

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Unidad Iztapalapa



**“LA MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS DE TIPO MEDITERRANEO INDUCE
PROTECCION CELULAR EN HEPATOCITOS CON SOBRECARGA DE LIPIDOS
EN UN MODELO MURINO DE ESTEATOSIS INDUCIDO CON UNA DIETA TIPO
WESTERN “**

T E S I S

Para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Lyssia Castellanos Tapia
Matricula 2163802320

Comité de Tutores
Director Interno
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Directora Externa
Dra. María Elizabeth Tejero Barrera
Co-Directora
Dra. Diana Ivette Aparicio Bautista

Iztapala, Ciudad de México, diciembre 2020

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe: Lyssia Castellanos Tapia, alumno (a) del posgrado Biología experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "La mezcla de ácidos grasos de tipo mediterráneo induce protección celular en hepatocitos con sobrecarga de lípidos en un modelo murino de esteatosis inducido con una dieta tipo western",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el jurado
2. para la obtención del grado de doctor es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
3. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
4. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 9 de diciembre del 2020.
Atentamente



Lyssia Castellanos Tapia

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado. Eliminar este párrafo en la versión que incluyan en la tesis.

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 9 de diciembre de 2020

Comisión Académica del Posgrado
Ciencias Biológicas y de la Salud
Presente

La que suscribe Lyssia Castellanos Tapia alumna con número de matrícula 2163802320, del doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación: La mezcla de ácidos grasos de tipo mediterráneo induce protección celular en hepatocitos con sobrecarga de lípidos en un modelo murino de esteatosis inducido con una dieta tipo a desarrollar en el departamento de ciencias de la salud, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Lyssia Castellanos Tapia
Nombre completo y firma

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma metropolitana pertenece al Programa Nacional de posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, Clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Este trabajo estuvo apoyado por el Instituto Nacional de Medicina Genómica con No. de dictamen 06/2016/I. Cátedra Nestlé-INMEGEN y CONACYT: Fronteras de la ciencia 1320 y CB-252942. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Los miembros del jurado designados por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada “La mezcla de ácidos grasos de tipo mediterráneo induce protección celular en hepatocitos con sobrecarga de lípidos en un modelo murino de esteatosis inducido con una dieta Western”, que presenta Lyssia Castellanos Tapia con fecha de examen el 9 de diciembre del 2020.

MIEMBROS DEL JURADO



Presidenta

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento de Ciencias de la Salud
Salud
Unidad de Investigación Transnacional
Metropolitana-I
Universidad Autónoma Metropolitana- I
Ciudad de México



Secretaria

Dra. Roxana Uri Miranda
Departamento de Ciencias de la
Universidad Autónoma
Ciudad de México



Vocal

Dra. Natalia Nuño Lámbarri Labra
Fundación Clínica Médica Sur
Metropolitana-I
Ciudad de México



Vocal

Dr. Ivan Uriel Bahena Ocampo
Universidad Autónoma
Ciudad de México

COMITÉ TUTORAL

Director. Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana
Teléfono. 2227109255 Correo. legq@xanum.uam.mx

Co- directora. Dra. María Elizabeth Tejero Barrera
Laboratorio de Nutrigenómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica
Teléfono 53501974 correo etejero@inmegen.gob.mx.

Asesora. Dra. Diana Ivette Aparicio Bautista
Adscripción Unidad de Proteómica Médica
Teléfono 53501900. Correo daparicio@inmegen.gob.mx.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Este doctorado se lo dedico, muy especialmente, a mi papa por el apoyo moral y por su capacidad de ver la vida de una manera tan optimista, a pesar de las circunstancias tan fuertes que tuvimos que pasar.

Le agradezco a todos las personas que han llegado a mi vida y con las que he me han hecho ver que los deseos se cumplen con trabajo y dedicación. Gracias a mi familia tios, primos, hermanos y mama. A mis alumnos que con mucho entusiasmo participaron, se apropiaron y creyeron en este proyecto, gracias a su dedicación este proyecto pudo salir: Erika Kantun, Ethel Salazar, Miguel Angel Pulido, Adaline Valadez y Santiago Castro, muchas gracias por ser parte de este proyecto; A los integrantes del INMEGEN que me apoyaron en las técnicas, y muy especialmente el apoyo que recibí del Dr Quiroz y su grupo.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

La enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD) persiste como uno de los principales desordenes hepáticos a nivel mundial. Está ampliamente aceptado que es el tipo de lípido, más que la cantidad depositada en las células lo que determina el daño celular. El colesterol y los ácidos grasos libres saturados son lípidos nocivos que se acumulan, sin embargo, existen algunos lípidos valiosos que podrían contrarrestar los efectos de aquellos con propiedades nocivas. Gran parte de este conocimiento surge de estudios que investigan el efecto de un solo ácido graso, no obstante, la combinación de ácidos grasos, tal y como se obtiene en la dieta, no se han abordado de manera adecuada. En el presente trabajo, nos enfocamos en averiguar el efecto celular de dos mezclas diferentes de ácidos grasos, una con una alta proporción de ácidos grasos saturados y otra con alta proporción de ácidos grasos insaturados (tipo Mediterráneo) en un modelo celular con esteatosis. Se trataron hepatocitos primarios de ratones alimentados con una dieta Western o tipo occidental (dieta alta en grasas y carbohidratos) con ambas mezclas de ácidos grasos durante 24 h. Los datos obtenidos muestran claramente que solo la mezcla con alto contenido de ácidos grasos insaturados indujo una disminución del contenido de triglicéridos (47,5%) y colesterol (59%) en los hepatocitos esteatósicos mediante la protección celular asociada a la disminución de EROS y daño oxidante. En cambio, la mezcla de ácidos grasos mayoritariamente saturados no mostró efectos, conservando altos niveles de colesterol, triglicéridos y daño oxidante. En conclusión, los resultados muestran que la mezcla de ácidos grasos de tipo mediterráneo ejerció protección celular para la

esteatosis al disminuir los triglicéridos, el colesterol, el contenido de EROS y el daño oxidante.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease remains as one of the main liver disorders worldwide. It is widely accepted that is the kind of lipid, rather than the amount deposited in the cells that determines cell damage. Cholesterol and saturated free fatty acids are deleterious lipids when accumulated but, in contrast, there are some valuable lipids that could counteract those with harmful properties. Much of this knowledge arises from studies using a single fatty acid, but the effects of a combination of fatty acids, as obtained by diet has been poorly addressed. In the present work, we were focused to figure out the cellular effect of two different mixes of fatty acids, one with high proportion of saturated fatty acids, and another one with high proportion of unsaturated fatty acids (Mediterranean-like) in a cellular model of steatosis. Primary mouse hepatocytes from animals fed with a western diet (high fat and carbohydrates diet), were treated with both mixes of fatty acids for 24 h. Our data clearly show that only the high unsaturated fatty acid mix induced a decrease in triglycerides (47.5%) and cholesterol (59%) content in steatotic hepatocytes mediating cellular protection associated to the decrement of ROS and oxidative damage. The mixture of high saturated fatty acids exhibited no effects, preserving high levels of cholesterol and triglycerides and oxidative damage. In conclusion, our results show that Mediterranean-like mix of fatty acids exerts cellular protection in steatosis by decreasing triglycerides, cholesterol, ROS content and oxidative damage.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Enfermedad hepática no alcohólica	1
1.3 Estrés del retículo endoplásmico.....	3
1.4 Daño por estrés oxidante.....	4
1.5 Efecto de una dieta alta en grasas en la NAFLD	5
1.6 Efecto de la dieta tipo Mediterranea en la NAFLD	7
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivos específicos	11
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	12
5.1 Animales y dieta	12
5.2 Materiales y Métodos.....	12
5.2.1 Cultivo primario de hepatocitos	12
5.2.2 Tratamientos	14
5.2.3 Pruebas de funcionalidad hepática	14
5.2.4 Acumulación de ácidos grasos.....	15
5.2.5 Determinación del contenido de triglicéridos (TG)	15
5.2.6 Determinación del contenido de colesterol por el método de Oftaldehido	16
5.2.7 Funcionalidad celular por MTT	16
5.2.8 Determinación de especies reactivas de oxígeno (EROS).....	16
5.2.9 Oxidación de lípidos	17
5.2.10 Western blot.....	17
5.2.11 Obtención de proteínas del medio	18

5.2.12	Análisis de espectrometría de masas/ masas por cromatografía líquida (LC-MS/MS).....	18
5.2.13	Análisis y búsqueda de datos proteómicos	19
5.2.14	Análisis estadístico.....	20
6.	RESULTADOS.....	21
6.1	La dieta Western induce esteatosis y daño hepático	21
6.2	La dieta Western induce sobrecarga de lípidos en los hepatocitos	22
6.3	Efecto de las mezclas de ácidos grasos en cultivo primario de hepatocitos.....	24
6.4	La mezcla mediterránea de ácidos grasos mejora la funcionalidad celular y disminuye el daño oxidante	25
6.5	Efecto de las mezclas de ácidos grasos en la respuesta inflamatoria y estrés de retículo endoplásmico en hepatocitos.	28
6.6	Identificación de proteínas en el medio de cultivo de hepatocitos primarios de ratón bajo tratamiento con mezclas de ácidos grasos.	30
6.7	Proteínas identificadas en el secretoma	32
7.	DISCUSIÓN	38
8.	CONCLUSIONES.....	47
9.	REFERENCIAS	48
10.	ANEXOS.....	54

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El hígado es uno de los principales órganos del cuerpo que se encarga de diversos procesos fisiológicos, tales como: metabolismo de lípidos, colesterol, carbohidratos, soporte inmunológico, control endócrino, detoxificación de endo y xenobioticos y la síntesis de sales biliares (Trefts, Gannon, & Wasserman, 2017). Además, de ser el principal órgano secretor en la producción de la mayoría de las proteínas del plasma, entre las que incluyen: hormonas, proteínas acarreadoras, apolipoproteínas, factores de la coagulación y fibrinólisis.

El hígado está conformado por varios tipos celulares de diferente origen embrionario que incluyen: células epiteliales biliares, estelares, de Kuffer, sinusoidales endoteliales y hepatocitos. Estas últimas conforman el principal tipo celular del hígado (Jungermann & Katz, 1989).

Debido a sus diversas funciones, el hígado se encuentra constantemente bajo agresiones causando alteraciones en las funciones normales del órgano, como por ejemplo el metabolismo de lípidos, el cual se lleva a cabo en los hepatocitos y comienza con el aumento en la acumulación de triglicéridos (TG) asociado al desarrollo de la enfermedad hepática (Kuntz, 2006).

1.2 Enfermedad hepática no alcohólica

Una de las enfermedades más comunes en el hígado en personas que consumen menos de 10-20 g de alcohol al día, es la enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés). Desde hace algunos años, varias organizaciones de salud la

han considerado como parte de la definición del síndrome metabólico, cuya condición es asociada a la obesidad, resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia (Byrne & Targher, 2015; Tiniakos, Vos, & Brunt, 2010).

Por otro lado, la esteatosis es una condición que se ha establecido como una de las principales características de la NAFLD. Esta se define como un aumento en la acumulación de lípidos en forma de vesículas dentro del citoplasma de los hepatocitos, mayor del 5%. Las principales formas de lípidos que se forman en las vesículas de grasa son triglicéridos (TG), los cuales constan de 3 ácidos grasos unidos por un glicerol. En un estado normal, los TG en los hepatocitos se obtiene a través de tres vías: tejido adiposo (60%), lipogénesis de novo, (30%) y TG de la dieta que se transportan a través de los quilomicrones al hígado, cuya contribución es del 15-20% (Hodson & Gunn, 2019). Hasta ahora se sabe que el aumento en la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos aumenta diversas vías metabólicas, pero una de las principales es la lipogénesis de novo, la cual contribuye con el desarrollo de la esteatosis hepática (Y. Wang, Viscarra, Kim, & Sul, 2015).

No obstante, la dieta, también ha sido considerada como uno de los principales factores desencadenantes de la formación de esteatosis. Específicamente, el exceso de calorías en forma de ácidos grasos saturados y carbohidratos han sido los principales desencadenantes del daño metabólico (Green & Hodson, 2014; Musso, Gambino, & Cassader, 2009). El exceso de ácidos grasos que provienen de la lipogénesis de novo, así como del tejido adiposo desencadenan lipotoxicidad en los hepatocitos. La lipotoxicidad se establece cuando los lípidos activos formados a partir de la síntesis de ácidos grasos producen: colesterol libre, lípidos complejos,

intermediarios de la síntesis de TG, tales como DAG (diacil gliceroles), ceramidas, entre otros (Musso, Cassader, Paschetta, & Gambino, 2018). Estos intermediarios lipídicos se les ha asociado con el desarrollo de estrés oxidante y estrés del RE (retículo endoplásmico), apoptosis e inflamación, mecanismos del paso de NAFLD a esteatosis no alcohólica (NASH).

La historia natural de la progresión de la enfermedad hepática consta de una variedad de condiciones metabólicas que van desde la NAFLD, pasando por la NASH (esteatohepatitis) y finalmente cirrosis hepática. Anteriormente, la teoría de dos daños explicaba que la esteatosis era una condición de vulnerabilidad para desencadenar un estado de inflamación que podía provocar fibrosis y cirrosis, desarrollando así una etapa más avanzada de la enfermedad, la NASH (Buque, Aspichueta, & Ochoa, 2008). Aunque esta teoría proponía que la esteatosis y la resistencia a la insulina desencadenaban la progresión a NASH, actualmente se sugiere que la NASH es una consecuencia de múltiples condiciones que actúan en paralelo como factores genéticos, metabolismo anormal de lípidos, estrés oxidante y del estrés del RE, disfunción mitocondrial, respuesta alterada del sistema inmune y un desbalance en la microbiota intestinal (Kutlu, Kaleli, & Ozer, 2018; Nouredin & Sanyal, 2018).

1.3 Estrés del retículo endoplásmico

La lipotoxicidad generada en los hepatocitos durante la esteatosis puede desencadenar estrés del RE en el hígado. El RE es el principal sitio en donde se lleva a cabo el almacén de calcio, metabolismo de carbohidratos, síntesis y plegado de proteínas y síntesis de lípidos, cuyas enzimas están localizadas en las membranas del

organelo. Además de ser una de las principales vías secretoras de proteínas. El estrés del RE se desencadena cuando hay un aumento de proteínas mal plegadas en el RE. Este aumento provoca la activación del sistema de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), el cual activa tres sensores localizados en la membrana del RE. El factor PERK-eIF2 α (factor de iniciación en la traducción en eucariotas), ATF6 (factor activador de la transcripción 6) e IRE1 (enzima requeridora de inositol 1). El sistema UPR es mantenido en estado inactivo a través de chaperonas y de la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) que están unidas a la membrana del RE. Cuando ésta inmunoglobulina se disocia de la membrana se inicia la señalización conducente a detener la traducción de los mRNA con la disminución del ensamblado de los ribosomas. La señalización de UPR comienza con la activación de IRE1 α , que tiene una actividad dual de cinasa serina/treonina y endoribonucleasa, que genera la forma activa de Xbp1s regulando la expresión de genes que aumentan la capacidad de plegamiento, degradación y secreción de proteínas. Seguido de la activación de ATF6 la cual produce un factor de transcripción que media la respuesta adaptativa al plegamiento de las proteínas regulando el control en la calidad de las proteínas (Han & Kaufman, 2016; Song & Malhi, 2019). El sistema UPR a su vez también regula la homeostasis del metabolismo de lípidos con la activación de diversas vías regulando la lipogénesis, esteatosis hepática y la secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Han & Kaufman, 2016).

1.4 Daño por estrés oxidante

Otro importante efecto del exceso de ácidos grasos en los hepatocitos es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) que desencadena estrés oxidante. El estrés oxidante se define como un desbalance entre la producción de EROS y las defensas antioxidantes que desencadena una disrupción en la señalización redox y daño molecular (Ore & Akinloye, 2019). Las EROS son sustancias que contienen O_2 que al ser químicamente reducidos produce radicales libres como el radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrogeno, lipoperóxidos, entre otros. En condiciones normales, los ácidos grasos son oxidados a dióxido de carbono y agua para producir energía y reducir el contenido de lípidos en los hepatocitos. La concentración de EROS en estas condiciones es mínima y su concentración puede ser efectivamente controlada por el sistema antioxidante. Cuando las concentraciones de EROS son altas, la célula no puede remover o neutralizar estos productos. Este aumento en las concentraciones de EROS puede inducir muerte celular en los hepatocitos por la activación de vías de señalización específicas e inducir la peroxidación de lípidos.

El estrés en las células hepáticas se da a partir del aumento en los niveles de ácidos grasos principalmente de la transferencia de los ácidos grasos de cadena larga a la vía oxidativa en la mitocondria. En ésta las reacciones oxidantes convierten los cofactores NADH y FADH a NAD y FAD lo cual libera electrones en exceso y producen EROS que se acumulan y hacen que el sistema antioxidante sea incapaz de metabolizar (Takaki, Kawai, & Yamamoto, 2013).

1.5 Efecto de una dieta alta en grasas en la NAFLD

Diversos estudios experimentales en roedores han utilizado dietas altas en grasas para inducir NAFLD y NASH para simular el desarrollo de esta enfermedad en humanos. Algunos de los efectos que han mostrado este tipo de dietas ha sido el desarrollo de esteatosis hepática, hinchamiento en hepatocitos, obesidad e inflamación lobular, así como resistencia a la insulina (Luo et al., 2016; Machado et al., 2015; Van Herck, Vonghia, & Francque, 2017). Sin embargo, al parecer el consumo de grasa en sí no es suficiente para inducir el desarrollo de etapas mas tardías de la enfermedad (Machado et al., 2015).

