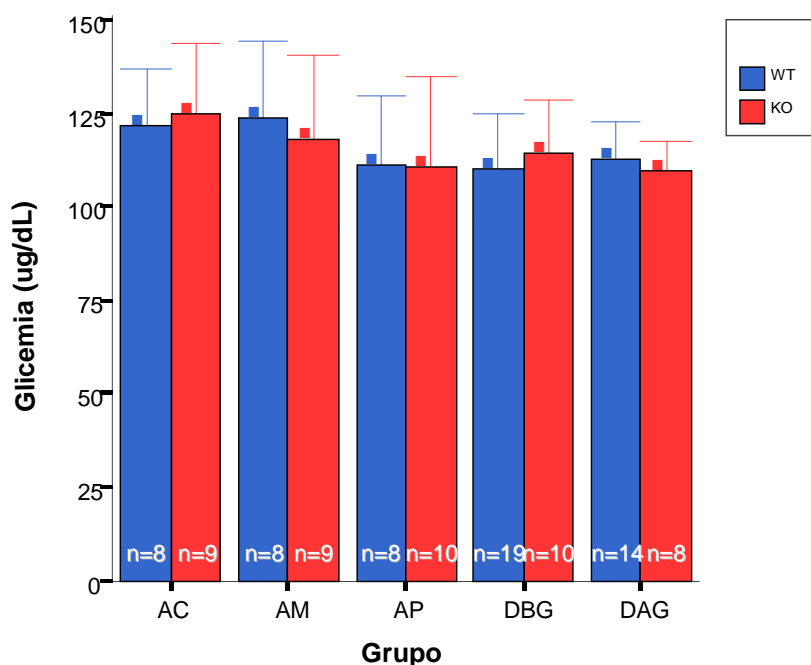


Figura 30: Glucosa plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Glucosa plasmática en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio \pm DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

3.10 Insulina plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

La figura 31 muestra los niveles de insulina plasmáticos medidos al final del período de suplementación dietaria con aceites en condiciones de dieta alta en grasas. Al comparar la DBG con la DAG, vemos que en los KO, disminuyó la insulina plasmática con la DAG (1,0 +/- 0,8ug/ml y 0,6 +/- 0,1ug/ml; DBG y DAG respectivamente; $p=0,043$). En los WT no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. (Resultado descrito en la sección 3.9). No se observaron diferencias significativas entre los grupos suplementados con distintos aceites ni en ratones WT ni en KO. Al comparar ambos genotipos dentro de cada grupo de dieta, los niveles de insulina plasmática fueron más bajos en todos los grupos de tratamiento en los ratones KO con respecto a los WT; sin embargo, esta diferencia fue significativa solo en el grupo con DAG, como ya se mencionó (1,3 +/- 0,7ug/ml y 0,6 +/- 0,1ug/ml; WT y KO respectivamente; $p= 0,014$).

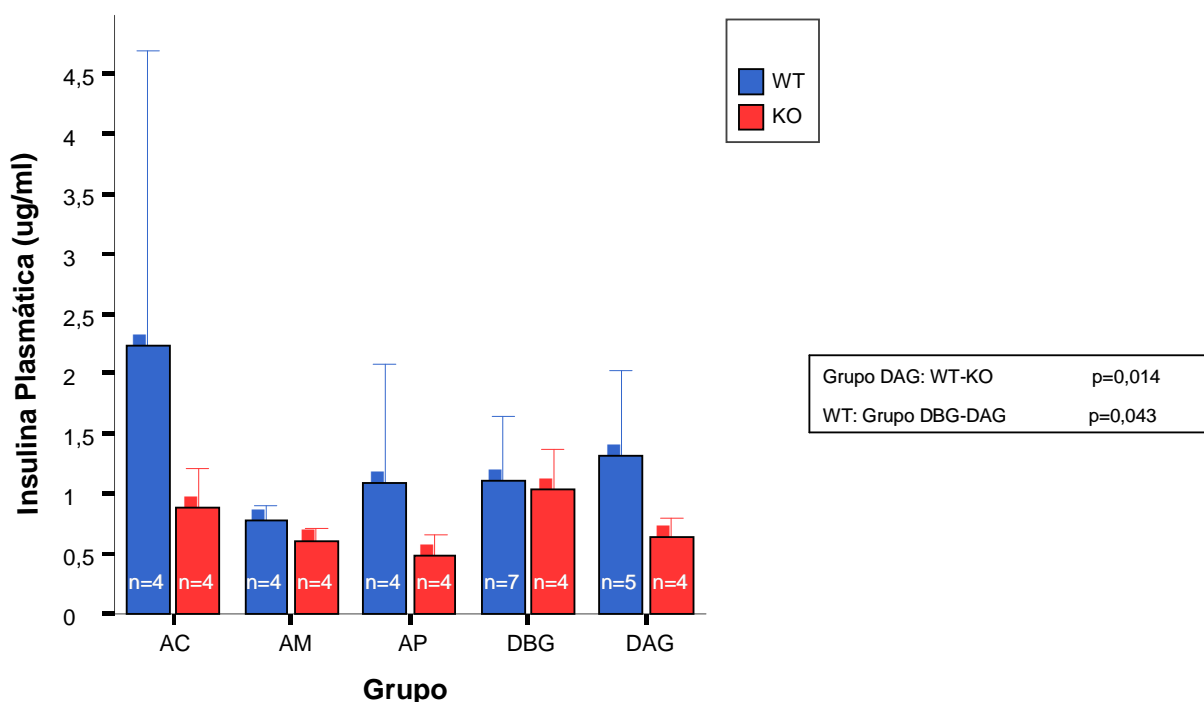


Figura 31: Insulina plasmática al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Insulina plasmática en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.11 Test de tolerancia a la glucosa al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

La figura 32 muestra el test de tolerancia a la glucosa realizado al final del período de suplementación con aceites, con dieta alta en grasas (46% de grasa). Se observa que en ambos genotipos, el grupo tratado con DAG es más intolerante a la glucosa que el grupo tratado con DBG. (WT: 21398 +/- 2885 y 31125 +/- 6227; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$ y KO: 21851 +/- 3532 y 28769 +/- 3481; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$). Esto se observa tanto en los gráficos de las curvas de glucosa a distintos tiempos (Fig. 32A y 32B) como en el gráfico que compara las áreas bajo la curva (ABC) de cada uno de los grupos (Fig. 32C). Al comparar los grupos suplementados con aceites de distinta composición de AG, no hubo diferencias entre ellos ni en ratones WT ni en KO en el ABC. Al comparar ambos genotipos dentro de cada grupo de dieta, tanto en los grupos tratados con AC como con AM los ratones KO presentaron ABC significativamente mayores que los WT (AC: 24360 +/- 4872 y 33354 +/- 5200; WT y KO respectivamente; $p = 0,006$ y AM: 25395 +/- 4171 y 32923 +/- 6746; WT y KO respectivamente; $p = 0,021$).