El uso de dietas altas en grasas en animales de experimentación se ha limitado debido a su poca similitud con el desarrollo de la enfermedad hepática en humanos, no obstante, su uso se ha transformado con otro tipo de dietas modificando su contenido nutrimental. Así, una de estas dietas modificadas, es la dieta Western, llamada así, por tener los nutrimentos más consumidos en los países desarrollados (Nazni, 2014). Las características de esta dieta son: una alta cantidad de carbohidratos simples (mayor del 30%), así como de grasa saturada y colesterol. Esto debido a el alto consumo de alimentos industrializados y procesados que se consumen en países desarrollados debido al cambio en los estilos de vida que han provocado el aumento en el consumo de ácidos grasos saturados (Mancini et al., 2015; "Pianeta Nutrizione kids: international pediatric conference on food, physical activity, growth and well-being : Milan, Italy. 25-27 June 2015," 2016; Wellington et al., 2019).

Una importante revisión sistemática encontró que en 18 ciudades de 27 países el 50% de la población consumía más del 10% de ácidos grasos saturados, que de acuerdo

con las recomendaciones internacionales excede su ingesta para poder prevenir enfermedades crónicas (Harika, Eilander, Alsema, Osendarp, & Zock, 2013).

Los ácidos grasos saturados son definidos como ácidos carboxílicos con varias cadenas de carbonos que un solo enlaces entre los átomos de carbono. Estos pueden ser sintetizados endógenamente o se pueden adquirir a partir de la dieta. Algunos de los ácidos grasos saturados más abundantes en los tejidos y plasma de humanos son el ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0) y ácido mirístico (14:0) (Skeaff, Hodson, & McKenzie, 2006). Estos se encuentran en alimentos como las carnes y productos lácteos. Sin embargo, diversas organizaciones han denunciado que el aumento en el consumo de alimentos industrializados como galletas, comida rápida y harinas refinadas, ha propiciado el aumento del consumo de ácido palmítico y mirístico en la dieta (Voelker, 2011). Estudios con el perfil de ácidos grasos tanto en plasma como en hígado de personas y animales de experimentación con NAFLD encontrarán que son el ácido mirístico y palmítico los ácidos saturados más asociados a esta enfermedad (X. Wang, Cao, Fu, Guo, & Zhang, 2011; Yamada et al., 2015).

1.6 Efecto de la dieta tipo Mediterranea en la NAFLD

La dieta de tipo Mediterránea se ha considerado una dieta anti-diabética y anti-inflamatoria por diversas publicaciones científicas (Deligiannidou et al., 2019; Widmer, Flammer, Lerman, & Lerman, 2015). Esta dieta llamada así por ser una dieta que se consume en los países de la región Mediterránea la cual consiste en un alto consumo de vegetales, pasta, vino, pescado y semillas de origen vegetal como las nueces, almendras y aceite de olivo. Muchos de estos alimentos contienen una gran cantidad

de sustancias antioxidantes y aceites con omega 3 y oléico. El consumo de este tipo de dieta en pacientes con NAFLD y NASH mejora las condiciones metabólicas causadas por esta enfermedad (Ryan et al., 2013). Además, en personas que consumieron este tipo de dieta de manera habitual por 1 año las concentraciones en plasma de ácidos omega 3 y oleico aumentaban y las del ácido palmítico disminuían (Mayneris-Perxachs et al., 2014).

Los ácidos grasos omega 3 son un grupo de ácidos grasos que se dividen en: ácido docosahexaenoico (DHA 22:6w3), eicosapentanoico (EPA 20:5w3) y ácido alfa linolénico (ALA 18:3). Estos ácidos grasos se clasifican en el grupo de los poliinsaturados por tener dos o más dobles enlaces en sus cadenas que van de 18 a 22 carbonos. Debido a su importancia tanto biológica como estructural se ha considerado a el grupo de los omega 3 como ácidos grasos esenciales, es decir se requieren consumir en la dieta.

Por otra parte, el ácido oleico (18:1) es un ácido graso monoinsaturado cuya estructura contiene una larga cadena de carbonos con un solo enlace. El ácido oléico forma parte de las de la mayoría de las membranas de todo el organismo tanto en humanos como en mamíferos (Bermudez et al., 2011). Se encuentra en forma abundante en el aceite de olivo el cual se consume en grandes cantidades en la dieta Mediterránea. Los estudios in vitro han encontrado que este ácido puede revertir los efectos causado por el ácido palmítico en hepatocitos. Como lo demuestra Chen y col; en ratones y hepatocitos que la estimulación con la mezcla de ácido palmítico y oleico aminoraban y revertían la lipotoxicidad, inflamación y estrés del RE causado por el ácido palmítico (X. Chen, Li, et al., 2018). En humanos, el consumo de ácido oléico en personas con

NAFLD disminuye la esteatosis e inflamación (Assy, Nassar, Nasser, & Grosovski, 2009; Hussein et al., 2007).

Se ha encontrado que la estimulación con los ácidos omega 3 tiene un efecto protector en la formación de esteatosis y antiinflamatorio en hepatocitos (Albracht-Schulte et al., 2019; Kang et al., 2018; Scorletti & Byrne, 2013). Estudios *in vitro* con hepatocitos tratados con ácidos omega 3 han mostrado una menor formación de depósitos de lípidos a través de la disminución en la expresión de genes lipogénicos (Kaur, Cameron-Smith, Garg, & Sinclair, 2011).

Si bien, los estudios con hepatocitos han encontrado que la estimulación con ácidos grasos saturados desencadena alteraciones metabólicas, cambios moleculares, similares a la enfermedad hepática en humanos, existe cada vez más información acerca de los efectos diferenciales dependiendo del tipo y concentración del ácido graso, como se demostró en el estudio de Geng y col; que al estimular con varios tipos de ácidos grasos saturados en concentraciones fisiológicas encontraron que los efectos variaban de acuerdo con el tipo de ácidos graso (Geng et al., 2013). Otro importante estudio con hepátocitos mostró que la adición de varias proporciones de ácidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados regulaba la expresión de genes de las vías de síntesis de ácidos grasos de diferente manera a la proporción y concentración (L. Chen et al., 2014). Estos resultados demuestran que el efecto de los ácidos grasos en células hepáticas depende más del tipo de ácido graso y su concentración. Es por eso por que el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de dos proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados en hepatocitos con una sobrecarga de lípidos en ratones alimentados con una dieta western.

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad hepática no alcohólica es considerada una de las enfermedades con mayor incidencia asociada a la obesidad en nuestro país. El desarrollo de esta enfermedad va de esteatosis a esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis. Siendo las primeras etapas de esta enfermedad, como la esteatosis, reversibles al daño. La esteatosis es una condición la cual se ha encontrado es generada por el aumento en la entrada de ácidos grasos saturados en la célula. Este aumento de ácidos grasos en la célula provoca lipotoxicidad la cual es asociada al desarrollo de otras condiciones metabólicas como: inflamación, apoptosis, estrés oxidante y del estrés del RE.

La dieta ha sido uno de los principales factores asociados a la prevención o al desarrollo de esteatosis y enfermedad hepática. A este respecto, las dietas altas en grasa se han utilizado para generar modelos en animales de experimentación con NAFDL y NASH. Una de estas, es la dieta Western, llamada así por tener los componentes nutrimentales de una dieta con patrones alimentarios de países desarrollados con altos consumos de alimentos procesados. Por otro lado, se ha encontrado que las personas que consumen una dieta de tipo Mediterránea tienen una menor ocurrencia de enfermedades crónicas y menor incidencia de enfermedad hepática. Esto se ha evidenciado por el alto consumo de diversas sustancias entre ellas la de los ácidos grasos: oleico y omega 3. Aunque en sus consumos también incluyan alimentos que contiene ácidos grasos saturados. Hasta ahora, los estudios del efecto de los ácidos grasos en hepatocitos han sido, la mayor parte de ellos, con los ácidos en forma aislada y no en concentraciones fisiológicas. Debido a esto resulta de gran importancia estudiar los efectos de los ácidos grasos en mezclas, con una

proporción similar a la que consume en una dieta, sobre células con sobrecarga de lípidos.

3. HIPÓTESIS

El cambio en la proporción de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados inducirá protección a hepatocitos con sobrecarga de lípidos inducida por una dieta tipo Western.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar el efecto de dos mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados en un modelo celular con sobrecarga de lípidos inducido por una dieta alta en grasa.

4.2 Objetivos específicos

- ◆ Comparar el efecto de dos mezclas de ácidos grasos sobre la acumulación de lípidos en hepatocitos obtenidos de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y una dieta normal (Chow).
- ◆ Evaluar el efecto de las dos mezclas de ácidos grasos en la respuesta al estrés oxidante.
- ◆ Evaluar el comportamiento de proteínas relacionadas a la inflamación y de estrés de retículo endoplásmico por la administración de las mezclas de ácidos grasos.
- ◆ Identificar las proteínas secretadas diferencialmente por el estímulo de las dos mezclas de ácidos grasos en hepatocitos de ratón.

- ◆ Analizar las vías celulares alteradas por la estimulación de las 2 mezclas de ácidos grasos en cultivo primario de hepatocitos.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Animales y dieta

Todos los animales fueron tratados de acuerdo con los lineamientos de cuidado y manejo de animales de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 NIH y la autorización de la comisión divisional de ética de la DCBS AUM-I. Se utilizaron 20 ratones de 8-10 semanas de edad de la cepa BALB/c, los cuales fueron separados en dos grupos. El primer grupo fue alimentado con una dieta tipo Western (ssniff EF R/M acc TD88137 mod, catalog # E15721-34, 10 mm pellets. ssniff Spezialdiaten GmbH, Soest, Germany) por 7 días. El segundo grupo recibió una dieta control (ssniff EF R/M CD88137 Control, catalog #E15720-04, 10 mm pellets), con los mismos micronutrientes contenidos en la dieta Westen, excepto que los componentes aterogénicos fueron removidos. Todos los animales recibieron agua y dieta ad libitum.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Cultivo primario de hepatocitos

Los hepatocitos fueron obtenidos de acuerdo con la metodología previamente publicada (Gomez-Quiroz et al., 2008). De manera breve se anestesió el animal con Avertina, el hígado se perfundió con 30 mL de solución salina balanceada Hanks (HBSS) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , con HEPES 10 mM, pH 7.4, etilglicol (β -aminoetil1-eter)-N,N,N,N ácido tetraacético (EGTA) 75 mM, a 37 °C, con una velocidad de perfusión de 3.8 mL/min. En el segundo paso de perfusión se utilizaron 50 mL de colagenasa

tipo I al 0.1% en medio Williams con NaHCO₃ 25mM y HEPES 10 mM, pH 7.4 a una temperatura de 37°C, en esta fase se recuperó el hígado para obtener los hepatocitos en medio de cultivo.

El hígado perfundido se homogenizó en medio Williams suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), antibiótico y antimicótico (medio de adhesión). La suspensión celular se centrifugó en un gradiente de densidad con Percoll. El sobrenadante se retiró y el botón contenido se resuspendió en medio de adhesión. Las células viables fueron sembradas a una densidad celular de 1.3 x 10⁶ células/cm² las cuales se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Para determinar la viabilidad se realizó un conteo con azul de tripano.

Los hepatocitos primarios fueron tratados con 2 mezclas de ácidos grasos, las cuales contenían los mismos ácidos grasos, pero en proporciones diferentes. La mezcla 1 contenía una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados y menor de ácidos grasos saturados (AGMP), mientras que la mezcla 2 tuvo mayor proporción de ácidos grasos saturados y menor de poliinsaturados y monoinsaturados (AGS), como se muestra en la tabla 1.

Tipo de ácido graso	Mezcla AGMP	Mezcla AGS	Catálogo
	%	%	
Acido Palmítico	57	60	P0500
Acido Mirístico	0.5	1.5	M3128
Acido Palmitoléico	1	3	P9417
Acido Oléico	27	23	O1008
Acidos grasos n-3	14.5	6.5	GNC

Tabla 1.- Composición de las mezclas de ácidos grasos.

5.2.2 Tratamientos

Las mezclas de ácidos grasos fueron administradas al cultivo celular en una concentración de 100 μ M de acuerdo con la composición reportada en plasma de participantes expuestos a una dieta con un alto contenido de grasas saturadas y personas que viven en el área del Mediterráneo (Najbjerg et al., 2013) (Saadatian-Elahi et al., 2009), por 24 h. La preparación de las mezclas de ácidos grasos partió de una solución stock a 100 mM de ácido palmítico y mirístico (>99% pureza y adquiridos por Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) disueltos en etanol al 100% a 70°C, mientras que el ácido oléico, palmitoléico n-3: ácido docohexaenoico, (DHA), y el ácido eicosapentaenoico (EPA); (7:2 EPA/DHA, GNC) fueron disueltos en etanol al 100% a 40°C. Previamente, la albúmina (libre de ácidos grasos, SigmaAldrich) fue preparada en medio William a 25 mg/mL, con un pre- calentamiento a 40°C hasta disolvier y filtrar (0.45 μ m). La conjugación de las mezclas de ácidos grasos (2 mM) y la BSA (25 mg/mL) se hizo toda la noche a 40°C, para al final estimular a las células con el conjugado 100 mM AG/BSA (1.25 mg/mL).

5.2.3 Pruebas de funcionalidad hepática

La actividad sérica de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) se detrnaron utilizando un analizador automático de química

clínica (Spotchem EZ, Arkray USA Inc, Minneapolis, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.4 Acumulación de ácidos grasos

La acumulación celular de ácidos grasos se llevó a cabo con la tinción de rojo oleoso (rojo O), la cual es sensible a lípidos neutros (Hernandez et al., 2015). Las células fueron sembradas en cajas de Petri de 35mm, después de los tratamientos fueron lavadas con H₂O deionizada para luego ser fijadas con paraformaldehído por 1 h, tras terminar el periodo fueron teñidas con una solución 0.2% de rojo O (Sigma-Aldrich, Inc) por 4 h para luego ser lavadas. Los núcleos fueron contra-teñidos con hematoxilina, cuyas imágenes fueron obtenidas por micrografía Axioscope microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

5.2.5 Determinación del contenido de triglicéridos (TG)

El contenido de TG se realizó utilizando el ensayo comercial Serum Triglyceride Determination de Sigma-Aldrich (San Louis MO, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en la hidrólisis de los TG en glicerol y ácidos grasos libres por la lipasa. Posteriormente el glicerol producido sufre una serie de reacciones enzimáticas acopladas y genera un producto colorante (quinoneimina) que tiene una máxima de absorbancia de 540nm. El aumento en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra. Las muestras se leyeron a una absorbancia inicial de 540 nm y una segunda lectura a una absorbancia de 540 nm contra la curva patrón, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.6 Determinación del contenido de colesterol por el método de Oftaldehido

Se utilizó una curva patrón de colesterol (0-100 µg/mL). 100 µL del lisado celular y la curva patrón se saponificaron con 200 µL de EtOH-KOH 33% a 60 °C por 30 min. Después se agregaron 600 µL de agua destilada y 2 mL de hexano. Se colectaron 2 alícuotas de un 1mL de la capa superior que contiene el hexano y se puso a secar en Speed Vac (Savant, Cranbury, NJ USA). Enseguida se añadieron 800 µL de una solución de Oftaldehído/acido acético (0.5mg/mL) y se dejó reposar por 1 min. Pasado el tiempo de reposo se añadió 1mL de ácido sulfúrico y la muestra se leyó a una absorbancia de 550 nm. Finalmente, los datos se normalizaron por cantidad de proteína.

La cuantificación de proteína fue determinada con el kit de ácido biciconinico (BCA) (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.2.7 Funcionalidad celular por MTT

La prueba de funcionalidad se hizo a través de la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difineiltretrasodio de bromuro (MTT). Esta técnica se basa en el cambio de coloración del MTT de amarillo a azul por las deshidrogenasas, cuyas lecturas de absorbancia fueron a 570 nm.

5.2.8 Determinación de especies reactivas de oxígeno (EROS)

La determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROS) fue a través del uso de dihidroetidio (DHE, 50 µM) por 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia derivada de DHE fue medida en un Multimodal reader (DTX 880,

Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA) a 520 nm para excitación y 570 nm para emisión como se reportó anteriormente (Salas-Silva et al., 2020).

5.2.9 Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos fue evaluada por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) reportado previamente (Salas-Silva et al., 2020).

5.2.10 Western blot

Se cuantificó la presencia de las proteínas a través de la técnica de Western blot. Se tomaron 80 µg de proteína total por cada tratamiento, las cuales se corrieron en geles desnaturalizantes de acrilamida del 8-15%. Posteriormente, los geles fueron transferidos en una cámara de transferencia semi-seca (BIO-RAD) con un amperaje constante por 1 a 2 hrs, dependiendo de la proteína a transferir. Las membranas transferidas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (cell signaling) seleccionados, ver tabla 2. Para después incubarlos por 1 h con anticuerpos secundarios anti-conejo y ratón. La intensidad de señal de quimioluminiscencia se detectó a través del equipo Chemi Doc XRS (BIO-RAD). Los datos generados de las imágenes fueron analizados a través del Image J, graficados y analizados por el GraphPad Prism v8.