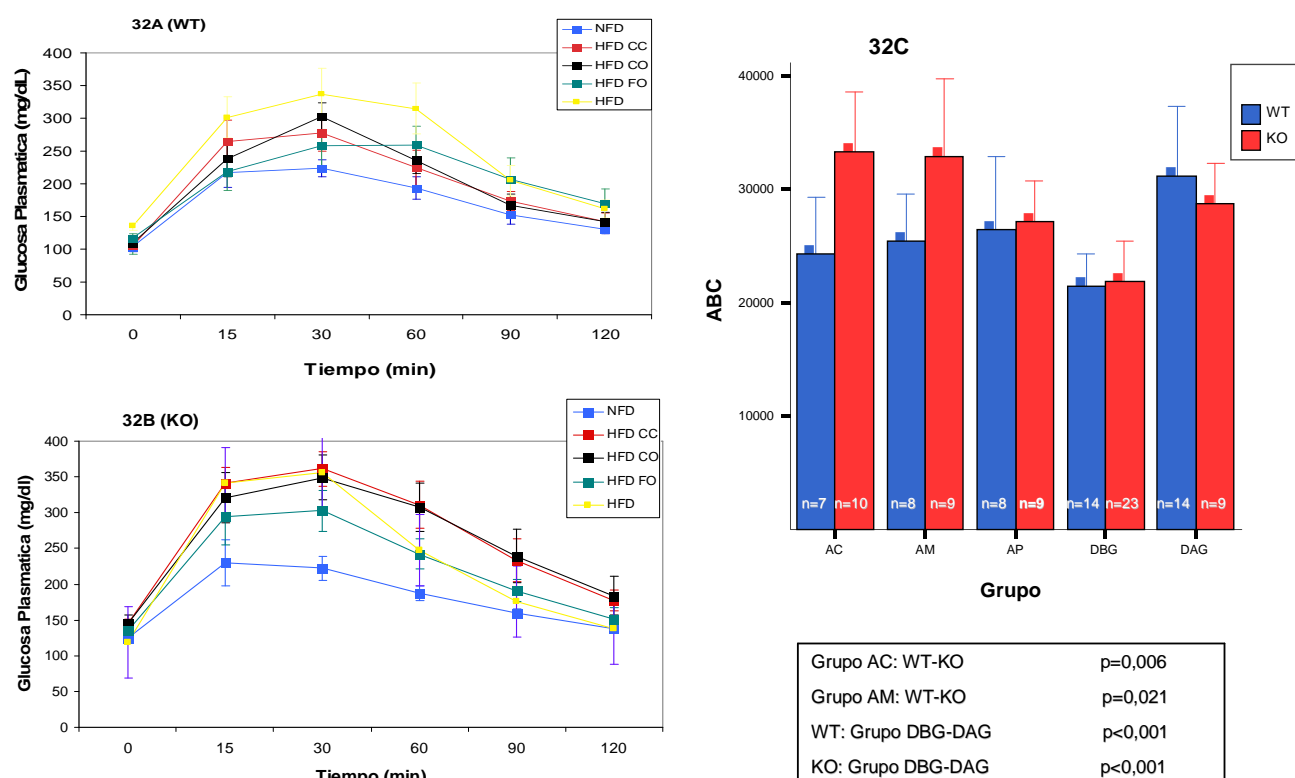


Figura 32: TTG al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Curvas de tolerancia a la glucosa de los animales WT (32A) y 4a14KO (32B) al final del período de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. 32C: Área bajo la curva (ABC) de los animales WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja). Los resultados se expresan como promedio +/- DS para un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

Parámetros bioquímicos hepáticos

3.12 Triglicéridos hepáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

Tal como se dijo en la sección 2.12 y también se observa en la Figura 33, los TG hepáticos aumentaron en forma considerable en los dos genotipos en comparación con la DBG al someter a los ratones a una dieta alta en grasa. (WT: 42 +/- 19ug/mg y 169 +/- 44ug/mg; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y (KO: 21 +/- 13,8ug/mg y 128 +/- 51ug/mg; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,003$). Los ratones tratados con AM o AP presentaron menor cantidad de TG hepáticos que los tratados con AC; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún genotipo. Dentro de cada grupo de dieta, al comparar ratones WT con KO solo en el grupo con DBG se observaron diferencias entre genotipos, siendo menores los TG en los KO (42 +/- 19ug/mg y 21 +/- 13ug/mg; WT y KO respectivamente; $p = 0,042$).

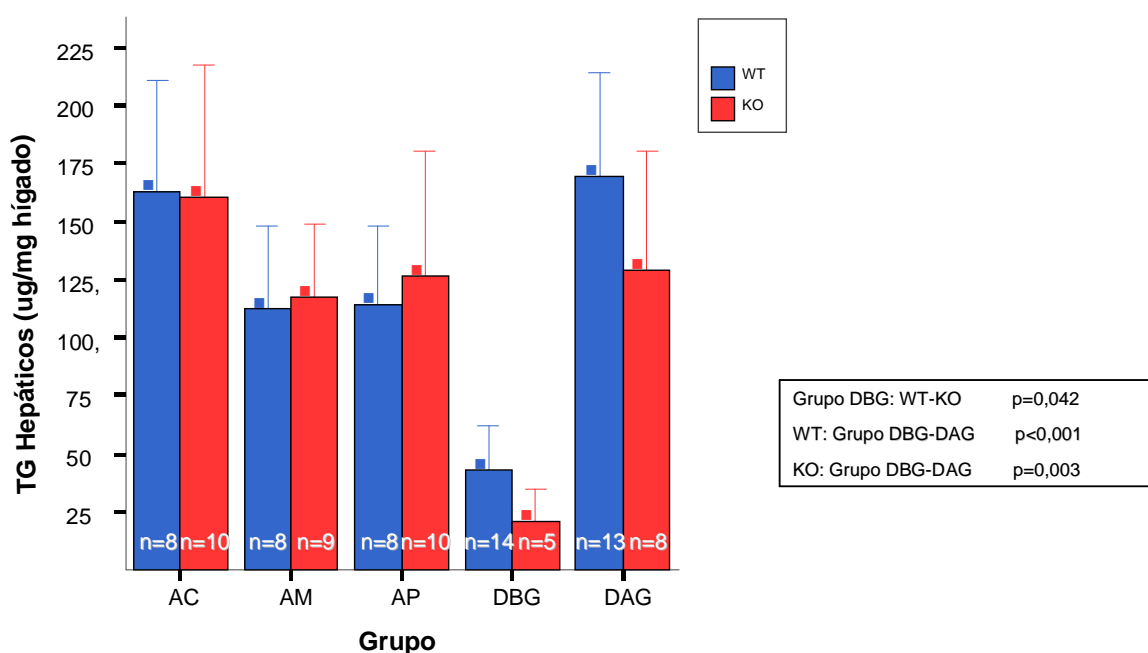


Figura 33: Triglicéridos hepáticos al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Triglicéridos hepáticos en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio +/- DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

3.13 Colesterol hepático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa

Tal como se observa en la figura 34, los niveles de colesterol hepático aumentaron en comparación con el grupo tratado con DBG, en el grupo tratado con DAG con respecto a la DBG, siendo esto estadísticamente significativo para los ratones WT ($5,9 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $12,2 \pm 5,7 \mu\text{g}/\text{mg}$; DBG y DAG respectivamente; $p < 0,001$) y mostrando una tendencia al aumento en los KO ($6,3 \pm 2,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ y $8,8 \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{mg}$; DBG y DAG respectivamente; $p = 0,057$). No se observaron diferencias entre los 3 grupos tratados con aceites en ningún genotipo y tampoco hubo diferencias entre WT y KO dentro de ningún grupo de dieta.