Nombre anticuerpo	Dilución		No de catálogo	Peso Molecular
p-ERK1/2 p44/42	1:500	Mouse	9106	42-44 KDa
ERK	1:1000	Rabbit	9102	42-44 KDa
STAT3	1:1000	Rabbit	Ab32500	88 KDa
p-STAT3 Y705	1:1000	Mouse	Ab76315	88 KDa
p-JNK Thr183/Tyr185	1:500	Rabbit	9271	46-54 KDa
p-eIF2a Ser51	1:1000	Rabbit	3597	38 Kda
ATF6	1:1000	Rabbit	65880	90-100 KDa

Tabla 2.- Lista de anticuerpos usados en el presente trabajo.

5.2.11 Obtención de proteínas del medio

Después de la obtención de los hepatocitos las células funcionales fueron sembradas a una densidad de 1.3×10^6 células/cm² las cuales se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera controlada de CO₂ al 5%. La estimulación con las mezclas de ácidos grasos fue por 24 h en un medio libre de suero. Una vez pasadas las 24 h el medio se filtró con poro de 0.2 µm (Corning 431220) para descartar debris celulares, posteriormente el filtrado se concentró en un filtro Amicon de 3,000 KDa en una mezcla con 25 mM de bicarbonato de amonio (sigma-aldrich), centrifugándolo a 4,000 rpm x 8 h. El extracto fue mantenido a -20 ° C hasta su análisis.

5.2.12 Análisis de espectrometría de masas/ masas por cromatografía líquida (LC-MS/MS)

El análisis de las proteínas provenientes del medio de los hepatocitos fue analizado por el Interdisciplinary Center for Biothecnology Research Proteomics and Mass

Spectrometry, de la Universidad de Florida. El análisis consistió en identificar y cuantificar las proteínas por medio del equipo Orbitrap Fusion (ThermoFisher). Las proteínas fueron concentradas y precipitadas con 10 mL de 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8.0. Cada muestra contenía 30 µg de proteína la cual fue reducida con 40 mM DTT y alquilada con 100 mM de iodoacetamida. La digestión se llevo a cabo con tripsina (enzima con una relación (w/w) de 1:100), y desalada con una columna C-18 de fase sólida (The Nest Group, INC, Southborough, MA). Se utilizó un equipo con disociación de iones por colisión (CID) con cada ciclo de MS/MS Orbitrap Fusion Tribrid Mass Spectrometer system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) con una interfaz ultra-performance Easy-nLC 1200 system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Se utilizó un total de 2 g de proteína que fue colocada en una pre-columna 100 Accail Pepmap (20 mm × 75 µm; 3 µm-C18) para luego ser separada en un PepMap RSLC analytical column (500 mm × 75 µm; 2 µm-C18) y separada a una tasa de 250 nl/min de solvente A (0.1% ácido fórmico), seguido de un incremento lineal de 2% a 40% del solvente B (0.1% ácido fórmico, 80% acetonitrilo) en 225 min. La separación se lleva a cabo incrementando a 98% en 1 min y suspensión de 14 min. La librería del espectro se produce en una resolución de 120,000 a 200 m/z. El espectro de masas se operó en el modo de escaneo de 350 a 2000 m/z.

5.2.13 Análisis y búsqueda de datos proteómicos

El análisis proteómico fue a través de la comparación de la abundancia relativa utilizando el abordaje libre de etiqueta (LFG por sus siglas en inglés). Se utilizó el programa MaxQuant software (version 1.5.8.3) y el sistema de búsqueda Andromeda (version 1.6.6.0) que utilizó Unit prot *mus musculus* database. Los parámetros para el

sistema de búsqueda fueron: carbamidometilación cisteína como modificaciones fijas, acetilación N-terminal y oxidación metionina como modificaciones variables, dos divisiones de proteasas de tripsina permitidas, con una búsqueda de péptidos con una tolerancia de masa permitida 0.07 Da, el principal péptido con una tolerancia de masa 0.006 Da, una tolerancia de masa permitida de 40 ppm, la opción de “match between runs” fue activada y la tasa de falsos fue de 1% a nivel de proteína. El programa Perseus estuvo en combinación con MaxQuant con 4 muestras biológicas por cada grupo. Se analizaron 6 grupos con las proteínas que provenían del medio de hepatocitos primarios de ratón con las dos dietas: Control (dieta Chow) y Western (dieta alta en grasa). Los grupos se dividieron en 6: 3 grupos con dieta Chow: no tratadas (NT), las estimulas con la mezcla AGS y AGMP y 3 en el grupo Western: no tratadas NT y las estimulas con la mezcla AGS y AGMP.

5.2.14 Análisis estadístico

Una proteína fue considerada como diferencialmente secretada con un fold change más alto de 1.5 (FDR=0.05 permutación basada en t-test Student's t). La identificación fue con un mínimo de dos péptidos. El porcentaje de coincidencia a nivel de proteína fue mayor al 93%. La reproducibilidad del análisis de LFQ, el plot scatter y el coeficiente de correlación fue basado en las intensidades de LFQ. El promedio del coeficiente de correlación de Pearson de las réplicas biológicas resultó en 0.91 ± 0.03 .

Los datos se presentan como la media \pm SEM con tres experimentos independientes por triplicado. Las comparaciones en los western blots entre los grupos fueron a través del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con una prueba post hoc Tukey-Kramer.

El nivel de significancia fue de $p < 0.05$. Los datos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism v 8.

6. RESULTADOS

6.1 La dieta Western induce esteatosis y daño hepático

Para evaluar el modelo en ratones alimentados con una dieta tipo Western por una semana, se midió el incremento en el tamaño del hígado. Los resultados muestran que el hígado de los animales alimentados con una dieta Western presentaron coloración pálida y hepatomegalia en comparación con los Chow (Figura 1A y B). Por otra parte, se evaluó el daño hepático a través de las enzimas AST (Figura 1C) y ALT (Figura 1D) en los ratones alimentados con la dieta Western, las cuales aumentaron significativamente sus niveles en comparación con el grupo Chow.

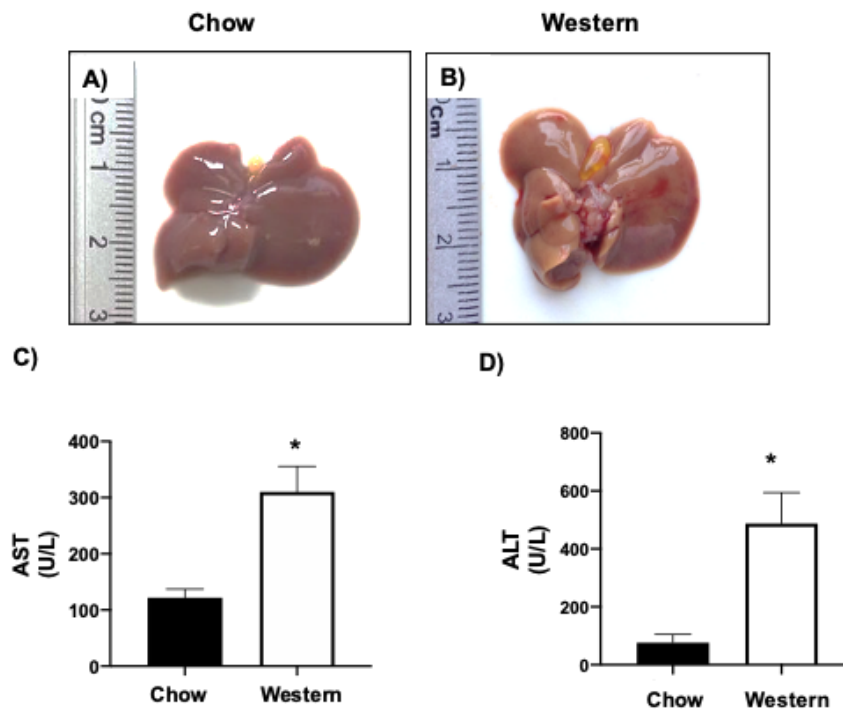


Figure 1.- Efecto de la dieta tipo western induce disfunción hepática y estosis. A) Hígado de ratones alimentados con una dieta Chow B) Hígado de ratones alimentados con una dieta tipo western alta en grasa, C) Actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) y D) Actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST). Cada barra representa la media±EE en al menos 4 ratones diferentes, * $p < 0.01$ vs Chow diet.

6.2 La dieta Western induce sobrecarga de lípidos en los hepatocitos

Para corroborar la sobrecarga lipídica inducida por la dieta Western en los hepatocitos se evaluó el contenido de lípidos neutros por el ensayo de tinción de rojo O. Las imágenes muestran que los hepatocitos Western presentaron mayor acumulación de vesículas lipídicas (Figura 2B) en comparación con las células Chow (Figura 2A). Este aumento de gotas lipídicas se confirmó con la cuantificación de los niveles de TG (Figura 2C) y colesterolos (Figura 2D) presentes en el grupo Western. Los resultados muestran claramente que la dieta Western induce insuficiencia hepática y sobrecarga

de lípidos en el hepatocito, confirmando que estas células representan un buen modelo de estudio de los efectos celulares de la mezcla diferencial de ácidos grasos en hepatocitos esteatósicos.

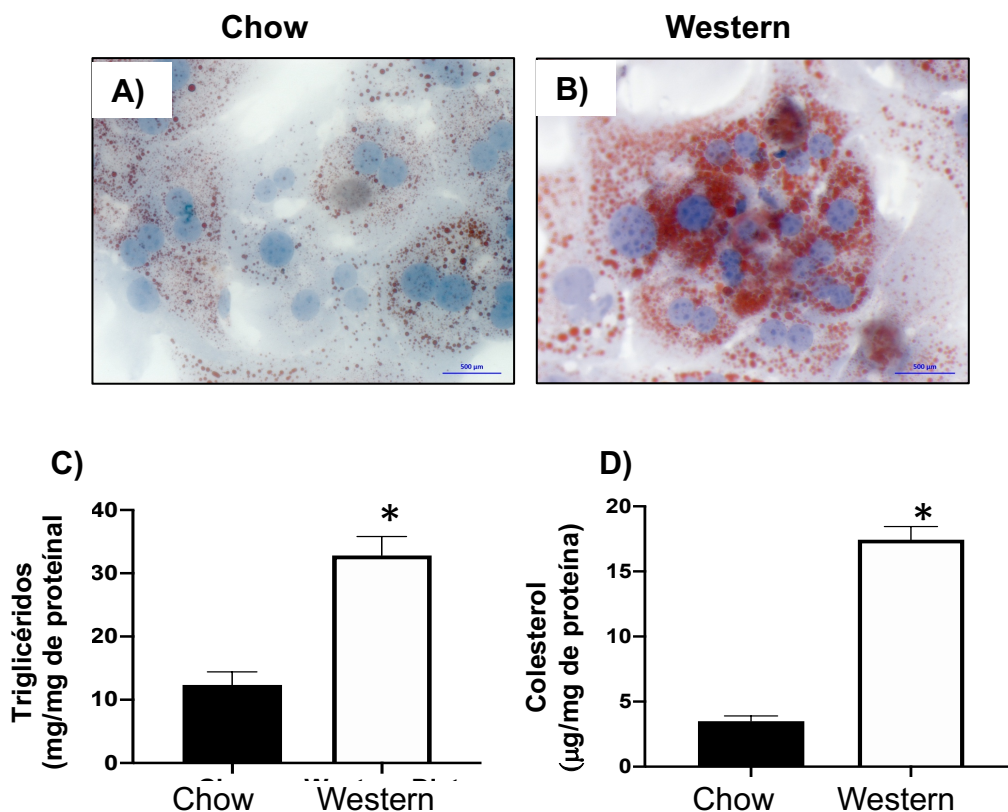


Figura 2.- Los hepatocitos de ratones alimentados con una dieta Western presentan sobrecarga de lípidos. Tinción de rojo O de lípidos neutros. A) Hepatocitos de ratones alimentados con una dieta Chow. B) Hepatocitos de ratones alimentados con una dieta Western, C) Contenido celular de TG, D) Contenido de colesterol total en células hepáticas. Las imágenes son representativas de al menos 4 ratones. Barra de referencia de 500 µM (400x magnificación). Cada barra representa la media \pm SEM * $p < 0.01$ Chow vs Western.

6.3 Efecto de las mezclas de ácidos grasos en cultivo primario de hepatocitos

Se evaluó el efecto con 100 μ M de las mezclas altas en ácidos grasos saturados (AGS) y mono y poliinsaturados (AGMP) por 24 h en cultivo primario de hepatocitos de ratones alimentados con dietas Chow y Western (Figura 3 A-F). Las imágenes muestran que la mezcla AGMP disminuyó la cantidad de lípidos intracelulares en los hepatocitos esteatósicos (Figura 3D) en comparación con el aumento de éstos, inducidos por la dieta western no tratadas (NT) (Figura 3B), sin embargo, no hubo diferencias con la mezcla AGS (Figura 3F). Por otro lado, las células Chow mostraron un discreto incremento en el contenido de lípidos bajo el tratamiento con la mezcla AGMP si se compara con las células Chow no tratadas (NT) (Figura 3C), no obstante, el tratamiento con la mezcla AGS incrementó notablemente el contenido de lípidos (Figura 3E). Este resultado muestra claramente el efecto inducido por el tratamiento con la mezcla mediterránea en hepatocitos esteatósicos. Para ganar más confianza, procedimos a medir bioquímicamente el contenido celular de TG y colesterol. La Figura 3G muestra claramente que el tratamiento con AGMP reduce significativamente 2.1 veces el contenido de TG en los hepatocitos Western, por otra parte, se encontraron hallazgos similares en el contenido de colesterol disminuyendo 1.7 veces con respecto a los hepatocitos esteatósicos (Figura 3H), sin embargo, con la mezcla de AGS no se observó ningún cambio, los niveles de TG y colesterol permanecieron similares a los observados en hepatocitos Western controles.

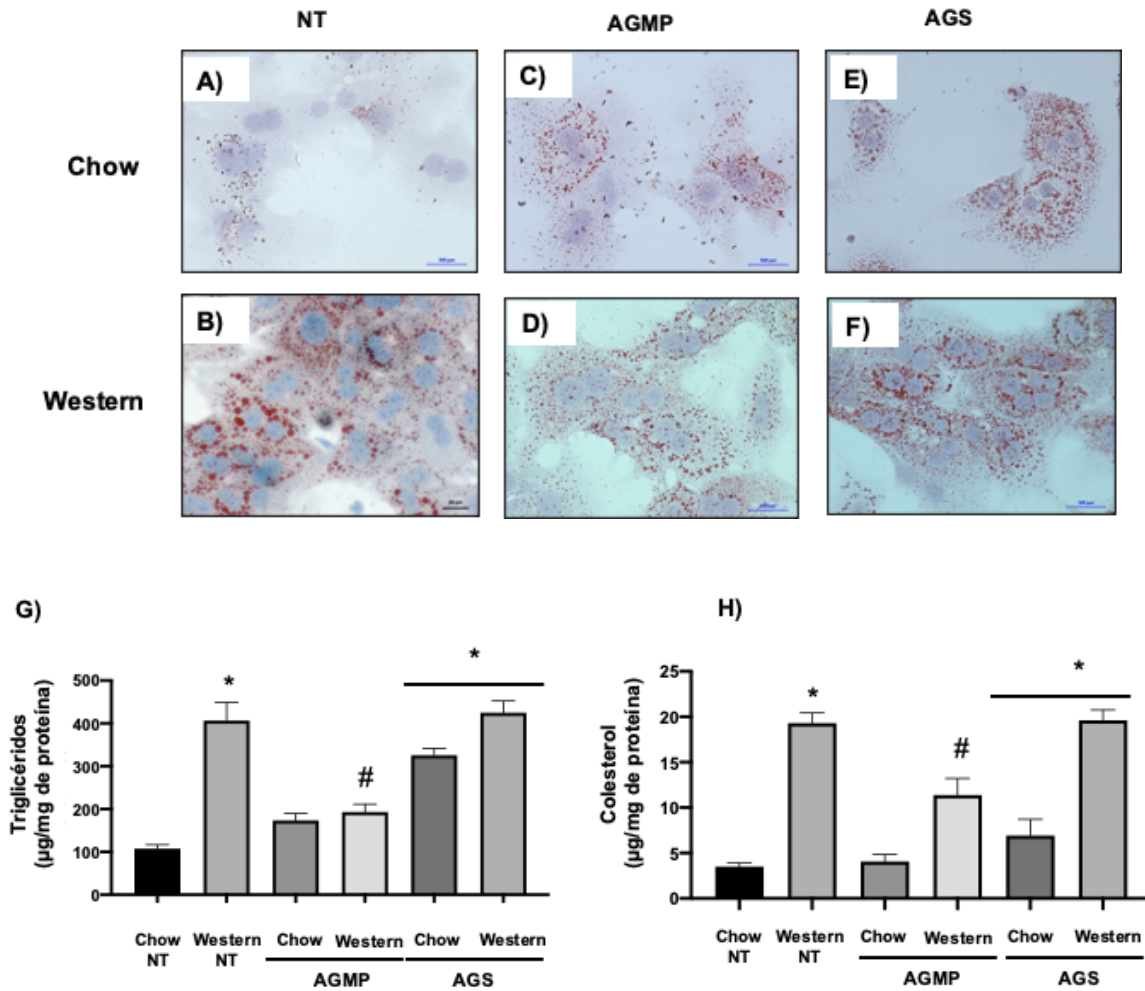


Figura 3.- Efecto de las mezclas de ácidos grasos en hepatocitos esteatósicos. Contenido de lípidos neutros determinado por tinción de rojo O. Hepatocitos primarios de raton alimentado con una dieta Chow A), C) y E); o dieta Western B), D) y F) por 7 días. Las células fueron tratadas o no con una mezcla alta en ácidos grasos mono y poliinsaturados (AGMP) o alta en ácidos grasos saturados (AGS) por 24 h. G) Contenido celular de TG y H) Contenido de colesterol total en hepatocitos. Las imágenes son representativas de al menos 4 ratones. Barra de referencia de 500 µM (400x magnificación). Cada barra representa la media ± SEM de 4 diferentes animales. *p<0.05, #p< 0.05 Chow vs Western.