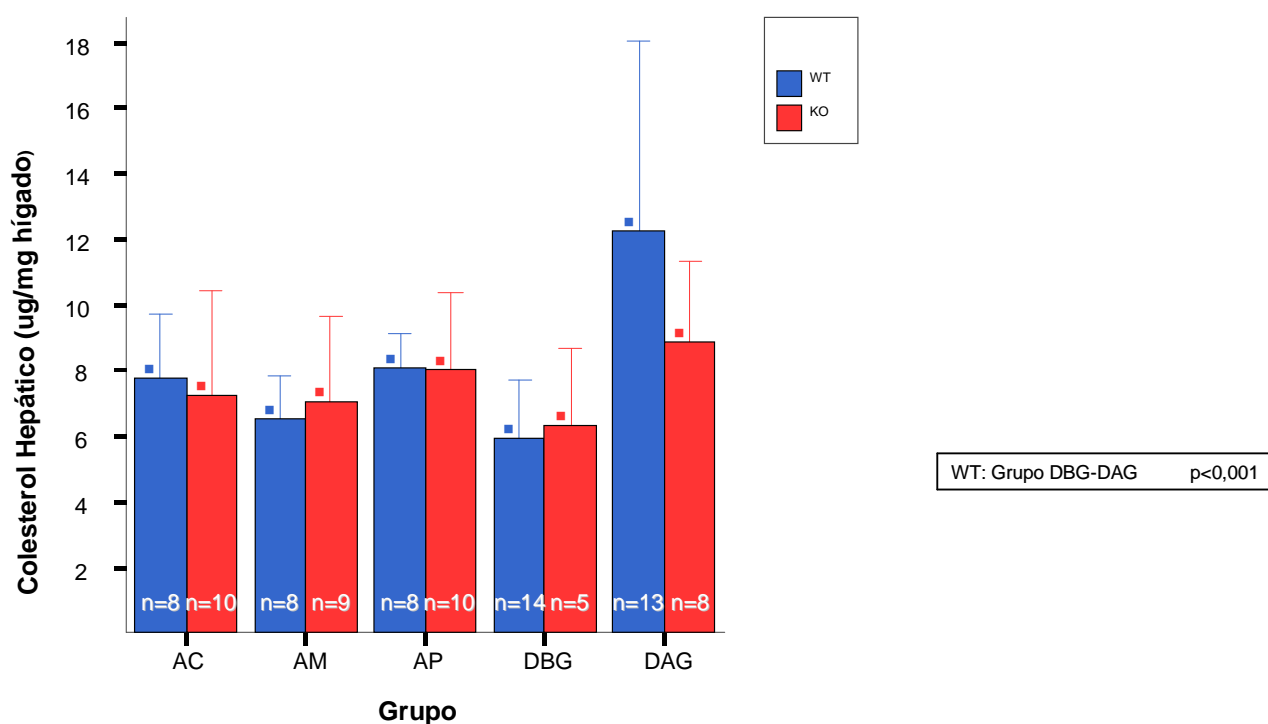


Figura 34: Colesterol hepático al final del período de suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa.

Colesterol hepático en ratones WT (barra azul) y 4a14KO (barra roja) al final de la etapa de suplementación por un mes con aceites de distinta composición de ácidos grasos bajo condiciones de 46% grasa. Los resultados se expresan como promedio \pm DS de un número de animales descrito al pie de cada columna. Los valores de significancia estadística se muestran en el cuadro adjunto al gráfico.

DISCUSIÓN:

Se ha atribuido a los ácidos grasos n-3 presentes en el aceite de pescado un rol en la prevención de eventos cardiovasculares y en el manejo del SM, debido especialmente a sus propiedades hipolipemiantes y antidiabetogénicas. Sin embargo, los mecanismos de los efectos benéficos de los AG n-3 están lejos aún de ser conocidos a cabalidad [14, 21, 54, 55].

Estudios *in vitro* han demostrado que las isoformas homólogas humanas de las Cyp4a metabolizan AG n-3 para formar compuestos con capacidad para activar al receptor nuclear PPAR α [47], lo que sugiere que las isoformas Cyp4a podrían participar en los efectos benéficos del aceite de pescado sobre el metabolismo de lípidos y de la glucosa que han sido descritos y que dependen de PPAR α [19, 25].

Sin embargo, el papel de las isoformas Cyp4a en el metabolismo de lípidos no ha sido aún estudiado *in vivo* y tampoco se conoce su rol como eventuales generadores de lípidos bioactivos derivados de los AG n-3. Debido a esto surgió la idea de evaluar este planteamiento *in vivo*, por lo que se diseñó este estudio para evaluar el efecto del aceite de pescado en un modelo animal con ablación genética de una de las isoformas en cuestión, la Cyp4a14.

Debido a que los efectos benéficos de los AG n-3 son especialmente relevantes para el control del síndrome metabólico, se decidió realizar este estudio en animales tratados con dietas hipercalóricas ricas en grasas, como modelo de SM inducido por la dieta [8]. Por ello la primera parte del estudio corresponde a la caracterización de la respuesta de los animales WT y Cyp4a14 al tratamiento por 70 días con dieta alta en grasas (DAG; 60% grasas, 20% proteína, 20% carbohidratos), con el objetivo de desarrollar en ellos algunos componentes del síndrome metabólico, como obesidad y resistencia a la insulina.

Durante esta etapa, se observó que los ratones WT y KO sometidos a una DAG aumentaron de peso en forma constante (figura 3), alcanzando un peso mayor respecto a los respectivos controles tratados con DBG (figura 4). Esto concuerda con nuestro objetivo de inducir obesidad mediante DAG. El aumento de peso fue mayor en ratones KO que en WT al final del tratamiento; considerando que ambos genotipos inician el tratamiento con un peso similar, aparentemente ellos fueron más sensibles al tratamiento con DAG por 70 días (figuras 3 y 4); sin embargo, no es posible determinar las razones de este hallazgo a la luz de los resultados observados.

Con respecto a la ingesta alimenticia, entre los grupos con DBG y DAG, la ingesta alimenticia (gramos/día) fue mayor en los ratones tratados con DBG,

(figura 5A), mientras que la ingesta calórica (Kcal/día) fue similar entre los grupos tratados con DBG y DAG (figura 5B). Estos resultados coinciden con lo observado generalmente en la literatura [56].

Parece interesante destacar que aunque la ingesta calórica fue similar y partieron de un peso similar también, en esta primera etapa, hubo una diferencia significativa entre el peso final a 70 días para los grupos tratados con DBG y DAG en ambos genotipos, lo que permite suponer que el exceso de peso de los ratones sometidos a DAG, en comparación con los sometidos a DBG, podría explicarse por la diferencia en el porcentaje de grasa en la dieta más que por la cantidad de calorías ingeridas en la dieta.

En cuanto a la medición de lípidos plasmáticos, se observó a los 70 días una tendencia (no significativa) de los ratones a disminuir sus niveles de TG plasmáticos al ser sometidos a DAG y un aumento significativo en los niveles de colesterol plasmático en ambos genotipos. En la literatura, está descrito que una dieta rica en grasas saturadas (como la utilizada en el grupo con DAG) puede aumentar los TG y colesterol plasmáticos en forma importante en algunos modelos murinos [56,7]. Sin embargo, al realizar una revisión más exhaustiva del tema, se observa que muchas cepas de ratones, entre ellas la utilizada en este estudio (129SvJ), bajan en forma significativa los niveles de TG plasmáticos en respuesta a una dieta rica en grasas. (<http://phenome.jax.org/db/qp?rtn=views/measplot&brieflook=830>). Esto parece ser el resultado de un aumento del depósito de TG en el hígado más que de un aumento del metabolismo sistémico de TG.

En el colesterol plasmático, en cambio, una dieta rica en grasas saturadas tiene un efecto más parejo entre distintas cepas, (<http://phenome.jax.org/db/qp?rtn=views/measplot&brieflook=808>) que tiende hacia el alza, lo que coincide con nuestros hallazgos.

En cuanto a los parámetros bioquímicos asociados al metabolismo de la glucosa, observamos que a los 70 días de tratamiento, en los dos genotipos se indujo intolerancia a la glucosa con la DAG, esto manifestado en las curvas del TIG realizado al final del tratamiento (figura 8) y por los valores de glicemia en ayuno (figura 7), que también fueron más elevadas en el grupo tratado con DAG. Este resultado era esperable según lo planteado por nosotros y lo descrito en la literatura con respecto al efecto de la DAG en el deterioro del metabolismo de la glucosa [56, 58].