6.4 La mezcla mediterránea de ácidos grasos mejora la funcionalidad celular y disminuye el daño oxidante

La funcionalidad celular fue evaluada por el ensayo del MTT, el cual mostró una mejora significativa en la función celular en los hepatocitos Western tratados con la mezcla AGMP en comparación con las células Western NT (Figura 4), mientras que la mezcla AGS empeoró la función celular de los hepatocitos Western.

Dado que el estrés oxidante es uno de los principales inductores de daño celular en esteatosis, procedimos a evaluar el contenido de las EROS en células bajo los tratamientos anteriormente descritos. La figura 5A muestra que sólo la dieta indujo un notable incremento de EROS en las células Western comparado con los hepatocitos Chow. La mezcla AGMP redujo significativamente la producción de EROS, mientras que el tratamiento con AGS no indujo cambios significativos en el contenido de EROS en hepatocitos Western, aún más, incrementó las EROS en hepatocitos Chow comparando con las células Chow NT. Estos datos concuerdan con la oxidación de lípidos, un marcador bien aceptado de daño oxidante; la figura 5B muestra que los hepatocitos Western incrementan las TBARS con respecto a las células Chow NT, mientras que la mezcla AGMP las disminuye en hepatocitos Western. De forma interesante la mezcla AGS incrementa las TBARS en las células Chow, sin incremento significativo en los hepatocitos Western, sugiriendo una especie de saturación del daño oxidante.

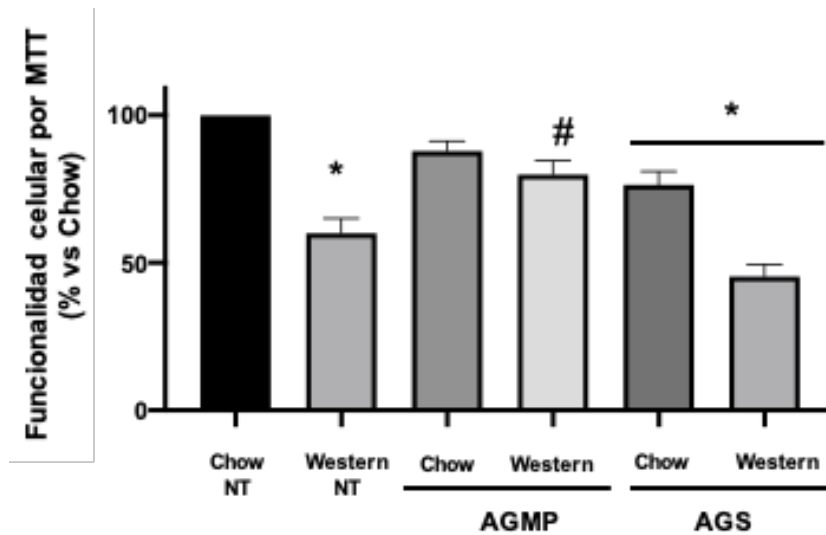


Figura 4. Funcionalidad celular por el ensayo MTT. Hepatocitos Chow y Western tratados con las mezclas altas en ácidos grasos mono y poliinsaturados (AGMP) y saturados (AGS) por 24 h. Cada barra representa la media \pm SEM en al menos 4 diferentes ratones, * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ Chow vs Western.

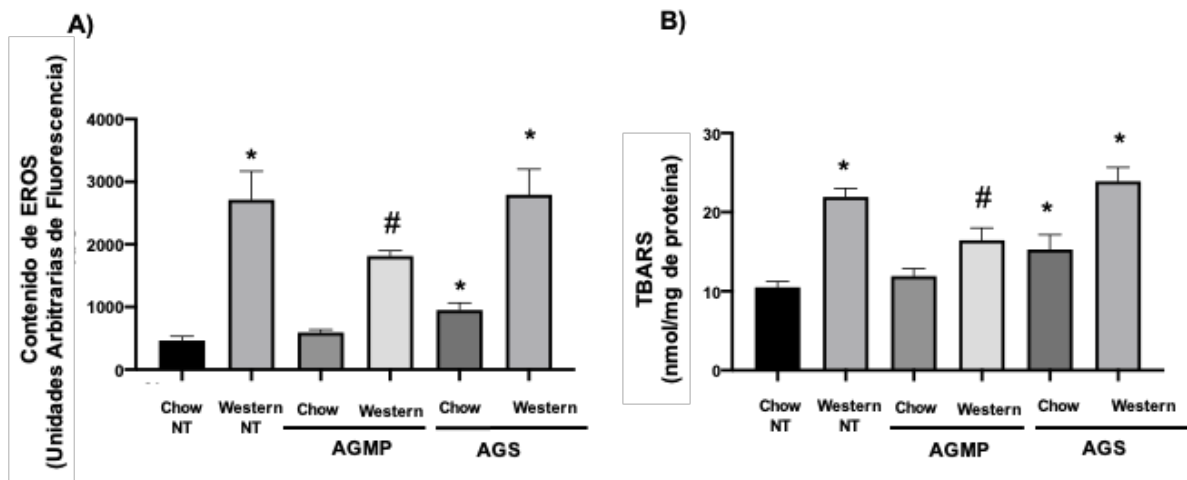


Figura 5.- La mezcla Mediterránea de ácidos grasos protege a los hepatocitos con sobrecarga de lípidos del daño oxidante. A) Contenido de EROS determinado por el radical superóxido por la prueba de dihidroetidio, B) Oxidación lipídica determinada por la generación de TBARS. Cada grupo es representado con la media \pm SEM en al menos 4 diferentes animales, * $p < 0.05$ vs Chow, # $p < 0.05$ vs Western.

6.5 Efecto de las mezclas de ácidos grasos en la respuesta inflamatoria y estrés de retículo endoplásmico en hepatocitos.

Algunos ácidos grasos saturados interfieren con diversas vías de señalización importantes como la inflamación, las cuales se ha visto desencadenan la progresión de esteatosis a esteatohepatitis. Los resultados muestran que algunas proteínas involucradas en el proceso inflamatorio como como JNK y STAT3 resultaron incrementadas por la simple presencia de la dieta Western (Figura 6). p-JNK incrementó su activación, sin significancia estadística, bajo el estímulo de las mezclas de ácidos grasos en hepatocitos Western, este efecto se observó a la inversa para ERK. Por otra parte, STAT3 parece ser mayor en células Chow bajo el tratamiento con AGS, caso contrario a lo observado en células Western, esto podría deberse a mecanismos de adaptación previamente activados durante el consumo de la dieta Western.

Debido a que la sobrecarga lipídica se ha visto asociada al desarrollo de estrés de retículo endoplásmico, procedimos a evaluar las proteínas involucradas en este proceso, donde no se encontraron diferencias significativas en el contenido de ATF6. No obstante, se observó una ligera disminución en el contenido de p-eIF2 α con la mezcla AGS en el grupo Western, y en ambos tratamientos en el grupo Chow (Figura 7). Cabe resaltar que la fosforilación de eIF2 α interfiere y atenúa la carga de proteínas previniendo el ensamblado con los ribosomas, dando como resultado menor síntesis de proteínas y por lo tanto estrés en este organelo.

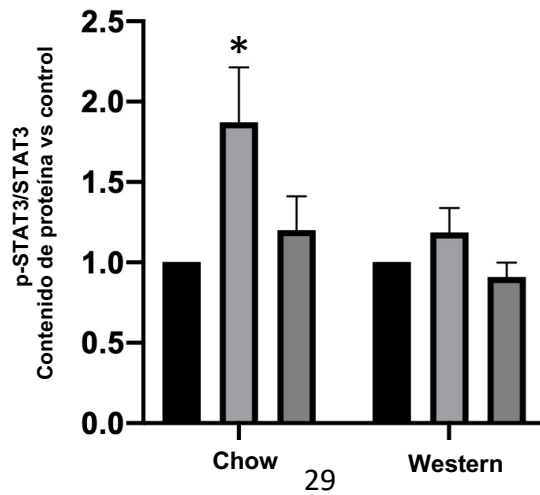
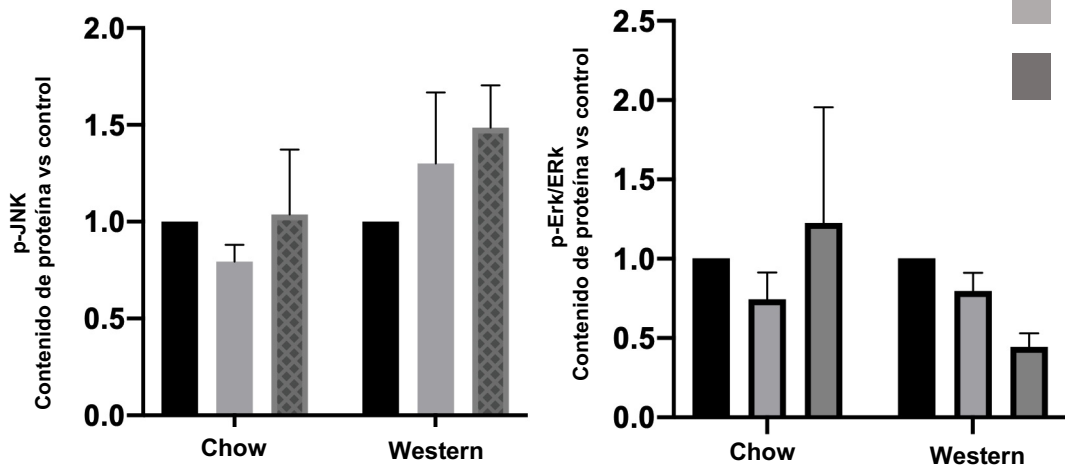
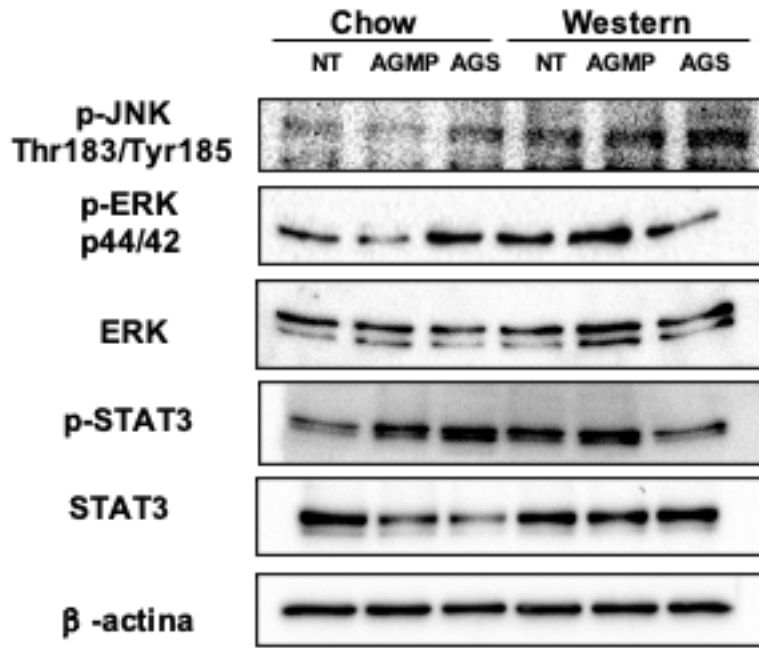


Figura 6 .- Cambios en el contenido de proteínas involucradas en el proceso inflamatorio. Las gráficas representan media \pm SEM con tres réplicas en cada tratamiento. * $p < 0.05$ vs control.

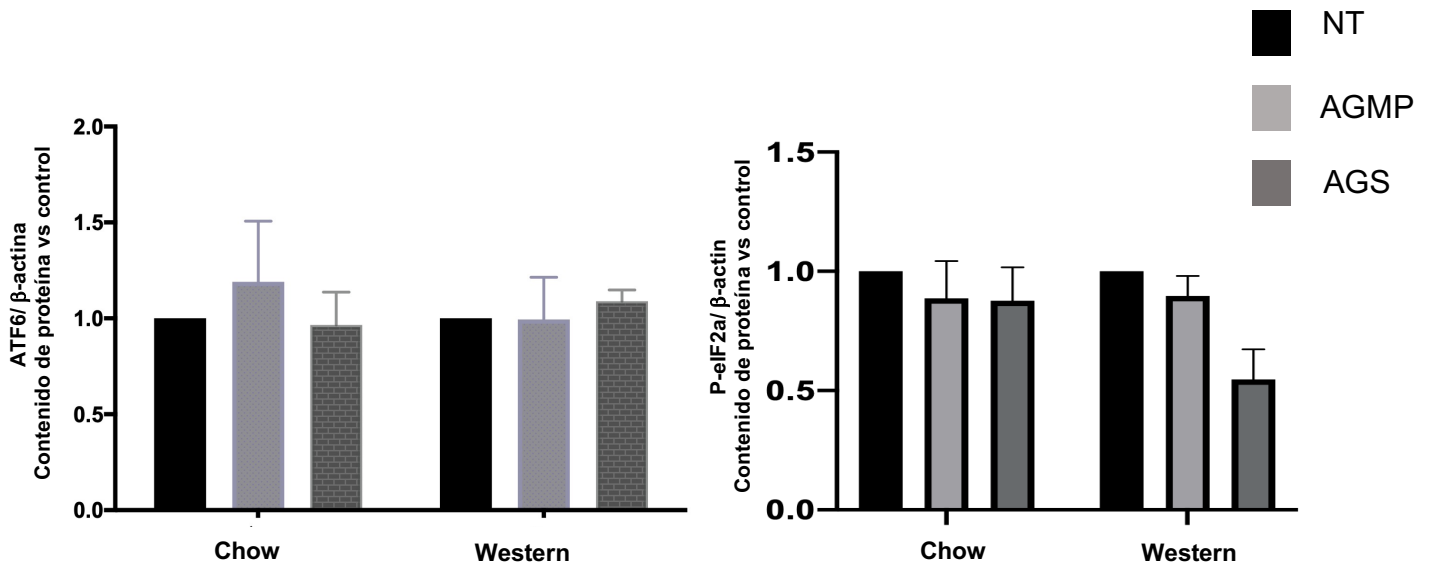


Figura 7.- Análisis de proteínas involucradas en el estrés del RE. Las gráficas representan media \pm SEM con tres réplicas en cada tratamiento.

6.6 Identificación de proteínas en el medio de cultivo de hepatocitos primarios de ratón bajo tratamiento con mezclas de ácidos grasos.

Adicionalmente, se analizó el secretoma de estas células, específicamente las proteínas que fueron secretadas por los hepatocitos tratados o no con ácidos grasos a través del método proteómico LC-MS/MS. Los resultados mostraron que las células con la dieta Chow secretaron 243 proteínas, mientras que en las células tratadas con la mezcla AGMP se encontraron 68 y con la mezcla AGS 45 proteínas, mostrando que las mezclas AGMP y AGS disminuyeron significativamente la secreción proteica en comparación con las células control (Figura 8). Por otro lado, en las células Western

se identificaron 176 proteínas secretadas, mientras que en células tratadas con la mezcla AGMP 102 y con la AGS 57, teniendo el mismo comportamiento que en las células Chow donde la presencia de las mezclas disminuye el número de proteínas secretadas al medio. Mostrando que las mezclas de ácidos grasos disminuyen la secreción de proteínas en ambos grupos.

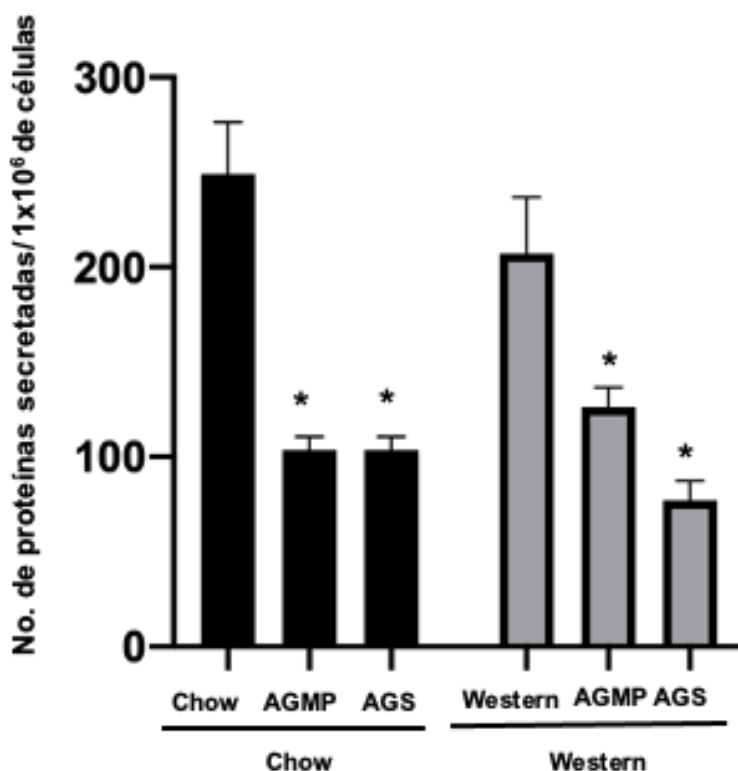


Figure 8.-Total de proteínas secretadas por hepatocitos de ratón al medio de cultivo. Las células Chow y Western fueron tratadas o no con las mezclas altas en ácidos grasos mono y poliinsaturados (AGMP) o saturados (AGS) por 24 h. Cada barra representa la media \pm SEM * $p > 0.001$ vs Chow.