Resumiendo entonces, tal como esperábamos, la intervención con DAG por 70 días fue efectiva en provocar en nuestros modelos animales obesidad, intolerancia a la glucosa e hipercolesterolemia. Los ratones Cyp4a14KO en

comparación con los WT, presentaron una mayor alza de peso, mayores niveles de triglicéridos y colesterol plasmáticos, mayores niveles de glicemia en ayuno y de intolerancia a la glucosa al ser sometidos a una DAG. De estos resultados podemos deducir que existe una respuesta diferencial a la dieta rica en grasa según el genotipo de los ratones, presentando los ratones KO un mayor deterioro metabólico que los WT al ser sometidos a dieta rica en grasas saturadas. De esta forma, podríamos suponer que la isoforma Cyp4a14 podría tener un rol en el metabolismo de lípidos y glúcidos ante condiciones de estrés metabólico como es una dieta rica en grasas.

Luego de esta primera etapa en que se obtuvieron ratones con varios componentes del síndrome metabólico, la segunda etapa de intervención buscó evaluar el efecto del aceite de pescado sobre diversos parámetros metabólicos relacionados con el metabolismo de lípidos y de la glucosa. Para esto, se suplementó la dieta alta en grasa con aceites con distinta composición de ácidos grasos por un mes, realizándose esto bajo dos condiciones de dietas con distinta cantidad de grasa total en los grupos suplementados con aceites: la primera con 66% de grasa, 17% proteína, 17% carbohidratos y la segunda con 46% de grasa, 16% de proteína y 38% carbohidratos.

Las mediciones de parámetros morfométricos realizadas al final de los experimentos, no mostraron una diferencia significativa de peso entre los ratones sometidos a DAG con respecto a los sometidos a DBG en ninguno de los dos genotipos (figuras 10). Además, el peso fue similar para todos los tipos de aceites en las dos condiciones experimentales. Esto nos hace pensar que pasado el período inicial de aumento de peso, existe una autorregulación en el metabolismo de los ratones que impide una ganancia de peso progresiva en el tiempo al ser sometidos a una dieta rica en grasa y a suplementación con aceites. De esta manera, la isoforma Cyp4a14 perdería durante este período la importancia que tuvo en la etapa inicial de aumento de peso. Es importante destacar que la ingesta alimenticia en respuesta a la suplementación con aceites no fue distinta entre los WT y 4a14KO, lo que sugiere que la isoforma Cyp4a14 no juega un rol en la regulación de la ingesta alimenticia en condiciones de dieta rica en grasas suplementada con distintos aceites.

En lo que respecta al tamaño de los órganos al final de las intervenciones dietarias con y sin aceites, el tamaño del hígado no presentó cambios importantes entre DAG y DBG y no se observaron diferencias del grupo tratado con AP comparado con los demás grupos tratados con aceites en ninguna de las dos condiciones de experimentación (figuras 12 y 25). El porcentaje de grasa corporal fue menor en los animales tratados con DBG, como era de esperar (figura 13). En

los animales tratados con aceites, la mayoría de los grupos experimentales no variaron significativamente su adiposidad entre ellos para las dos condiciones evaluadas (46% grasa y 66% grasa) ni entre genotipos. Solo se observó que en el grupo de 66% grasa suplementado con aceite de maíz los animales WT presentaron un porcentaje de adiposidad mayor que los Cyp4a14KO (figura 13). Sin embargo, las diferencias finales observadas deben ser examinadas en un mayor número de animales y con tratamientos más prolongados con AM para establecer si son realmente importantes. Estos resultados sugieren que la suplementación por un mes con distintos aceites no tiene un efecto significativo sobre la adiposidad acumulada durante los dos meses previos de tratamiento con DAG.

En los experimentos de ingesta alimenticia se observó que bajo condiciones de 66% grasa, la ingesta calórica promedio fue muy parecida en todos los grupos experimentales (figura 11B), mientras que la ingesta medida en gramos por día, fue mayor en el grupo sometido a DBG que en los otros grupos (figura 11A), por lo que las diferencias en el contenido calórico de las dietas fueron totalmente compensadas por los ratones modificando su ingesta alimenticia (gramos de alimento consumidos). No hubo diferencias por el efecto del tipo de aceite suplementado sobre los niveles de ingesta, ni tampoco efecto del genotipo. Es interesante considerar que si bien las dietas DBG, DAG y las con aceites no son isocalóricas entre sí, la capacidad de los ratones para controlar su ingesta alimenticia hacen que los tratamientos sí sean isocalóricos, ya que la cantidad de calorías que los animales consumen se mantiene constante.

En los experimentos con 46% de grasa, en cambio, en los 3 grupos suplementados con aceites, los ratones KO presentaron una ingesta calórica mayor que sus respectivos WT (figura 24B); sin embargo, esto no se reflejó en un mayor peso en ellos al final del tratamiento (figura 23), ni en un aumento en la adiposidad (figura 26) por lo que podría pensarse que estos ratones KO presentaron un mayor gasto metabólico que los WT.

En cuanto a los parámetros bioquímicos asociados al metabolismo de lípidos, al final del tratamiento, las mediciones de TG en la suplementación con aceites bajo condiciones de 46% grasa (figura 27) mostraron una diferencia en el grupo tratado con AP. Este grupo, presentó niveles de TG más bajos que los grupos tratados con AM y AC, lo cual coincide con datos de la literatura que sugieren que el AP presenta efectos hipolipidémicos. Sin embargo, no se observaron efectos del genotipo en ninguna de las dos condiciones de experimentación (66% grasa o 46% grasa, figuras 14 y 27 respectivamente).

Con respecto al colesterol plasmático, los ratones mostraron un alza en sus niveles de colesterol al ser tratados con DAG en comparación con una DBG (figura

15 y figura 28). Ambos genotipos mostraron incremento de los niveles de colesterol en respuesta a DAG, si bien solo se alcanzó la significancia estadística en los WT mientras que en los KO solo se observó una tendencia. En ambos tipos de dieta, los KO presentaron niveles de colesterol menores que los WT. Este hallazgo se contrapone con otros resultados de este trabajo, donde los KO presentan un mayor deterioro metabólico que los WT al ser sometidos DAG.

Bajo condiciones de 66% grasa, la suplementación con aceites generó diferencias significativas entre genotipos para los tratamientos con AM y AC, donde los niveles de colesterol plasmáticos en los KO fueron más elevados que en lo WT. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los dos genotipos en el grupo tratado con AP (figura 15).

Bajo condiciones de 46% grasa, no se observaron diferencias entre genotipos en los grupos suplementados con aceites; sin embargo, los Cyp4a14KO tratados con AP mostraron menores niveles de colesterol plasmáticos que los grupos suplementados con AM y AC (figura 28).

Podríamos concluir entonces que bajo condiciones de 66% grasa, el genotipo influencia los niveles de colesterol plasmático y bajo condiciones de 46% grasa el tipo de aceite lo influencia. Sin embargo, a la luz de estos hallazgos, no resulta posible atribuir un rol a la isoforma Cyp4a14 en los efectos del aceite de pescado sobre el colesterol plasmático.

En los ácidos grasos libres no se observaron diferencias dadas por el tipo de aceite suplementado, en ninguna de las dos condiciones de experimentación (66% y 46% grasa, figuras 16 y 29 respectivamente). En general en ambas condiciones los niveles de AGL fueron más elevados en los ratones KO que en los WT. Sin embargo, en los experimentos con 46% grasa no se alcanzó la significancia estadística en esta diferencia y la tendencia mencionada no se dio en el grupo suplementado con AC. Los mayores cambios se observaron entre los grupos con DBG y DAG, con menores niveles de AGL en ambos genotipos al ser sometidos a DAG con respecto a DBG, sobre todo en los KO. Sin embargo, dada la alta dispersión de los datos, se necesita un n mayor para poder obtener conclusiones al respecto.