6.7 Proteínas identificadas en el secretoma

Se hizo un análisis estadístico de contrastes para identificar a las proteínas secretadas diferencialmente entre los grupos, con un FDR=0.05. Se encontró que en el grupo de los hepatocitos provenientes de una dieta Chow, la comparación entre el grupo NT y las estimuladas con la mezcla AGPM hubo 10 proteínas diferencialmente secretadas, como se muestra en la tabla 3. Mientras que en la comparación entre el control y la mezcla AGS hubo 27 proteínas diferencialmente secretadas (Tabla 4).

En los hepatocitos provenientes de ratones alimentados con una dieta Western, se encontraron 4 proteínas diferencialmente secretadas en las células tratadas con la mezcla AGMP en comparación con los controles (Tabla 5). Para la mezcla AGS se encontraron 8 proteínas secretadas diferencialmente (Tabla 6).

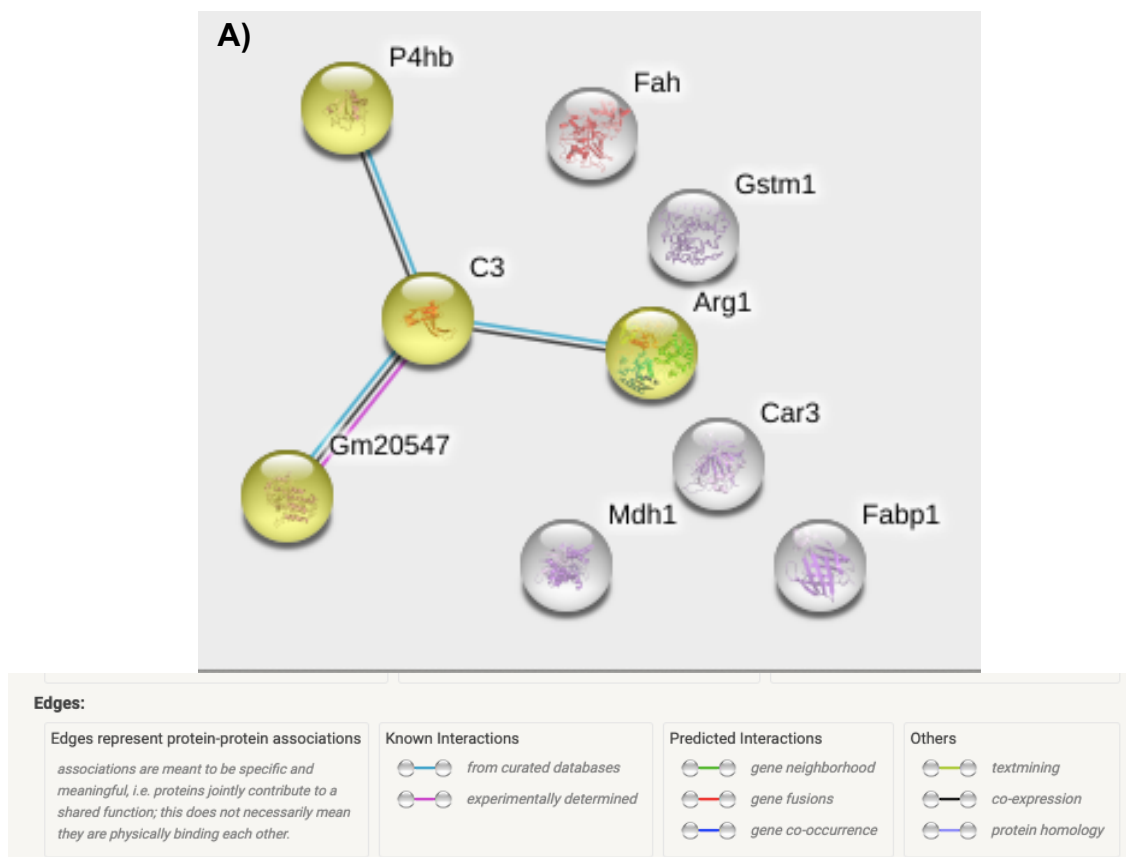
El análisis a través del software STRING reveló que tanto la mezcla AGMP y la AGS compartían vías celulares alteradas con la dieta Chow. Sin embargo, se encontró que la mezcla AGMP aumentó la secreción de proteínas de la vía del sistema inmune como ruta principal (Figura 9B). Mientras que la mezcla AGS aumentó la secreción de proteínas involucradas en vías del sistema inmune y en la regulación del almacenamiento de lípidos y ensamble de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), comparadas con el grupo NT (Figura 10B).

	Protein IDs	Protein Name	T-Student	Fold Change
1	A0A0R4J135	Selenium-binding protein 2	1.31	5.4
2	A2AE89	Glutathione S-transferase Mu 1	0.96	3.4
3	B8JJN0	Predicted gene 20547	1.48	7.3
4	P01027	Complement C3	1.53	8.6
5	P09103	Protein disulfide-isomerase	1.08	4.2
6	P12710	Fatty acid-binding protein, liver	1.12	6.0
7	P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1.09	10.2
8	P16015	Carbonic anhydrase 3	1.08	3.9
9	P35505	Fumarylacetoacetase	1.08	11.7
10	Q61176	Arginase-1	1.24	17.8

Table 3.-Proteínas diferencialmente secretadas en hepatocitos de ratones alimentados con una dieta Chow vs Chow AGMP

	Protein IDs	Protein Name	T-Student	Fold Change
1	D3YTY9	Kininogen-1	1.08	3.6
2	A0A0R4J135	Selenium-binding protein 2	1.50	9.7
3	A2AE89	Glutathione S-transferase Mu 1	0.97	4.8
4	B8JJN0	Predicted gene 20547	1.37	6.1
5	G3X9T8	Surfeit locus protein 4	0.84	2.7
6	O35490	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	0.91	4.6
7	P01027	Complement C3	1.11	4.1
8	P06797	Cathepsin L1	0.85	2.7
9	P07361	Alpha-1-acid glycoprotein 2	1.36	6.2
10	P07724	Serum albumin	0.76	2.5
11	P09103	Protein disulfide-isomerase	1.59	9.8
12	P11589	Major urinary protein 2	0.97	12.9
13	P11672	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	0.93	3.1
14	P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1.10	14.8
15	P16015	Carbonic anhydrase 3	1.32	7.6
16	P21614	Vitamin D-binding protein	0.98	3.9
17	P25688	Uricase	0.73	4.6
18	P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	1.23	6.8
19	P35505	Fumarylacetoacetase	0.84	2.6
20	P52760	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	0.73	2.7
21	Q07456	Protein AMBP	0.84	2.8
22	Q58EV3	Major urinary protein 1	0.98	4.8
23	Q60590	Alpha-1-acid glycoprotein 1	0.81	2.6
24	Q61176	Arginase-1	1.63	44.7
25	Q61646	Haptoglobin	0.82	2.6
26	Q91Y97	Fructose-bisphosphate aldolase B	1.09	7.4
27	E0CXD9	Surfeit locus protein 4	-1.27	5.1

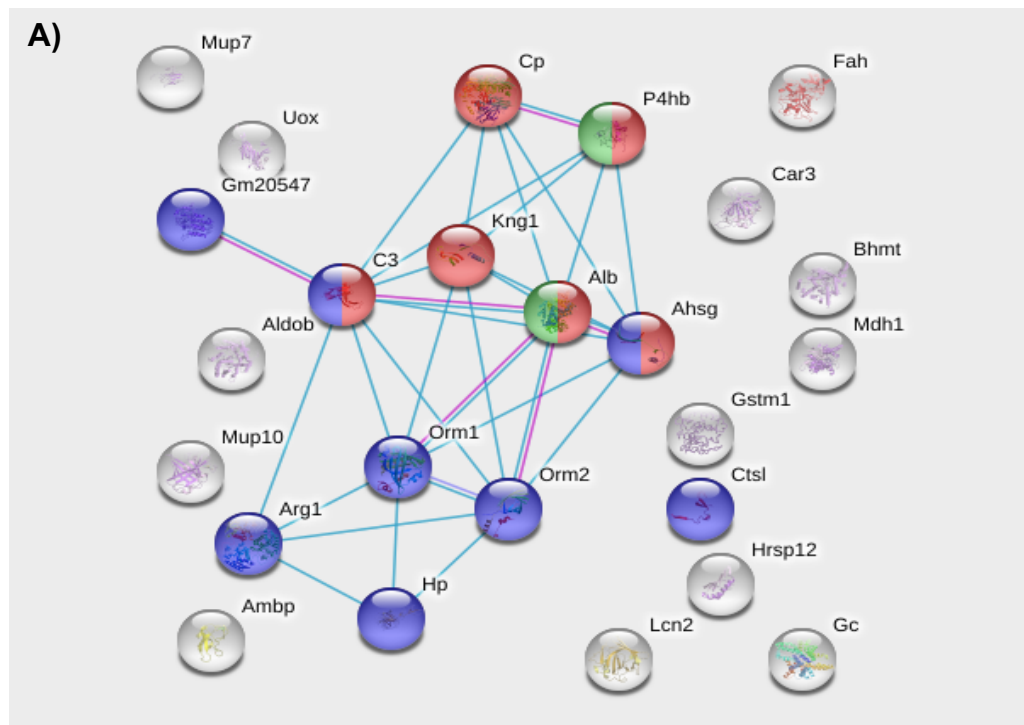
Table 4.-Proteínas diferencialmente secretadas en hepatocitos de ratones alimentados con una dieta Chow vs Chow AGS.



B) Reactome Pathways

pathway	description	count in gene set	false discovery rate
MMU-174577	Activation of C3 and C5	2 of 7	0.00022
MMU-173736	Alternative complement activation	2 of 6	0.00022
MMU-977606	Regulation of Complement cascade	2 of 41	0.0018
MMU-1430728	Metabolism	5 of 1685	0.0022
MMU-8957275	Post-translational protein phosphorylation	2 of 114	0.0073
MMU-381426	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and ...	2 of 129	0.0081
MMU-168256	Immune System	4 of 1523	0.0128
MMU-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	2 of 228	0.0197
MMU-168249	Innate Immune System	3 of 879	0.0215

Figure 9.- Análisis de las proteínas diferencialmente secretadas con la mezcla de AGMP en una dieta Chow A) Análisis de la interacción de proteínas por STRING, B) Principales vías celulares identificadas.



Edges:

Edges represent protein-protein associations associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.

Known Interactions	Predicted Interactions	Others
from curated databases	gene neighborhood	textmining
experimentally determined	gene fusions	co-expression
	gene co-occurrence	protein homology

B) Reactome Pathways

pathway	description	count in gene set	false discovery rate
MMU-8957275	Post-translational protein phosphorylation	6 of 114	3.22e-07
MMU-381426	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and ...	6 of 129	3.28e-07
MMU-114608	Platelet degranulation	5 of 121	7.87e-06
MMU-2168880	Scavenging of heme from plasma	3 of 19	3.39e-05
MMU-168249	Innate Immune System	8 of 879	5.62e-05
MMU-6798695	Neutrophil degranulation	6 of 476	0.00013
MMU-168256	Immune System	9 of 1523	0.00023
MMU-173736	Alternative complement activation	2 of 6	0.00027
MMU-174577	Activation of C3 and C5	2 of 7	0.00032
MMU-1430728	Metabolism	8 of 1685	0.0023
MMU-70263	Gluconeogenesis	2 of 33	0.0039
MMU-977606	Regulation of Complement cascade	2 of 41	0.0055
MMU-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	3 of 228	0.0095
MMU-174824	Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance	2 of 60	0.0095
MMU-1474290	Collagen formation	2 of 89	0.0179
MMU-8957322	Metabolism of steroids	2 of 126	0.0319

Figure 10.- Análisis de las proteínas diferencialmente secretadas con la mezcla de AGS en una dieta Chow A) Análisis de la interacción de proteínas por STRING, B) Principales vías celulares identificadas.

En la dieta Western se encontró que la mezcla de AGS aumentó 12 veces la secreción de la surfeit locus protein 4, con respecto NT. Mientras, que la mezcla de AGMP aumentó 8 veces la secreción de la proteína Phospholipid-transporting ATPase comparada con el control, cuya función está involucrada en la entrada de lípidos a las vesículas de grasa como una molécula de señalización, en el grupo con la mezcla AGMP (Tablas 5 y 6).

	Protein IDs	Protein Name	T-Student	Fold Change
1	P01027	Complement C3	1.30	7.9
2	Q61838	Pregnancy zone protein	1.65	13.8
3	Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	1.25	24.8
4	A_0A0M3HEP7	Phospholipid-transporting ATPase	-1.38	8.0

Tabla 5.-Proteínas diferenciales secretadas en células hepáticas de ratones alimentados con una dieta Western vs Western AGMP

	Protein IDs	Protein Name	T-Student	Fold Change
1	A0A0R4J135	Selenium-binding protein 2	1.15	5.9
2	B8JJN0	Predicted gene 20547	1.32	7.4
3	P01027	Complement C3	1.26	7.5
4	P35505	Fumarylacetoacetase	1.14	9.7
5	Q61176	Arginase-1	1.14	5.2
6	Q61838	Pregnancy zone protein	1.71	13.0
7	Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	1.14	14.2
8	E0CXD9	Surfeit locus protein 4	-1.73	12.5

Tabla 6.-Proteínas diferenciales secretadas en células hepáticas de ratones alimentados con una dieta Western vs Western AGS

7. DISCUSIÓN

Durante los últimos años las investigaciones en cáncer han dejado claro que las malignidades hepáticas son las más prevalentes entre todos los tipos de cáncer (Henley et al., 2020). Lo cual resulta alarmante, en parte, porque este fenómeno puede estar relacionado con la alta prevalencia de NAFLD alrededor del mundo (Perumpail et al., 2017), lo cual parece estar incrementando debido al estilo de vida sedentario y los inadecuados hábitos alimentarios. A pesar de que es bien conocido que prácticamente todas las enfermedades hepáticas presentan una historia natural, iniciando con esteatosis, esto también puede ser como consecuencia del alto consumo de grasas y carbohidratos que caracteriza la dieta típica occidental.

Es este trabajo nos enfocamos en abordar los efectos celulares de dos diferentes mezclas de ácidos grasos en hepatocitos de ratón con una sobrecarga de lípidos.

Aunque muchas líneas celulares derivadas de cáncer presentan naturalmente lipogénesis aberrante conducente a la sobrecarga de lípidos (Gerardo-Ramirez et al., 2019), la expresión genética anómala de estas células podría enmascarar efectos potencialmente interesantes, particularmente en metabolismo, proliferación y sobrevivencia. Para abordar el efecto de la sobrecarga lipídica celular y el impacto del tratamiento con mezclas específicas de lípidos, usamos un modelo celular adecuado con sobrecarga de lípidos de origen natural. La dieta Western comercial estándar provee un alto contenido de grasas y carbohidratos que ciertamente se asemeja a la

dieta occidental consumida en México y en países desarrollados como EU (Batis, Hernandez-Barrera, Barquera, Rivera, & Popkin, 2011).

Los hepatocitos obtenidos de ratones alimentados con la dieta Western por 7 días presentaron una clara sobrecarga de lípidos caracterizada por el incremento en el contenido de TG y colesterol libre (Figura 2). Los ratones bajo la dieta Western presentaron incremento en la actividad de AST y ALT y el característico color pálido del órgano indicando disfunción hepática debido a la esteatosis (Figura 1).

Nuestro grupo y otros grupos de investigación hemos reportado que es el tipo de lípido más que la cantidad de este, es lo que determina el grado de daño celular (Dominguez-Perez et al., 2019; Enriquez-Cortina et al., 2017; Mari et al., 2006), en particular, el incremento en el colesterol hepático gobierna la gravedad de las enfermedades hepáticas (Lopez-Islas et al., 2016; Lopez-Reyes et al., 2018; Nuno-Lambarri et al., 2016). En nuestro modelo *in vitro*, mostramos que el contenido de colesterol aumenta significativamente en hepatocitos. El exceso de colesterol en las células se dirige particularmente a la mitocondria, induciendo estrés oxidante, fisión mitocondrial, disminución en la producción de ATP y sensibilización al daño (Dominguez-Perez et al., 2019; Mari et al., 2006). El aislamiento de hepatocitos por perfusión con colagenasa conduce a la preservación del fenotipo esteatósico como se mostró en la figura 2. La sobrecarga de colesterol presenta además otro reto, la acumulación hepática persistente podría inducir resistencia a la apoptosis (Dominguez-Perez et al., 2019) promoviendo la tumorigénesis (Enriquez-Cortina et al., 2017).

No hay duda sobre el problema de acumulación de colesterol en el hígado. Por lo tanto, se requiere de nuevas alternativas dirigidas a disminuir los lípidos nocivos, particularmente las nutricionales.

Se ha publicado extensamente que la dieta Mediterránea, centrada en el consumo de vegetales con moderadas a bajas cantidades de componentes animales, podría jugar un papel clave en la prevención de enfermedades crónicas (Sofi, Macchi, Abbate, Gensini, & Casini, 2010; Trichopoulou et al., 2014). Recientemente se ha publicado que la dieta Mediterránea provee efectos benéficos en pacientes con NAFLD, disminuyendo parámetros de severidad como el perfil lipídico, índice glicémico, actividad sérica de enzimas hepáticas, entre otras (Bullon-Vela et al., 2020; Moosavian, Arab, & Paknahad, 2020).

Enfocados exclusivamente en algunos tipos principales de ácidos grasos libres como los encontrados en plasma de personas que consumen este tipo de dieta (Jenab, Slimani, Bictash, Ferrari, & Bingham, 2009; Saadatian-Elahi et al., 2009) exploramos a nivel celular los efectos inducidos por esta mezcla de ácidos grasos (AGMP) en hepatocitos esteatósicos comparado con la mezcla AGS. Es importante enfatizar que ambas mezclas de ácidos grasos están compuestas con los mismos lípidos pero en diferente proporción (Tabla 1).

Puede ser paradójico pero nuestros datos muestran claramente que la presencia de algunos lípidos puede influir en el contenido de otros. La figura 3, demuestra que los

AGMP inducen la reducción del contenido de lípidos en hepatocitos Western, mientras que los AGS parecen no tener influencia, juzgado por la tinción de rojo O.

Además de las funciones nutricionales esenciales, los ácidos grasos libres activan múltiples vías de señalización, particularmente las relacionadas con el metabolismo por interacción con receptores específicos de ácidos grasos libres (Hara, Kimura, Inoue, Ichimura, & Hirasawa, 2013). Es evidente que los AGMP están activando cambios en el metabolismo, lo cual no se observó con la mezcla de rica en ácidos grasos saturados. Aunque ambas combinaciones de lípidos tienen los mismos ácidos grasos, la mezcla AGMP tiene más ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Algunos estudios demostraron que la suplementación de la dieta con ácidos grasos poliinsaturados n-3 en ratones obesos bajo una dieta alta en grasas, reduce el contenido de lípidos en el hígado, normaliza los niveles de TG con una mejora en la respuesta inflamatoria y disminuye el estrés oxidante, favoreciendo la sensibilidad a la insulina, efectos similares se han observado en células hepáticas con sobrecarga lipídica (Kang et al., 2018; Valenzuela et al., 2012).

Es interesante que la mezcla AGMP ejerciera un efecto diferencial controlando los niveles de TG (Figura 3G) más que los de colesterol (Figura 3H), aunque ciertamente el colesterol disminuyó con el tratamiento con AGMP con respecto a los animales tratados bajo una dieta Western, sin embargo los niveles de colesterol permanecen incrementados significativamente cuando se compararon con las células provenientes de animales con dieta chow NT, la disminución en los niveles de colesterol se relaciona con la mejora en la función mitocondrial evaluada por MTT (Figura 4). Está

extensamente reportado que la sobrecarga de colesterol en células hepáticas es, particularmente, relevante en la función mitocondrial. La acumulación de colesterol en este organelo induce estrés oxidante y sensibilización ante una segunda agresión (Enriquez-Cortina et al., 2017; Mari et al., 2006; Nuno-Lambarri et al., 2016).

Los datos muestran claramente que a pesar de la disminución de colesterol inducido por el tratamiento AGMP no llega a niveles basales pero sí lo suficientemente bueno para disminuir los niveles de EROS (Figura 5A) y el daño oxidante evaluado a través de la lipoperoxidación (Figura 5B). Aunque se ha observado que la dieta Mediterránea tiene la habilidad de disminuir las EROS por un mecanismo dependiente de polifenoles (Abenavoli, Milanovic, Milic, Luzzza, & Giuffre, 2019), las propiedades antioxidantes provocadas por los ácidos grasos mono y poliinsaturados deben revisarse, particularmente en el contexto de la NAFLD (Abenavoli et al., 2019), como muestran claramente nuestros resultados.

El aceite de oliva representa la principal fuente de grasa en la dieta Mediterránea, está compuesto particularmente de ácidos grasos monoinsaturados (principalmente ácido oléico, 55-83 %) y poliinsaturados (4-20 %) (Abenavoli et al., 2019). De hecho, estos ácidos grasos son excelentes captadores de EROS debido a la capacidad de sus dobles enlaces que reaccionan con sustancias reactivas, nuestros datos proveen evidencia de que la AGMP induce la disminución del contenido de EROS y lipoperoxidación celular (Figura 5), inducido por la dieta Western.

Los ácidos grasos poliinsaturados, particularmente los omega 3 han demostrado que despliegan efectos protectores en el hígado, de hecho, es bien conocido que la nutrición enteral en hospitales está asociada al deterioro de la función hepática, y los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 inducen una mejora hepática (Bechynska et al., 2019), el efecto se asoció a la desregulación de enzimas del Cyp450, esto podría representar un mecanismo adaptativo tendiente a mejorar los fenómenos de estrés oxidante.

Aparte de este notable efecto protector inducido por la mezcla AGMP, la mezcla AGS no ejerció ningún cambio en la sobrecarga de lípidos en los hepatocitos. Como se esperaba, el tratamiento con AGMP en los hepatocitos con la dieta Western NT incrementó la carga celular de lípidos por un incremento significativo de TG pero no de colesterol. El tratamiento con AGS resultó en un ligero incremento en el contenido de EROS y oxidación lipídica.

Diversos estudios han evidenciado que los ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) desencadenan una respuesta inflamatoria y de apoptosis en los hepatocitos en 24 h (Joshi-Barve et al., 2007). Esta respuesta inflamatoria se ha encontrado a través de los receptores tipo Toll (TLR) activados por NF κ B, JNK y AP-1. Estas últimas pertenecientes a las MAPK cinasas que incluyen a JAK cinasas y ERK (L. Chen, Deng, et al., 2018). Modelos de esteatosis hepática inducidos con una dieta alta en colina han mostrado que hay activación de JNK desde el inicio y es mantenida durante todo el curso de la dieta (Schattenberg et al., 2006). Los resultados mostraron que las

mezclas de ácidos grasos activaron a JNK comparada con las NT y reprimieron Erk1/2, lo cual resulta lógico dado el papel antagónico de estas proteínas. STAT3 es un importante factor relacionado a la respuesta inflamatoria el cual activa la transcripción de múltiples factores genes inflamatorios como el IL-1, TNF α , IL-6 (L. Chen, Deng, et al., 2018). Nuestros resultados mostraron que las mezclas de ácidos grasos (AGMP en menor grado) activaron a STAT3, lo cual puede estar asociado al proceso inflamatorio en conjunto con la activación de JNK y apoyado con la alteración en la vía de la respuesta inmune revelado por el análisis proteómico para ambas dietas (Figuras 9 y 10), por lo tanto, los resultados sugieren el posible desarrollo de una etapa más avanzada de la enfermedad como lo es la NASH. La diferencia en la activación de STAT3 entre dietas puede deberse a mecanismos de compensación previamente activados por la dieta esteatogénica.

El estrés del retículo endoplásmico es una de las principales vías que se afectan debido al aumento de ácidos grasos saturados en las células hepáticas. El retículo endoplásmico es el principal sitio en la síntesis de lípidos. La localización de las enzimas encargadas de la homeostasis del colesterol, síntesis de lípidos y formación de vesículas de grasa se encuentran en la membrana del RE (Almanza et al., 2019). El estrés del RE comienza con la activación de tres principales proteínas: PERK, IRE1 y ATF6. A su vez, la fosforilación de PERK activa a el factor eIF2 α que inhibe la síntesis de proteínas. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la activación de ATF6 con ninguna de las mezclas de ácidos grasos en ambas dietas, caso contrario a lo observado para p-eIF2 α , donde la activación de esta proteína se

indujo a causa de la dieta Western. Esto podría sugerir que la sobrecarga lipídica inducida por la dieta está evitando la síntesis y transporte de proteínas, traducándose en la generación de estrés de RE. Tanto esto último como la evaluación del proceso inflamatorio mediado por JNK y STAT3 necesita de más experimentos para corroborar estos hallazgos.

Posteriormente se analizaron las proteínas identificadas en el medio de cultivo de los hepatocitos con las dos dietas. Los hepatocitos son considerados las células más importantes para la reactividad de una multiplicidad de señales autócrinas y parácrinas para una diversidad de sustancias. Algunos estudios han mostrado la importancia de la interferencia intrahepática en los tejidos en estados de enfermedad, en especial de la disrupción o la conectividad a través de la secreción de receptores via ligandos entre células del parenquima y no parénquima (Friedman, 2008; Krenkel & Tacke, 2017; Xiong et al., 2019).

Los análisis mostraron que las proteínas identificadas en el medio de los hepatocitos mostraron similitud con las proteínas encontradas en otras investigaciones en condiciones normales sin estimular (Franko et al., 2019; Slany et al., 2010). Los datos mostraron que las dos mezclas de ácidos grasos indujeron una disminución en la secreción de proteínas comparado con las células NT de ambas dietas. Esta disminución de proteínas secretadas por acción de ácidos grasos se ha evidenciado en otros estudios como: Hirsova y col; donde en células de hepatoblastoma y hepatocitos primarios de ratón la estimulación con varias concentraciones de ácido palmítico disminuyó la secreción de proteínas comparada con las células sin estímulo (Hirsova et al., 2016). Hasta ahora se sabe muy poco del efecto en la disminución de

proteínas secretadas por ácidos grasos. No obstante, la técnica libre de marcaje, que se utilizó para este estudio, es una técnica semicuantitativa la cual podría dar un resultado no cuantitativo en la identificación de las proteínas totales. Aún estos resultados podrían evidenciar el efecto en la disminución de proteínas secretadas por ácidos grasos.

Los resultados del análisis proteómico diferencial mostraron que en hepatocitos con la dieta Chow la mezcla de AGMP secretó diferencialmente a FABP comparada con la dieta Chow NT. Se sabe que FABP regula la circulación de lípidos en el citoplasma y funciona como un sensor que podría tener efectos interesantes en la esteatosis (Chmurzynska, 2006; Newberry et al., 2008). La mezcla alta en ácidos grasos mono y poliinsaturados disminuyó la secreción de FABP seis veces más que el control, esto se apoya con lo reportado con ratones L-FABP ^{-/-} donde la esteatosis hepática inducida con una dieta Western se atenuó. Así mismo, redujeron la formación de vesículas de grasa y la activación de las células estelares, principal estirpe involucrada en el desarrollo de fibrosis (A. Chen et al., 2013). Con estas evidencias, la disminución en la secreción de FABP por la mezcla AGMP podría estar en correlación con lo encontrado en la disminución de TG en los hepatocitos esteatóticos.

Por último, en hepatocitos con dieta Western, la mezcla AGMP secretó a ocho veces más a el receptor Phospholipid-transporting ATPase comparada con el control. Este receptor tiene como función la regulación del transporte de lípidos (Paulusma & Oude Elferink, 2006), lo cual explica la disminución de TG en hepatocitos esteatóticos con esta mezcla. Estos experimentos del análisis proteómico requieren de validación y analizar las otras proteínas secretadas por esta mezcla de ácidos grasos.

8. CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la combinación de proporciones aumentadas de ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados ejercen efectos de protección celular controlando los niveles de TG y colesterol y disminuyendo la producción de EROS y daño oxidante en hepatocitos con una sobrecarga de lípidos inducida por el consumo de una dieta tipo occidental (Western). El consumo de una mayor combinación de ácidos grasos mono y poliinsaturados y bajo contenido de ácidos grasos saturados induce un efecto protector en hepatocitos esteatóticos, conduciendo a una óptima función celular por la disminución del estrés oxidante. Además de encontrar en el secretoma proteínas que participan como receptores del La ingesta de AGMP podría ser un potencial tratamiento adyuvante en las enfermedades del hígado graso mediando el transporte de lípidos intracelulares y evitando su acumulación. Aunque el estudio *in vitro* se limita a los efectos en hepatocitos, la validación en modelos *in vivo* y más aun en humanos sería de gran interés para establecer una intervención de apoyo dietético en el tratamiento de la NAFLD.

9. REFERENCIAS

- Abenavoli, L., Milanovic, M., Milic, N., Luzza, F., & Giuffre, A. M. (2019). Olive oil antioxidants and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(8), 739-749.
- Albracht-Schulte, K., Gonzalez, S., Jackson, A., Wilson, S., Ramalingam, L., Kalupahana, N. S., & Moustaid-Moussa, N. (2019). Eicosapentaenoic Acid Improves Hepatic Metabolism and Reduces Inflammation Independent of Obesity in High-Fat-Fed Mice and in HepG2 Cells. *Nutrients*, 11(3).
- Almanza, A., Carlesso, A., Chinthia, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., . . . Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*, 286(2), 241-278.
- Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., & Grosovski, M. (2009). Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 15(15), 1809-1815.
- Batis, C., Hernandez-Barrera, L., Barquera, S., Rivera, J. A., & Popkin, B. M. (2011). Food acculturation drives dietary differences among Mexicans, Mexican Americans, and Non-Hispanic Whites. *J Nutr*, 141(10), 1898-1906.
- Bechynska, K., Daskova, N., Vrzackova, N., Harant, K., Heczko, M., Podzimkova, K., . . . Cahova, M. (2019). The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the liver lipidome, proteome and bile acid profile: parenteral versus enteral administration. *Sci Rep*, 9(1), 19097.
- Bermudez, B., Lopez, S., Ortega, A., Varela, L. M., Pacheco, Y. M., Abia, R., & Muriana, F. J. (2011). Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des*, 17(8), 831-843.
- Bullon-Vela, V., Abete, I., Tur, J. A., Pinto, X., Corbella, E., Martinez-Gonzalez, M. A., . . . investigators, P. P. (2020). Influence of lifestyle factors and staple foods from the Mediterranean diet on non-alcoholic fatty liver disease among older individuals with metabolic syndrome features. *Nutrition*, 71, 110620.
- Buque, X., Aspichueta, P., & Ochoa, B. (2008). [Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis]. *Rev Esp Enferm Dig*, 100(9), 565-578.
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*, 62(1 Suppl), S47-64.
- Chen, A., Tang, Y., Davis, V., Hsu, F. F., Kennedy, S. M., Song, H., . . . Davidson, N. O. (2013). Liver fatty acid binding protein (L-Fabp) modulates murine stellate cell activation and diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 57(6), 2202-2212.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., . . . Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218.
- Chen, L., Wang, C., Huang, S., Gong, B., Yu, J., Shi, Q., & Chen, G. (2014). Effects of individual and multiple fatty acids (palmitate, oleate and docosahaexenoic acid) on cell viability and lipid metabolism in LO2 human liver cells. *Mol Med Rep*, 10(6), 3254-3260.

- Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., . . . Chen, Y. (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci*, 203, 291-304.
- Chmurzynska, A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*, 47(1), 39-48.
- Deligiannidou, G. E., Philippou, E., Vidakovic, M., Berghe, W. V., Heraclides, A., Grdovic, N., . . . Kontogiorgis, C. (2019). Natural Products Derived from the Mediterranean Diet with Antidiabetic Activity: from Insulin Mimetic Hypoglycemic to Nutriepigenetic Modulator Compounds. *Curr Pharm Des*, 25(15), 1760-1782.
- Dominguez-Perez, M., Simoni-Nieves, A., Rosales, P., Nuno-Lambarri, N., Rosas-Lemus, M., Souza, V., . . . Gutierrez-Ruiz, M. C. (2019). Cholesterol burden in the liver induces mitochondrial dynamic changes and resistance to apoptosis. *J Cell Physiol*, 234(5), 7213-7223.
- Enriquez-Cortina, C., Bello-Monroy, O., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R. U., Toledo-Perez, R., . . . Gomez-Quiroz, L. E. (2017). Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 8(61), 104136-104148.
- Franko, A., Hartwig, S., Kotzka, J., Ruoss, M., Nussler, A. K., Konigsrainer, A., . . . Peter, A. (2019). Identification of the Secreted Proteins Originated from Primary Human Hepatocytes and HepG2 Cells. *Nutrients*, 11(8).
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88(1), 125-172.
- Geng, T., Hu, W., Broadwater, M. H., Snider, J. M., Bielawski, J., Russo, S. B., . . . Cowart, L. A. (2013). Fatty acids differentially regulate insulin resistance through endoplasmic reticulum stress-mediated induction of tribbles homologue 3: a potential link between dietary fat composition and the pathophysiological outcomes of obesity. *Diabetologia*, 56(9), 2078-2087.
- Gerardo-Ramirez, M., Lazzarini-Lechuga, R., Hernandez-Rizo, S., Jimenez-Salazar, J. E., Simoni-Nieves, A., Garcia-Ruiz, C., . . . Gomez-Quiroz, L. E. (2019). GDF11 exhibits tumor suppressive properties in hepatocellular carcinoma cells by restricting clonal expansion and invasion. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865(6), 1540-1554.
- Gomez-Quiroz, L. E., Factor, V. M., Kaposi-Novak, P., Coulouarn, C., Conner, E. A., & Thorgeirsson, S. S. (2008). Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 283(21), 14581-14589.
- Green, C. J., & Hodson, L. (2014). The influence of dietary fat on liver fat accumulation. *Nutrients*, 6(11), 5018-5033.
- Han, J., & Kaufman, R. J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res*, 57(8), 1329-1338.
- Hara, T., Kimura, I., Inoue, D., Ichimura, A., & Hirasawa, A. (2013). Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 164, 77-116.
- Harika, R. K., Eilander, A., Alsema, M., Osendarp, S. J., & Zock, P. L. (2013). Intake of fatty acids in general populations worldwide does not meet dietary