En cuanto a los lípidos hepáticos, se observó, un alza importante en los TG hepáticos en ratones WT y KO al someter a los ratones a la DAG en comparación con la DBG, lo que esta de acuerdo con datos de la literatura [19, 59, 60]. En los experimentos con 66% grasa el grupo tratado con AP presentó una diferencia importante entre los niveles de TG hepáticos de los ratones KO con los WT, siendo en los WT significativamente menores que en los KO (figura 20). Este resultado es interesante porque sugiere que en los ratones Cyp4a14KO los efectos benéficos del

AP sobre el hígado graso no se observan [19, 60]. En las condiciones de los experimentos con 46% grasa no se logró reproducir esta diferencia del efecto del aceite de pescado según el genotipo. Se sugieren diferencias dadas por el tipo de aceite, donde en ambos genotipos, la suplementación con AM y AP, disminuyeron los TG hepáticos en comparación con el AC; sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo (figura 33).

Los niveles de colesterol hepático aumentaron en el grupo con DAG en comparación con el grupo tratado con DBG; sin embargo, esto no alcanzó la significancia estadística en los ratones KO. En las condiciones con 66% grasa los ratones WT tratados con AP presentaron niveles de colesterol hepático menores que los Cyp4a14 KO (figura 21), lo que sugiere que en los Cyp4a14KO los efectos benéficos del AP sobre los niveles de colesterol hepático no se detectaron. En las condiciones de los experimentos con 46% Kcal grasa, no se logró reproducir este efecto diferencial del AP según el genotipo (figura 34).

En conclusión, en los lípidos hepáticos las distintas condiciones de experimentación mostraron resultados disímiles en cuanto al efecto del aceite de pescado en el genotipo. En las condiciones utilizadas para los experimentos con 66% grasa se observaron resultados interesantes en cuanto al efecto diferencial del AP según el genotipo, tanto en los niveles de TG como de colesterol hepático. Sin embargo, dada la gran variabilidad de los datos y a que el n es pequeño, sería conveniente aumentar el n en estudios posteriores, con las mismas condiciones de experimentación.

En los parámetros asociados al metabolismo de glucosa, los niveles de glucosa plasmática medidos al final del tratamiento no variaron entre los grupos sometidos a DBG y los sometidos a DAG. Bajo condiciones de 66% grasa (figura 17), se observaron diferencias significativas entre genotipos solo para los tratamientos con AC y AM en que los animales Cyp4a14 KO mostraron mayores niveles de glucosa en ayuno. Bajo condiciones de 46% grasa (figura 30), no se observaron diferencias significativas en los genotipos o del efecto del aceite de pescado entre los distintos genotipos, a pesar de que en estas condiciones se incrementó el porcentaje de carbohidratos en la dieta en los grupos tratados con aceites (38% de carbohidratos para la dieta 46% grasa versus 17% de carbohidratos para la dieta 66% grasa).

En los niveles de insulina plasmáticos, bajo ninguna de las dos condiciones de intervención dietaria se observaron diferencias dadas por el tipo de aceite (figuras 18 y 31). Diferencias dadas por el genotipo se observaron en el grupo tratado con AP para la condición de 66% grasa, en que los ratones KO tuvieron niveles más bajos de insulina que los WT (figura 18). Sin embargo, la gran

dispersión de los datos observada en las determinaciones hará necesaria la confirmación de los resultados en nuevos experimentos.

Con respecto a la tolerancia a la glucosa, TTG realizados al final del tratamiento corroboraron que el grupo tratado con DBG es más tolerante a la glucosa que los grupos tratados con DAG, lo que está de acuerdo con la literatura [56, 58]. No se observó en ninguna de las dos condiciones de experimentación un efecto benéfico significativo del AP con respecto a los otros dos tipos de aceites, resultados discrepantes con lo observado en la literatura [25] . Tampoco se observó un efecto distinto del AP según el genotipo de ratón.

En resumen, los experimentos relacionados con el control de los niveles de glucosa plasmática dan resultados variables, que no permiten establecer un rol putativo para Cyp4a14 en dicho aspecto del metabolismo. Experimentos de desafío con dietas ricas en carbohidratos podrían aclarar si efectivamente existe alguna función de Cyp4a14 en el control del metabolismo de la glucosa.

CONCLUSIONES

Este estudio, al menos de nuestro conocimiento, es el primer estudio que busca encontrar *in vivo* un papel para la isoforma Cyp4a14 en el efecto benéfico del aceite de pescado. Tomando en consideración los resultados obtenidos podemos concluir que:

-En respuesta a una dieta rica en grasa:

Ambos genotipos responden de la misma manera, subiendo de peso, haciéndose intolerantes a la glucosa y subiendo sus niveles de colesterol plasmático. Sin embargo, los ratones KO suben más de peso y presentan mayores niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos. Además, presentan mayores niveles de glicemia en ayunas y de intolerancia a la glucosa.

-En respuesta a la suplementación con aceites:

-Se observaron diferencias en la respuesta metabólica de los ratones a las dos condiciones de experimentación (66% y 46% grasa) en cuanto a los lípidos plasmáticos.

-En las condiciones de 66% grasa, se observó una diferencia entre genotipos en la respuesta a la suplementación con aceite de pescado en la acumulación de TG y colesterol hepáticos, siendo ésta mayor en los ratones KO.

-En ninguna de las dos condiciones se observaron diferencias en la tolerancia a la glucosa entre ambos genotipos.

-Ninguna de las dos condiciones de experimentación empleadas en este estudio mostró resultados contundentes para avalar nuestra hipótesis.

-En ambas condiciones existe gran dispersión de los datos en general, lo que nos hace pensar que el comportamiento de los ratones es muy variable.

-Considerando que este es un estudio piloto, realizado para determinar las condiciones en que Cyp4a14 pudiera tener una función relevante en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, podemos concluir que Cyp4a14 podría participar en el control del metabolismo hepático de TG y colesterol en condiciones de dieta alta en grasas. Sin embargo, experimentos posteriores son necesarios para confirmar esta apreciación.

REFERENCIAS.

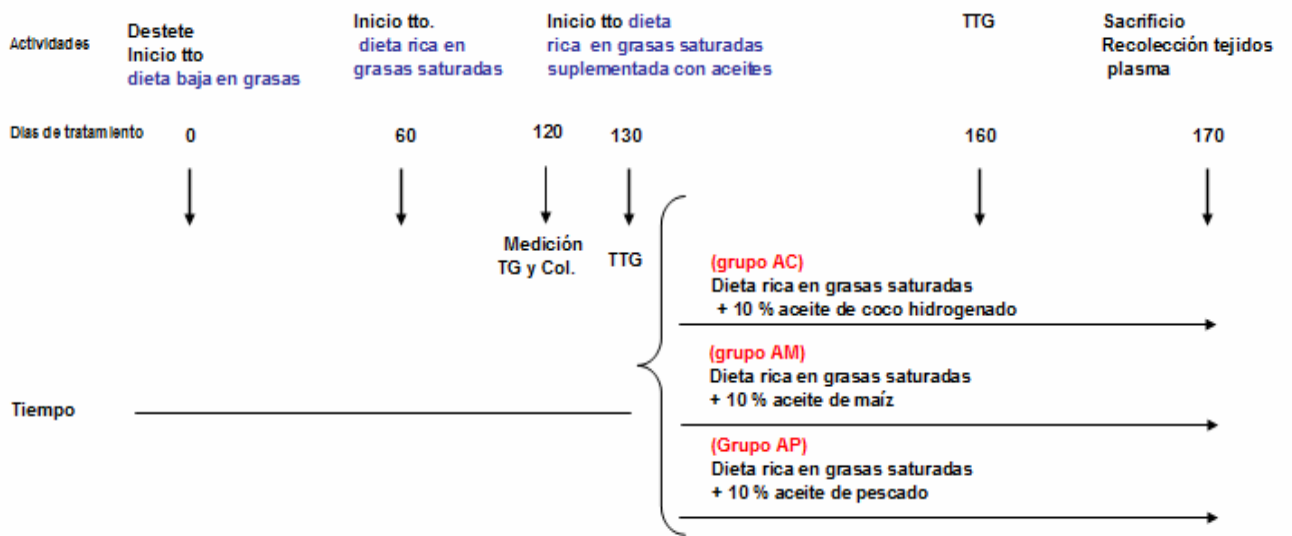
1. Alexander, C.M., et al., *NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older*. *Diabetes*, 2003. **52**(5): p. 1210-4.
2. Chilean-Government. *National Health Survey Chile*. 2003 [cited; Available from: <http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/ENS/InformeFinalENS.pdf>].
3. Lakka, H.M., et al., *The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men*. *JAMA*, 2002. **288**(21): p. 2709-16.
4. Oron-Herman, M., et al., *Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models*. *Am J Hypertens*, 2008. **21**(9): p. 1018-22.
5. Gentile, C.L. and M.J. Pagliassotti, *The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease*. *J Nutr Biochem*, 2008. **19**(9): p. 567-76.
6. Isharwal, S., et al., *Diet & insulin resistance: a review & Asian Indian perspective*. *Indian J Med Res*, 2009. **129**(5): p. 485-99.
7. Buettner, R., et al., *Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types*. *J Mol Endocrinol*, 2006. **36**(3): p. 485-501.
8. Gajda, A., et al., *Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models*. *Animal lab news*, 2007.
9. Carpentier, Y.A., L. Portois, and W.J. Malaisse, *n-3 fatty acids and the metabolic syndrome*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1499S-1504S.
10. Todoric, J., et al., *Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Diabetologia*, 2006. **49**(9): p. 2109-19.
11. Flachs, P., et al., *Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet*. *Diabetologia*, 2006. **49**(2): p. 394-7.
12. Aguilera, A.A., et al., *Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome*. *J Nutr Biochem*, 2004. **15**(6): p. 350-7.
13. Itoh, M., et al., *Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(9): p. 1918-25.
14. Perez-Matute, P., et al., *Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha*. *Br J Nutr*, 2007. **97**(2): p. 389-98.
15. Kelley, D.S., et al., *Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(2): p. 324-33.
16. Zivkovic, A.M., J.B. German, and A.J. Sanyal, *Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(2): p. 285-300.
17. Levy, J.R., J.N. Clore, and W. Stevens, *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats*. *Hepatology*, 2004. **39**(3): p. 608-16.
18. Svegliati-Baroni, G., et al., *A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(3): p. 846-60.

19. Larter, C.Z., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by dietary fish oil attenuates steatosis, but does not prevent experimental steatohepatitis because of hepatic lipoperoxide accumulation.* J Gastroenterol Hepatol, 2007.
20. Satoh, N., et al., *Purified eicosapentaenoic acid reduces small dense LDL, remnant lipoprotein particles, and C-reactive protein in metabolic syndrome.* Diabetes Care, 2007. **30**(1): p. 144-6.
21. Davidson, M.H., *Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids.* Am J Cardiol, 2006. **98**(4A): p. 27i-33i.
22. OMS/FAO, *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe Técnico OMS, in serie 916.* 2003.
23. Simoncikova, P., et al., *Comparison of the extrapancreatic action of gamma-linolenic acid and n-3 PUFAs in the high fat diet-induced insulin resistance [corrected].* Endocr Regul, 2002. **36**(4): p. 143-9.
24. Rossmeisl, M., et al., *Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity.* Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1958-66.
25. Neschen, S., et al., *n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner.* Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1034-41.
26. Deckelbaum, R.J., T.S. Worgall, and T. Seo, *n-3 fatty acids and gene expression.* Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
27. Feige, J.N., et al., *From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions.* Prog Lipid Res, 2006. **45**(2): p. 120-59.
28. Reddy, J.K. and T. Hashimoto, *Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system.* Annu Rev Nutr, 2001. **21**: p. 193-230.
29. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.* Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 649-88.
30. Kliewer, S.A., et al., *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4318-23.
31. Guerre-Millo, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16638-42.
32. Guerre-Millo, M., et al., *PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance.* Diabetes, 2001. **50**(12): p. 2809-14.
33. Bell, D.R. and C.R. Elcombe, *Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450IVA1 RNA in rat primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators.* Biochem J, 1991. **280**(Pt 1): p. 249-53.
34. Dreyer, C., et al., *Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors.* Cell, 1992. **68**(5): p. 879-87.
35. Hashimoto, T., et al., *Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting.* J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28918-28.
36. Staels, B., et al., *Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism.* Circulation, 1998. **98**(19): p. 2088-93.
37. Cowart, L.A., et al., *The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands.* J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35105-12.

38. Capdevila, J.H., R.C. Harris, and J.R. Falck, *Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(5): p. 780-9.
39. Capdevila, J.H., J.R. Falck, and J.D. Imig, *Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension*. Kidney Int, 2007. **72**(6): p. 683-9.
40. Hardwick, J.P., *Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases*. Biochem Pharmacol, 2008. **75**(12): p. 2263-75.
41. Waxman, D.J., *P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR*. Arch Biochem Biophys, 1999. **369**(1): p. 11-23.
42. Savas, U., K.J. Griffin, and E.F. Johnson, *Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(5): p. 851-7.
43. Savas, U., M.H. Hsu, and E.F. Johnson, *Differential regulation of human CYP4A genes by peroxisome proliferators and dexamethasone*. Arch Biochem Biophys, 2003. **409**(1): p. 212-20.
44. Corton, J.C., et al., *Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferator chemicals*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(3): p. 463-73.
45. Shaban, Z., et al., *AhR and PPARalpha: antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11*. Xenobiotica, 2005. **35**(1): p. 51-68.
46. Pozzi, A., et al., *Peroxisomal proliferator activated receptor(alpha)-dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis*. J Biol Chem, 2007.
47. Harmon, S.D., et al., *Oxygenation of omega-3 fatty acids by human cytochrome P450 4F3B: effect on 20-hydroxyeicosatetraenoic acid production*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 169-77.
48. Schwarz, D., et al., *Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(8): p. 1445-57.
49. Kroetz, D.L., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31581-9.
50. Gainer, J.V., et al., *Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension*. Circulation, 2005. **111**(1): p. 63-9.
51. Nakagawa, K., et al., *Salt-sensitive hypertension is associated with dysfunctional Cyp4a10 gene and kidney epithelial sodium channel*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1696-702.
52. Holla, V.R., et al., *Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5211-6.
53. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
54. Qi, K., et al., *Omega-3 fatty acid containing diets decrease plasma triglyceride concentrations in mice by reducing endogenous triglyceride synthesis and*

- enhancing the blood clearance of triglyceride-rich particles.* Clin Nutr, 2008. **27**(3): p. 424-30.
55. Harris, W.S., *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor.* Pharmacol Res, 2007. **55**(3): p. 217-23.
56. Oliveros, L.B., et al., *Dietary fat saturation produces lipid modifications in peritoneal macrophages of mouse.* J Nutr Biochem, 2003. **14**(7): p. 370-7.