- recommendations to prevent coronary heart disease: a systematic review of data from 40 countries. *Ann Nutr Metab*, 63(3), 229-238.
- Henley, S. J., Thomas, C. C., Lewis, D. R., Ward, E. M., Islami, F., Wu, M., . . . Richardson, L. C. (2020). Annual report to the nation on the status of cancer, part II: Progress toward Healthy People 2020 objectives for 4 common cancers. *Cancer*, 126(10), 2250-2266.
- Hirsova, P., Ibrahim, S. H., Krishnan, A., Verma, V. K., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., . . . Gores, G. J. (2016). Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology*, 150(4), 956-967.
- Hodson, L., & Gunn, P. J. (2019). The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nat Rev Endocrinol*, 15(12), 689-700.
- Hussein, O., Grosovski, M., Lasri, E., Svalb, S., Ravid, U., & Assy, N. (2007). Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*, 13(3), 361-368.
- Jenab, M., Slimani, N., Bictash, M., Ferrari, P., & Bingham, S. A. (2009). Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. *Hum Genet*, 125(5-6), 507-525.
- Joshi-Barve, S., Barve, S. S., Amancherla, K., Gobejishvili, L., Hill, D., Cave, M., . . . McClain, C. J. (2007). Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology*, 46(3), 823-830.
- Jungermann, K., & Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev*, 69(3), 708-764.
- Kang, S., Huang, J., Lee, B. K., Jung, Y. S., Im, E., Koh, J. M., & Im, D. S. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect human hepatoma cells from developing steatosis through FFA4 (GPR120). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1863(2), 105-116.
- Kaur, G., Cameron-Smith, D., Garg, M., & Sinclair, A. J. (2011). Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects. *Prog Lipid Res*, 50(1), 28-34.
- Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 17(5), 306-321.
- Kuntz, E., & Kuntz, H. (2006). *Hepatology principles and practice*.: Springer.
- Kutlu, O., Kaleli, H. N., & Ozer, E. (2018). Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis- (NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 8543763.
- Lopez-Islas, A., Chagoya-Hazas, V., Perez-Aguilar, B., Palestino-Dominguez, M., Souza, V., Miranda, R. U., . . . Gutierrez-Ruiz, M. C. (2016). Cholesterol Enhances the Toxic Effect of Ethanol and Acetaldehyde in Primary Mouse Hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9209825.
- Lopez-Reyes, A., Clavijo-Cornejo, D., Fernandez-Torres, J., Medina-Luna, D., Estrada-Villasenor, E. G., Gomez-Quiroz, L. E., . . . Martinez-Flores, K. (2018). Fast Morphological Gallbladder Changes Triggered by a Hypercholesterolemic Diet. *Ann Hepatol*, 17(5), 857-863.
- Luo, Y., Burrington, C. M., Graff, E. C., Zhang, J., Judd, R. L., Suksaranjit, P., . . . Greene, M. W. (2016). Metabolic phenotype and adipose and liver features in a

- high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 310(6), E418-439.
- Machado, M. V., Michelotti, G. A., Xie, G., Almeida Pereira, T., Boursier, J., Bohnic, B., . . . Diehl, A. M. (2015). Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One*, 10(5), e0127991.
- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orru, S., & Buono, P. (2015). Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*, 20(9), 17339-17361.
- Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., . . . Garcia-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*, 4(3), 185-198.
- Mayneris-Perxachs, J., Sala-Vila, A., Chisaguano, M., Castellote, A. I., Estruch, R., Covas, M. I., . . . Investigators, P. S. (2014). Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. *PLoS One*, 9(3), e85202.
- Moosavian, S. P., Arab, A., & Paknahad, Z. (2020). The effect of a Mediterranean diet on metabolic parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review of randomized controlled trials. *Clin Nutr ESPEN*, 35, 40-46.
- Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., & Gambino, R. (2018). Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 155(2), 282-302 e288.
- Musso, G., Gambino, R., & Cassader, M. (2009). Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*, 48(1), 1-26.
- Najbjerg, H., Young, J. F., Bertram, H. C., Afseth, N. K., Host, V., & Kohler, A. (2013). High-throughput FTIR spectroscopy of intact HepG2 cells reveals additive and non-additive effects of individual fatty acids when given as mixtures. *J Biophotonics*, 6(5), 446-456.
- Nazni, P. (2014). Association of western diet & lifestyle with decreased fertility. *Indian J Med Res*, 140 Suppl, S78-81.
- Newberry, E. P., Kennedy, S. M., Xie, Y., Sternard, B. T., Luo, J., & Davidson, N. O. (2008). Diet-induced obesity and hepatic steatosis in L-Fabp / mice is abrogated with SF, but not PUFA, feeding and attenuated after cholesterol supplementation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(1), G307-314.
- Noureddin, M., & Sanyal, A. J. (2018). Pathogenesis of NASH: The Impact of Multiple Pathways. *Curr Hepatol Rep*, 17(4), 350-360.
- Nuno-Lambarri, N., Dominguez-Perez, M., Baulies-Domenech, A., Monte, M. J., Marin, J. J., Rosales-Cruz, P., . . . Gomez-Quiroz, L. E. (2016). Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9895176.
- Ore, A., & Akinloye, O. A. (2019). Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Kaunas)*, 55(2).

- Paulusma, C. C., & Oude Elferink, R. P. (2006). Diseases of intramembranous lipid transport. *FEBS Lett*, *580*(23), 5500-5509.
- Perumpail, B. J., Khan, M. A., Yoo, E. R., Cholankeril, G., Kim, D., & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, *23*(47), 8263-8276.
- Pianeta Nutrizione kids: international pediatric conference on food, physical activity, growth and well-being : Milan, Italy. 25-27 June 2015. (2016). *Ital J Pediatr*, *42 Suppl 1*, 53.
- Ryan, M. C., Itsiopoulos, C., Thodis, T., Ward, G., Trost, N., Hofferberth, S., . . . Wilson, A. M. (2013). The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, *59*(1), 138-143.
- Saadatian-Elahi, M., Slimani, N., Chajes, V., Jenab, M., Goudable, J., Biessy, C., . . . Riboli, E. (2009). Plasma phospholipid fatty acid profiles and their association with food intakes: results from a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*, *89*(1), 331-346.
- Salas-Silva, S., Simoni-Nieves, A., Razori, M. V., Lopez-Ramirez, J., Barrera-Chimal, J., Lazzarini, R., . . . Bucio-Ortiz, L. (2020). HGF induces protective effects in alpha-naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis by counteracting oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, *174*, 113812.
- Schattenberg, J. M., Singh, R., Wang, Y., Lefkowitz, J. H., Rigoli, R. M., Scherer, P. E., & Czaja, M. J. (2006). JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology*, *43*(1), 163-172.
- Scorletti, E., & Byrne, C. D. (2013). Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr*, *33*, 231-248.
- Skeaff, C. M., Hodson, L., & McKenzie, J. E. (2006). Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *J Nutr*, *136*(3), 565-569.
- Slany, A., Haudek, V. J., Zwickl, H., Gundacker, N. C., Grusch, M., Weiss, T. S., . . . Gerner, C. (2010). Cell characterization by proteome profiling applied to primary hepatocytes and hepatocyte cell lines Hep-G2 and Hep-3B. *J Proteome Res*, *9*(1), 6-21.
- Sofi, F., Macchi, C., Abbate, R., Gensini, G. F., & Casini, A. (2010). Effectiveness of the Mediterranean diet: can it help delay or prevent Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*, *20*(3), 795-801.
- Song, M. J., & Malhi, H. (2019). The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. *Pharmacol Ther*, *203*, 107401.
- Takaki, A., Kawai, D., & Yamamoto, K. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*, *14*(10), 20704-20728.
- Tiniakos, D. G., Vos, M. B., & Brunt, E. M. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, *5*, 145-171.
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Curr Biol*, *27*(21), R1147-R1151.

- Trichopoulou, A., Martinez-Gonzalez, M. A., Tong, T. Y., Forouhi, N. G., Khandelwal, S., Prabhakaran, D., . . . de Lorgeril, M. (2014). Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Med*, *12*, 112.
- Valenzuela, R., Espinosa, A., Gonzalez-Manan, D., D'Espessailles, A., Fernandez, V., Videla, L. A., & Tapia, G. (2012). N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS One*, *7*(10), e46400.
- Van Herck, M. A., Vonghia, L., & Francque, S. M. (2017). Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients*, *9*(10).
- Voelker, T. (2011). Secrets of palm oil biosynthesis revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(30), 12193-12194.
- Wang, X., Cao, Y., Fu, Y., Guo, G., & Zhang, X. (2011). Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*, *10*, 234.
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., & Sul, H. S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *16*(11), 678-689.
- Wellington, N., Shanmuganathan, M., de Souza, R. J., Zulyniak, M. A., Azab, S., Bloomfield, J., . . . Britz-McKibbin, P. (2019). Metabolic Trajectories Following Contrasting Prudent and Western Diets from Food Provisions: Identifying Robust Biomarkers of Short-Term Changes in Habitual Diet. *Nutrients*, *11*(10).
- Widmer, R. J., Flammer, A. J., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2015). The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *Am J Med*, *128*(3), 229-238.
- Xiong, X., Kuang, H., Ansari, S., Liu, T., Gong, J., Wang, S., . . . Lin, J. D. (2019). Landscape of Intercellular Crosstalk in Healthy and NASH Liver Revealed by Single-Cell Secretome Gene Analysis. *Mol Cell*, *75*(3), 644-660 e645.
- Yamada, K., Mizukoshi, E., Sunagozaka, H., Arai, K., Yamashita, T., Takeshita, Y., . . . Kaneko, S. (2015). Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, *35*(2), 582-590.



Original article

Mediterranean-like mix of fatty acids induces cellular protection on lipid-overloaded hepatocytes from western diet fed mice



Lyssia Castellanos-Tapia^{a,b}, María Elizabeth Tejero-Barrera^a, Soraya Salas-Silva^{b,c}, Arturo Simoni-Nieves^{b,c}, Alejandro Escobedo-Calvario^{b,c}, Luis E. Gomez-Quiroz^{c,*}

^a *Nutrigenomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico*

^b *Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Mexico City, Mexico*

^c *Departamento de Genética de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2020

Accepted 19 June 2020

Available online 12 July 2020

Keywords:

PUFA

MUFA

Mediterranean diet

Western diet

NARD

ABSTRACT

Introduction and objective. Non-alcoholic fatty liver disease remains as one of the main liver disorders worldwide. It is widely accepted that is the kind of lipid, rather than the amount deposited in the cells that determines cell damage. Cholesterol and saturated free fatty acids are deleterious lipids when accumulated but, in contrast, there are some valuable lipids that could counteract those with harmful properties. Much of this knowledge arises from studies using a single fatty acid, but the effects of a combination of fatty acids, as obtained by diet has been poorly addressed. In the present work, we were focused to figure out the cellular effect of two different mixes of fatty acids, one with high proportion of saturated fatty acids, and another one with high proportion of unsaturated fatty acids (Mediterranean-like) in a cellular model of steatosis. **Material and methods.** Primary mouse hepatocytes from animals fed with a western diet (high fat and carbohydrates diet), were treated with both mixes of fatty acids for 24 h. **Results.** Our data clearly show that only the high unsaturated fatty acid mix induced a decrease in triglycerides (47.5%) and cholesterol (59%) content in steatotic hepatocytes mediating cellular protection associated to the decrement of ROS and oxidative damage. The mixture of high saturated fatty acids exhibited no effects, preserving high levels of cholesterol and triglycerides and oxidative damage. **In conclusion,** our results show that Mediterranean-like mix of fatty acids exerts cellular protection in steatosis by decreasing triglycerides, cholesterol, ROS content and oxidative damage.

© 2020 Fundación Clínica Médica Sur, A.C. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) remains as one of the main liver disorders worldwide, with increasing prevalence every year [1]. It is associated with metabolic disorders, such as diabetes, dyslipidemia, metabolic syndrome, or obesity [2], but also to the consumption of fatty foods, particularly those rich in cholesterol, saturated free fatty acids (FFA) and carbohydrates such as western-style diet [3,4].

We and others have reported that is the type of lipid, rather than the amount that determines the severity of the disease [5–7]. In this context, high cholesterol overload in hepatocytes seems to be the main cellular noxious stimulus in NAFLD particularly because cholesterol targets mitochondria inducing oxidative stress, ATP decrement and susceptibility to cell death due to a second hit [5,7], such as alcohol toxicity [8], obstructive cholestasis [9], or deficiencies in signaling pathways, such as HGF/c-Met [10]; as a consequence oxidative stress is exacerbated increasing damage and, eventually, leading to carcinogenesis [6].

Diet could also be the counterbalance in NAFLD particularly due to the differential lipid content. It is recognized that Mediterranean diet is rich in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (MUFA and PUFA, respectively), which in addition present antioxidant properties, among others [11].

Diet is a determining factor that influences the concentration and composition of fatty acids in plasma and for instance, in the liver. Some studies have shown that certain fatty acids alone or in combination induce significant changes in liver physiology and

Abbreviations: NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease; NASH, Non-alcoholic steatohepatitis; TG, Triglyceride; HMPFA, High mono and polyunsaturated fatty acids; HSFA, High proportions of saturated fatty acids; MUFA, Monounsaturated fatty acids; PUFA, Polyunsaturated fatty acids; FFA, Free fatty acid; AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine transferase; ROS, Reactive Oxygen Species; TBARS, Thiobarbituric acid-reactive substances.

* Corresponding author.

E-mail address: lego@xanum.mx (L.E. Gomez-Quiroz).

<https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.06.005>

1665–2681/© 2020 Fundación Clínica Médica Sur, A.C. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

pathophysiology. Hepatic cells treated with palmitic acid and n-3 PUFA increased the expression of genes related with beta oxidation, diminishing the toxic effects of the palmitic acid [12]. In primary rat hepatocytes stimulated with oleic acid in the presence of palmitic acid alleviated ER stress induced by palmitic acid [13].

There is evidence that high levels of palmitic, palmitoleic and myristic fatty acids in hepatic tissue from mice with steatosis is correlated with severity of NASH [14], similar findings have been reported in patients with NASH where high content of palmitic, myristic, palmitoleic, vaccenic and oleic acids were found in liver, this FFA mix was toxic in both human primary hepatocytes and in HepG2 cell line [15]. Furthermore, in terms of nutrition, dietary fatty acids come in complex combinations which can vary greatly in the content of SFA, MUFA or PUFA.

In the present work, we were focused to study the cellular effects of two different combinations of fatty acids, where the proportion of them was variable, to explore the differential response in lipid overloaded hepatocytes from mice fed with a western diet, as a mouse model of NAFLD.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

All animal procedures were carried out according to the guidelines of the NIH Guide for the Care and the Use of the Laboratory Animals and Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I) animal facility guide. The research was approved by the ethical committee of the UAM-I. Twenty 8–10 weeks old BALB/c mice were randomly separated in two groups. The first one was fed with a western diet (ssniff EF R/M acc TD88137 mod, catalog # E15721-34, 10 mm pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) for 1 week. The second group was fed with control diet (ssniff EF R/M CD88137 Control, catalog #E15720-04, 10 mm pellets), the nutrient contents are the same that the western diet, except that the atherogenic components were removed. All animals received water and diet *ad libitum*.

2.2. Analysis of liver function

Serum activity of aspartate aminotransferase (AST), and alanine transferase (ALT) were determined by using automated analyzer for clinical chemistry (Spotchem EZ, Arkray USA Inc, Minneapolis, MN, USA) following manufacturer's instructions. Blood samples were obtained by coauthor S.S.S. in the perfusion procedure, as follows.

2.3. Primary mouse hepatocytes isolation, purification and culture

Hepatocytes were isolated from mice by the two-step collagenase perfusion technique, followed by isodensity purification in percoll gradient, as we previously described [16]. Briefly, mice were anesthetized with avertin, perfusion was performed in the mouse liver through the inferior vena cava via the right atrium, at this point blood was collected. The organ was perfused 5 min with Hank' balanced solution w/o calcium and magnesium containing 10 mM HEPES and 0.2 mM EGTA followed by 10–15 min perfusion with William's medium E containing 10 mM HEPES and 0.03% collagenase H (0.19 U/mg) (Boehringer Mannheim Biochemica).

Hepatocytes were seeded at 2.13×10^5 cells per cm^2 either in Lab-Tek chambered slides or 10-cm dishes (Nalge, Nunc) in the Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's basal hepatocyte growth medium supplemented with ITS+ (Collaborative Research) (insulin 6.25 mg/ml, transferrin 6.25 mg/ml, selenious acid 6.25 ng/ml, bovine serum albumin 1.25 mg/ml, 2 mM glutamine, 30 mg/ml proline (Gibco Inc), 1 mg/ml galactose (Gibco), 18 mM HEPES, 1 mM

Table 1

Fatty acids composition of the two mixes.

FFA	HMPFA %	HSFA %	Sigma-Aldrich Catalog #
Palmitic	57	60	P0900
Myristic	0.5	1.5	M3128
Palmitoleic	1	3	P9417
Oleic	27	23	O1008
n-3 PUFA (EPA/DHA, 7/2)	14.5	6.5	E2011/D2534

sodium pyruvate (Gibco), 1.4×10^{-2} M sodium bicarbonate (Gibco) and 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT). After 4 h attachment, the medium was replaced by serum-free basal hepatocyte growth medium. The following day, cells were treated with different mix of FFA, according to Table 1. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except when otherwise stated.

Primary hepatocytes were treated with both FFA mixtures, the first one contained high proportions of saturated FFA (HSFA) and the second mixture contains high proportion of FFA monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA), and it is referred as (HMPFA) as Table 1 shows. All FFA were supplied by Merck and Co. (Kenilworth, NJ, USA). Treatments were carried out using 100 μM , final concentration, of each FFA mixture, for 24 h.