Animales tratados con dieta rica en grasas saturadas (grupos AC, AM, AP)



Animales tratados con dieta baja en grasas (grupo DBG) y alta en grasas (grupo DAG)

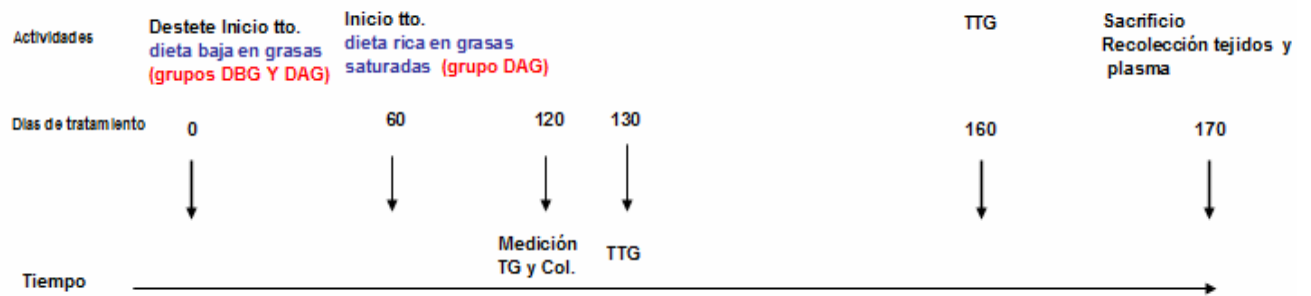


Fig. 1: Resumen de Tratamientos.

ANEXO 1.

Tabla I: Resumen Composición de Dietas

Tabla IA. Experimentos 66% Kcal Grasa

Dieta	% aceite	Grasa Kcal%	Proteína Kcal%	CHO Kcal%	Kcal. Tot/ 100gr	Ratio n-6/n-3	g. grasa/100g dieta
Obesogénica		60	20	20	524	9:1	35
Obesogénica + aceite de coco	10%	66	17	17	558	9:1	41.5
Obesogénica + aceite de maíz	10%	66	17	17	558	20:1	41.5
Obesogénica + aceite de pescado	10%	66	17	17	558	2:1	41.5
Dieta Baja en grasa		10	20	70	385	7:1	4.3

Tabla IB. Experimentos 46% Kcal Grasa

Dieta	% aceite	Grasa Kcal%	Proteína Kcal%	CHO Kcal%	Kcal. Tot/ 100gr	Ratio n-6/n-3	g. grasa/100g dieta
Obesogénica		60	20	20	524	9:1	35
Obesogénica + aceite de coco	10%	46	16	38	561	9:1	31.6
Obesogénica + aceite de maíz	10%	46	16	38	561	20:1	31.6
Obesogénica + aceite de pescado	10%	46	16	38	561	2:1	31.6
Dieta Baja en grasa		10	20	70	385	7:1	4.3

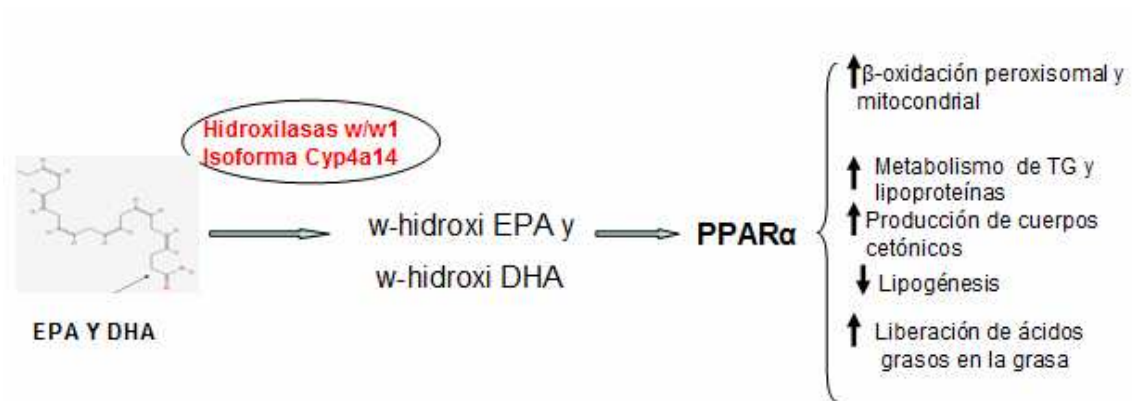


Fig. 2. Modelo Hipotético de la función de Cyp4a14

ANEXO:**TABLAS ANOVA****Nota:****TIPO: Genótipo: WT o KO****GRUPO: grupo de dieta: AC-AM-AP****En amarillo se destacan las comparaciones estadísticamente significativas (p<0,05)****Curva de Peso durante 70 días con DAG**

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	515592,31	1	515592,31	14178,13	<0,001
GRUPO	919,97	1	919,97	25,30	<0,001
TIPO	73,41	1	73,41	2,02	0,16
GRUPO * TIPO	385,65	1	385,65	10,60	<0,001
Error	3054,69	84	36,37		

Peso a los 70 días de Tratamiento

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	118944,85	1	118944,85	13787,53	<0,001
TIPO	21,08	1	21,08	2,44	0,12
GRUPO	545,74	1	545,74	63,26	<0,001
TIPO * GRUPO	85,86	1	85,86	9,95	<0,001
Error	1492,47	173	8,63		

Ingesta Alimenticia Kcal/día Primera Etapa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	12175,53	1	12175,53	6944,84	<0,001
TIPO	0,56	1	0,56	0,32	0,57
GRUPO	2,16	1	2,16	1,23	0,27
TIPO * GRUPO	9,38	1	9,38	5,35	0,02
Error	359,40	205	1,75		

Ingesta Alimenticia g/día Primera Etapa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	644,88	1	644,88	10321,54	<0,001
TIPO	0,02	1	0,02	0,31	0,58
GRUPO	10,98	1	10,98	175,75	<0,001
TIPO * GRUPO	0,06	1	0,06	1,00	0,32
Error	12,75	204	0,06		

Triglicéridos Plasmáticos a los 70 días

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	10,86	1	10,86	1197,33	<0,001
GRUPO	0,06	1	0,06	6,53	0,02
TIPO	0,26	1	0,26	28,60	<0,001
GRUPO * TIPO	0,00	1	0,00	0,01	0,94
Error	0,24	26	0,01		

Colesterol Plasmático a los 70 días

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	46,37	1	46,37	2447,19	<0,001
GRUPO	3,08	1	3,08	162,76	<0,001
TIPO	0,33	1	0,33	17,61	<0,001
GRUPO * TIPO	0,40	1	0,40	21,06	<0,001
Error	0,49	26	0,02		

Glucosa Plasmática a los 70 días

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	1047969,08	1	1047969,10	4547,70	<0,001
TIPO	431,99	1	2934,73	12,74	<0,001
GRUPO	2934,73	1	8739,74	37,93	<0,001
TIPO * GRUPO	309,99	1	309,99	1,35	0,25
Error	16864,73	72	156,15		

TTG a los 70 días

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	17187665,61	1	17187665,61	2842,51	<0,001
TIPO	6687,49	1	6687,49	1,11	0,30
GRUPO	721160,53	1	721160,53	119,27	<0,001
TIPO * GRUPO	28615,73	1	28615,73	4,73	0,03
Error	435359,28	72	6046,66		

Curva de Peso Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados III	de tipo GI	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	274992,85	1	274992,85	15542,78	<0,001
TIPO	0,00	1	0,00	0,00	1,00
GRUPO	292,71	2	146,35	8,27	<0,001
TIPO * GRUPO	371,20	2	185,60	10,49	<0,001
Error	619,24	35	17,69		

Peso Promedio al Final del Tratamiento Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	GI	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	67967,84	1	67967,84	4056,83	<0,001
TIPO	13,89	1	13,89	0,83	0,37
GRUPO	20,50	2	10,25	0,61	0,55
TIPO * GRUPO	37,68	2	18,84	1,12	0,33
Error	837,70	50	16,75		

Ingesta Alimenticia Kcal/día Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	GI	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	6738,40	1	6738,40	7482,88	<0,001
TIPO	0,08	1	0,08	0,09	0,77
GRUPO	1,82	2	0,91	1,01	0,37
TIPO * GRUPO	2,67	2	1,34	1,48	0,24
Error	48,63	54	0,90		

Ingesta Alimenticia g/día Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	GI	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	213,35	1	213,35	7482,88	<0,001
GRUPO	0,06	2	0,03	1,01	0,37
TIPO	0,00	1	0,00	0,09	0,77
GRUPO * TIPO	0,08	2	0,04	1,48	0,24
Error	1,54	54	0,03		

Tamaño del Hígado Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	493,65	1	493,65	2959,57	<0,001
TIPO	0,45	1	0,45	2,68	0,11
GRUPO	0,21	2	0,11	0,64	0,53
TIPO * GRUPO	0,14	2	0,07	0,42	0,66
Error	8,34	50	0,17		

Tamaño de la Grasa Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	1863,69	1	1863,69	1620,97	0,00
TIPO	0,35	1	0,35	0,31	0,58
GRUPO	5,78	2	2,89	2,51	0,09
TIPO * GRUPO	4,55	2	2,27	1,98	0,15
Error	57,49	50	1,15		

Triglicéridos Plasmáticos al final del Tratamiento Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	13,19	1	13,19	501,04	<0,001
TIPO	0,04	1	0,04	1,70	0,20
GRUPO	0,02	2	0,01	0,46	0,63
TIPO * GRUPO	0,13	2	0,07	2,51	0,09
Error	1,42	54	0,03		

Colesterol Plasmático al final del Tratamiento Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	154,26	1	154,26	1651,90	<0,001
TIPO	0,76	1	0,76	8,12	0,001
GRUPO	0,31	2	0,16	1,68	0,20
TIPO * GRUPO	0,40	2	0,20	2,15	0,13
Error	5,04	54	0,09		

Ácidos Grasos Libres Plasmáticos Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	21,14	1	21,14	311,00	<0,001
TIPO	1,70	1	1,70	24,97	<0,001
GRUPO	0,23	2	0,12	1,71	0,19
TIPO * GRUPO	0,10	2	0,05	0,73	0,49
Error	2,99	44	0,07		

Glucosa Plasmática Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	841357,86	1	841357,86	6373,31	<0,001
TIPO	841,57	1	841,57	6,37	0,01
GRUPO	378,54	2	189,27	1,43	0,25
TIPO * GRUPO	1033,14	2	516,57	3,91	0,03
Error	7260,70	55	132,01		

Insulina Plasmática Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	20,89	1	20,89	200,79	<0,001
TIPO	0,00	1	0,00	0,00	0,99
GRUPO	0,07	2	0,03	0,34	0,72
TIPO * GRUPO	0,54	2	0,27	2,59	0,11
Error	1,35	13	0,10		

TTG al final del Tratamiento Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	18604369,40	1	18604369,40	4157,98	<0,001
TIPO	1969,52	1	1969,52	0,44	0,51
GRUPO	297,87	2	148,94	0,03	0,97
TIPO * GRUPO	5855,19	2	2927,59	0,65	0,52
Error	250564,93	56	4474,37		

Triglicéridos Hepáticos Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	455146,02	1	455146,02	407,50	<0,001
TIPO	7531,84	1	7531,84	6,74	0,02
GRUPO	945,01	2	472,51	0,42	0,66
TIPO * GRUPO	4192,78	2	2096,39	1,88	0,17
Error	27923,19	25	1116,93		

Colesterol Hepático Exp. 66% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	1967,22	1	1967,22	1024,77	<0,001
TIPO	0,04	1	0,04	0,02	0,88
GRUPO	6,95	2	3,47	1,81	0,18
TIPO * GRUPO	30,59	2	15,29	7,97	<0,001
Error	47,99	25	1,92		

Curva de Peso Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	221213,07	1	221213,07	14534,09	<0,001
TIPO	140,52	1	140,52	9,23	<0,001
GRUPO	27,76	2	13,88	0,91	0,41
TIPO * GRUPO	57,53	2	28,76	1,89	0,16
Error	715,35	47	15,22		

Peso Promedio al final del Tratamiento Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	58175,36	1	58175,36	4013,24	<0,001
TIPO	17,41	1	17,41	1,20	0,28
GRUPO	8,03	2	4,01	0,28	0,76
TIPO * GRUPO	13,08	2	6,54	0,45	0,64
Error	652,31	45	14,50		

Ingesta Alimenticia Kcal/día Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	6917,91	1	6917,91	3185,94	<0,001
TIPO	74,64	1	74,64	34,37	<0,001
GRUPO	0,18	2	0,09	0,04	0,96
TIPO * GRUPO	5,40	2	2,70	1,24	0,30
Error	110,74	51	2,17		

Ingesta Alimenticia g/día Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	250,80	1	250,80	2842,81	<0,001
TIPO	0,25	1	0,25	2,84	0,10
GRUPO	0,01	2	0,00	0,04	0,96
TIPO * GRUPO	0,20	2	0,10	1,12	0,33
Error	4,50	51	0,09		

Tamaño del Hígado Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	465,88	1	465,88	3932,09	<0,001
TIPO	0,27	1	0,27	2,26	0,14
GRUPO	1,83	2	0,92	7,72	<0,001
TIPO * GRUPO	0,08	2	0,04	0,33	0,72
Error	5,33	45	0,12		

Tamaño de la Grasa Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	1505,24	1	1505,24	1466,72	<0,001
TIPO	0,02	1	0,02	0,02	0,90
GRUPO	2,32	2	1,16	1,13	0,33
TIPO * GRUPO	4,14	2	2,07	2,02	0,14
Error	46,18	45	1,03		

Triglicéridos Plasmáticos al final del Tratamiento Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	21,57	1	21,57	656,46	<0,001
TIPO	0,01	1	0,01	0,30	0,59
GRUPO	0,97	2	0,49	14,78	<0,001
TIPO * GRUPO	0,02	2	0,01	0,29	0,75
Error	1,51	46	0,03		

Colesterol Plasmático al final del Tratamiento Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	123,66	1	123,66	2076,08	<0,001
TIPO	0,02	1	0,02	0,40	0,53
GRUPO	0,73	2	0,37	6,13	<0,001
TIPO * GRUPO	0,32	2	0,16	2,67	0,08
Error	2,74	46	0,06		

Ácidos Grasos Libres Plasmáticos Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	6,23	1	6,23	197,49	<0,001
GRUPO	0,00	2	0,00	0,01	0,99
TIPO	0,00	1	0,00	0,13	0,72
GRUPO * TIPO	0,15	2	0,08	2,45	0,10
Error	1,48	47	0,03		

Glucosa Plasmática Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	722310,61	1	722310,61	1747,97	<0,001
TIPO	16,04	1	16,04	0,04	0,84
GRUPO	1476,00	2	738,00	1,79	0,18
TIPO * GRUPO	163,55	2	81,77	0,20	0,82
Error	19008,51	46	413,23		

Insulina Plasmática Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo IV	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	24,47	1	24,47	20,47	<0,001
TIPO	3,08	1	3,08	2,58	0,13
GRUPO	3,69	2	1,84	1,54	0,24
TIPO * GRUPO	1,43	2	0,72	0,60	0,56
Error	21,51	18	1,20		

TTG al final del Tratamiento Exp. 46% Grasa

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	15402459,18	1	15402459,18	1805,65	<0,001
GRUPO	23579,10	2	11789,55	1,38	0,26
TIPO	154158,94	1	154158,94	18,07	<0,001
GRUPO * TIPO	42090,06	2	21045,03	2,47	0,10
Error	392385,94	46	8530,13		