2.4. FFA mix formulation

Cell cultures (80% confluence) were under serum free media containing 1% antibiotics for 12 h at 37 °C, 5% CO_2 . FFA mix formulation was based on previous report [17]. FFA (all >99% purity and purchased from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) mixes were prepared as follow: 100 mM stock of Palmitic acid and Myristic acid were dissolved in 100% ethanol at 70 °C, meanwhile oleic, palmitoleic acids and PUFA n-3: docosahexaenoic acid (DHA), and eicosapentaenoic acid (EPA); (7:2 EPA/DHA,) in 100% ethanol at 40 °C. Previously, albumin (fatty acids free, Sigma-Aldrich) was prepared in William medium (25 mg/ml), prewarmed at 40 °C until solve and filtered (0.45 μm). The conjugation of BSA-FFA was added to a prewarmed 25 mg/ml BSA solution and 2 mM of two mixes fatty acids overnight (40 °C). The conjugated mix was added to a pre-warmed media (40 °C) to achieve a final FFA mix concentration of 100 μM . Mix of FFA was based on the reported composition in human plasma of participants exposed to a diet with a high content of saturated fat [18] and persons living in the Mediterranean area [19]. The mixtures included same fatty acids with two different proportions of SFA, MUFA and PUFA n-3, as Table 1 depicts. The graphical experimental design is depicted in Supplementary Fig. S1.

2.5. Red oil staining

Neutral lipids cellular content was assayed by red oil O staining as previously published [20]. Briefly, cells were seed in chamber slides, after treatments, cells were washed with ice-cold PBS and then fixed with paraformaldehyde for one h. Then, cells were stained with 0.2% oil red O solution (Sigma-Aldrich, Inc) for 4 h. Cells were washed three times with isopropanol for 10 min. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Microphotography was obtained in an Axioscope microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)

2.6. Cell functionality by MTT

Cell functionality was addressed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test, using the

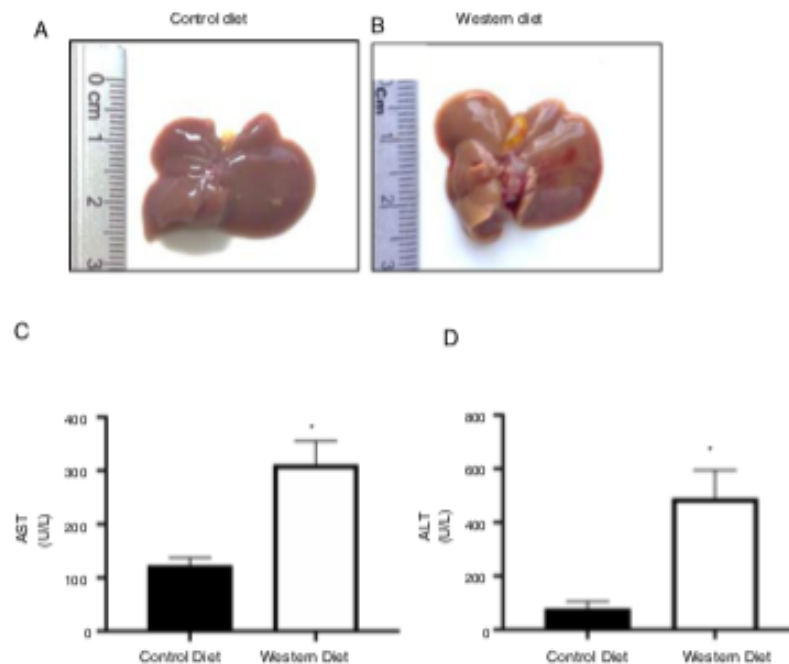


Fig. 1. Western diet induces liver dysfunction and steatosis. Macroscopic liver inspection A) Liver from mouse fed with control balanced diet; B) Liver from mouse fed with western diet for 7 days; C) Aspartate aminotransferase (AST) activity; D) Alanine aminotransferase (ALT) activity. The images are representative of at least four experimental animals. Each bar represents the mean \pm SEM in at least four different mice, * $p < 0.01$ vs control diet.

Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following manufacturer's instructions.

2.7. Reactive oxygen species determination

Reactive oxygen species (ROS) cellular content was determined by dihydroethidium (DHE, 50 μ M) fluorescence, for 15 min, in the dark, at room temperature as we previously reported [21]. DHE-derived fluorescence was recorded in a Multimodal reader (DTX 880, Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA) at wavelength 520 nm for excitation and 570 nm for emission. Data is reported in arbitrary fluorescence units (AFU).

2.8. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assayed by the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) using spectrophotometry as described previously [21].

2.9. Protein content determination

Protein content was determined using the bicinchoninic acid (BCA) kit (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instructions.

3. Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM of at least three independent experiments carried out by triplicate. Comparisons between groups were made using Student's *t* test, Mann Whitney and Tukey–Kramer test. GraphPad Prism 8 software for OSX was used to run analysis. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

4. Results

We fed BALB/c mice with either western or control diet for seven days. As Fig. 1B shows, livers from animals under western diet exhibit the characteristic pale color of steatosis, comparing with control diet (Fig. 1A) even more, these animals presented high serum activity of AST and ALT, two well-accepted markers of liver damage (Fig. 1C and D), confirming liver injury due to high lipid diet consumption.

Due to the main objective of the present work was to figure out the impact of different combination of FFA in the lipid-overloaded hepatocyte, we proceeded to liver perfusion and hepatocytes isolation and culture (Supplementary Fig. S1).

To confirm the lipid overload in hepatocytes, neutral lipids were assessed by the oil red O staining, hepatocytes from animals under western diet showed increased lipid content in comparison with hepatocytes from control mice (Fig. 2A and B). To gain more confidence, we confirmed cellular lipid accumulation biochemically by measuring both triglycerides (TG) and cholesterol content. TG increased 2.65-fold (Fig. 2C) and cholesterol 498-fold (Fig. 2D) in western diet hepatocytes regarding control.

Results clearly show that western diet induces liver impairment and lipid overloaded hepatocytes, confirming that these cells represent a good model to study the cellular effects of differential FFA mixture in steatotic hepatocytes.

Cells from both groups of animals, were treated with 100 μ M of HMPFA or HSFA mixes of FFA (Table 1) for 24 h. Interestingly, the treatment with HMPFA for 24 h remarkably decreased the lipid content (Fig. 3D) induced by western diet consumption (Fig. 3B), but no differences were observed in HSFA-treated cells (Fig. 3F). Control cells showed a slight increment in lipid content under the treatment with HMPFA, judged by oil red O staining, comparing

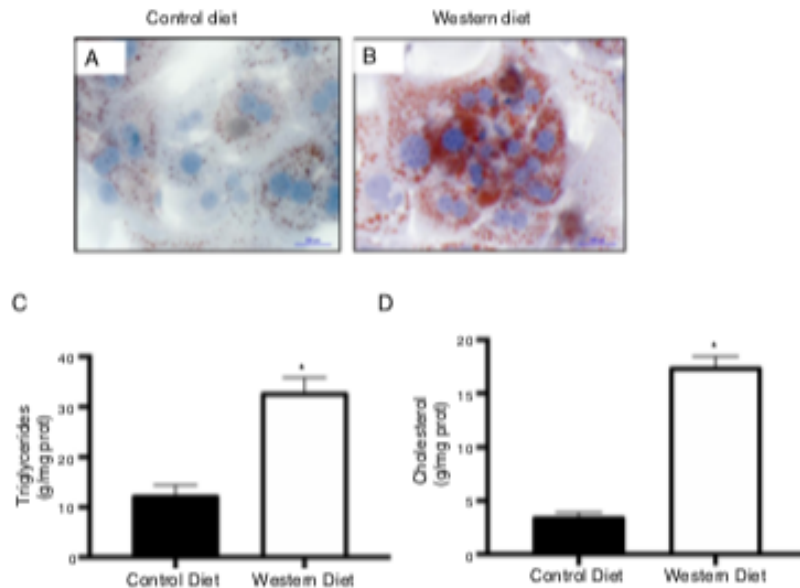


Fig. 2. Hepatocytes from mouse fed with western diet exhibits lipid overload. Neutral lipids content determined by oil red O staining. Primary hepatocytes from A) mouse fed with control balanced diet; B) mouse fed with western diet for 7 days; C) liver triglyceride content; D) liver total cholesterol content. Data are normalized versus mg of cellular total protein. The images are representative of at least four animals. Reference bar 500 μ m. Each bar represents the mean \pm SEM in at least four different mice. * $p < 0.01$ vs control diet.

with not treated control cells (Fig. 3A), however these cells treated with HSF1 observed a notable increment in lipid content (Fig. 3E). These results clearly show a favorable effect induced by the FFA Mediterranean-like mix treatment in steatotic hepatocytes.

To gain more confidence, we proceeded to biochemically measure both TG and cholesterol cellular content. Fig. 3G clearly shows that HMPFA treatment significantly reduces 2.1-fold the TG content in western hepatocytes, similar findings were found in cholesterol decreasing 1.7-fold regarding western hepatocytes (Fig. 3H), but HSF1 mix did not observe any change, remaining TG and cholesterol values similar to those observed in western hepatocytes.

Cellular functionality, addressed by MTT assay, revealed a significant improvement in cell function in western hepatocytes treated with HMPFA mix comparing with not treated western cells (Fig. 4), while HSF1 mix worsened cell function of western hepatocytes.

To gain mechanistic enlightenments, and due to oxidative stress is one of the main inducers of cell damage in steatosis as we previously published [6,7], we proceeded to measure the ROS content in cells under different treatments as previously reported [6]. Fig. 5A shows a remarkable increment in ROS in western cells compared with control hepatocytes, consistent with our previous findings. HMPFA mix remarkably reduced ROS production, while HSF1 treatment did not induce significant changes in ROS content in western hepatocytes, even more, it increased the ROS in control hepatocytes comparing with not treated cells. These data were in agreement with lipid peroxidation, a well-accepted marker of oxidative damage. Fig. 5B shows that western hepatocytes increased 208.7% the TBARS regarding control cells, while HMPFA treatment decreased them 52% regarding western hepatocytes. Interestingly, HSF1 increased TBARS in control cells, with no significant change in western hepatocytes, suggesting a kind of saturation in the oxidative damage.

5. Discussion

Recently, it has been published the last annual report to the nation on the status of cancer [22], this dossier leaves clear that liver malignancies are the most prevalent among all types of cancers. This is alarming. In part, the phenomenon could be related to the remarkable prevalence of NAFLD, not only in USA but worldwide [23], which seems to be increasing particularly by sedentary lifestyle and inadequate dietary behaviors. Although, it is well known that practically all liver diseases present a natural history starting with steatosis, this could also be as a consequence of the high consumption of fat and carbohydrates characterizing the typical western diet.

In the present work, we were aimed to address the cellular effects of different mixes of dietary FFA in lipid-overloaded primary mouse hepatocytes.

Although, many cancer-derived cell lines naturally present aberrant lipogenesis leading to lipid overload [24], the anomalous gene expression of these cells could mask potential interesting effects, particularly in metabolism, proliferation or survival. To address both, the effect of cellular lipid overload, and the impact of the treatment with specific lipids mixtures, we used a proper cellular model with naturally occurring lipid overload. Standard commercial western diet (ssniff, E15721-34) provides high content of fat and carbohydrates (crude fat, 21.2%; cholesterol, 2.071%, and carbohydrates 33.2%); certainly resembling the western diet consumed in Mexico and developed countries such as USA [25].

Hepatocytes obtained from mice fed with western diet for one week, presented a clear lipid overload characterized by increased content of TG and free cholesterol (Fig. 2). Mice under western diet presented increased serum activity of AST and ALT and the characteristic pale color of the organ, indicating liver dysfunction due to the steatosis (Fig. 1).

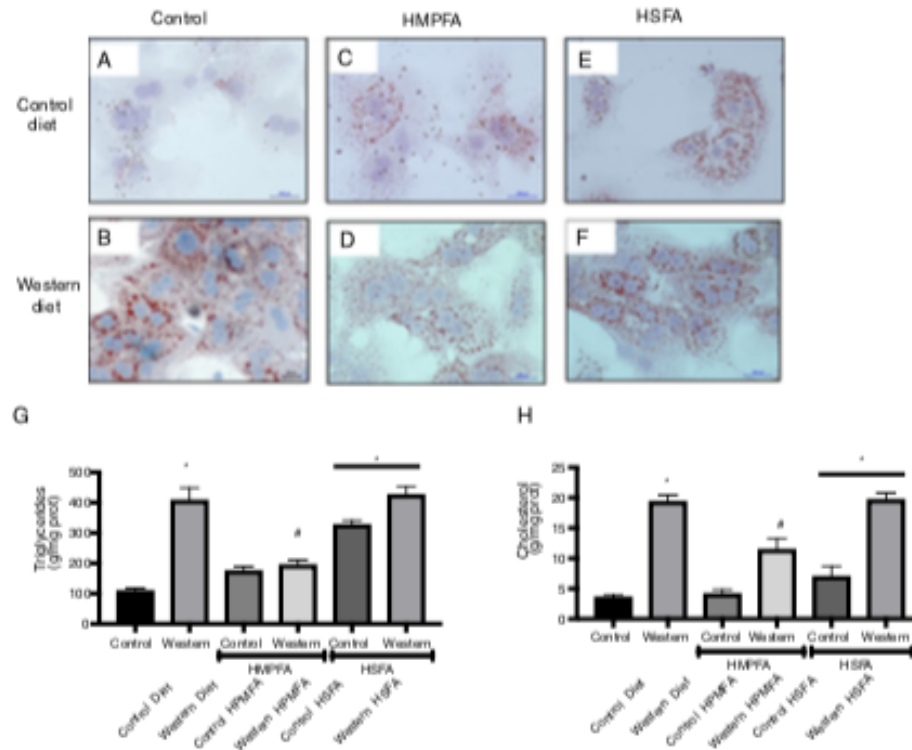


Fig. 3. Treatment with different lipid mixtures induces differential response in steatotic hepatocytes. Neutral lipids content determined by oil red O staining. Primary hepatocytes from mouse fed with control balanced control diet (A, C) and E); or western diet (B, D) and F) for 7 days. Cells were treated or not with high mono and polyunsaturated fatty acids (HMPFA) or high saturated fatty acids (HSFA) according Table 1, for 24 h. G) cellular triglycerides content and, H) total cellular cholesterol content. The images are representative of at least four animals. Reference bar 900 µm (200X original magnification). Each bar represents the mean ± SEM in at least four different mice. * p < 0.05 vs control cells; # p < 0.05 vs western cells.

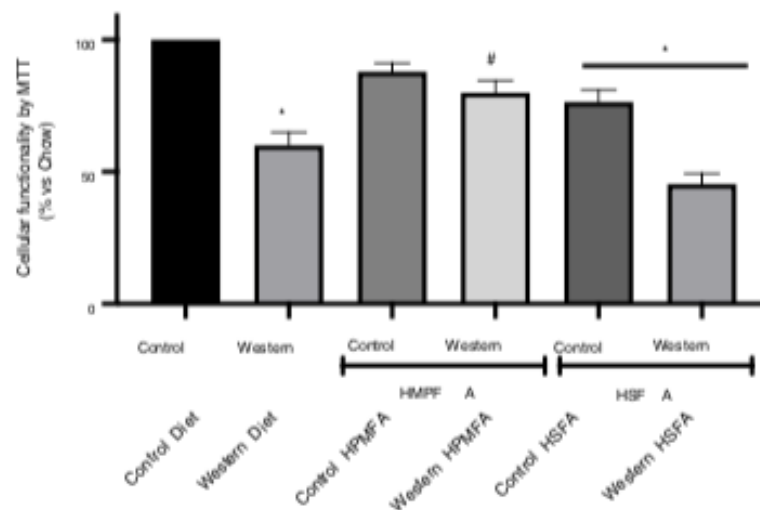


Fig. 4. Cellular functionality by MTT assay. Control and western cells were treated or not with high mono and polyunsaturated fatty acids (HMPFA) or high saturated fatty acids (HSFA) according Table 1, for 24 h. Each bar represents the mean ± SEM in at least four mice. * p < 0.05 vs control cells; # p < 0.05 vs western cells.

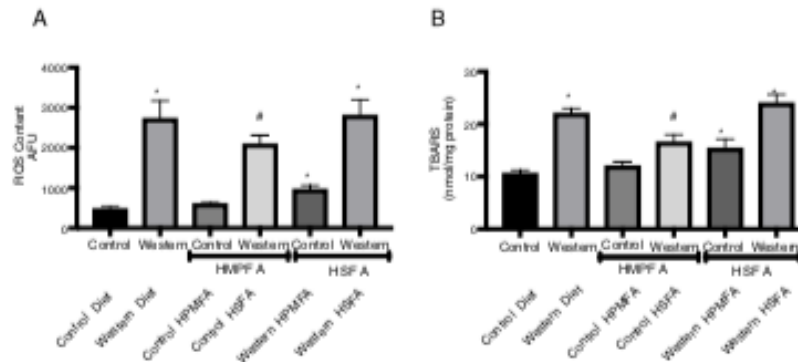


Fig. 5. Mediterranean-like mix of fatty acids protects lipid-overloaded hepatocytes from the oxidative damage. Control and western cells were treated or not with high mono- and polyunsaturated fatty acids (HMPFA) or high saturated fatty acids (HSPA) according Table 1, for 24 h. (A) Reactive oxygen species (ROS) content determined by the superoxide radical probe dihydroethidium as reported in material and methods section; (B) Lipid peroxidation assayed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Each group represents mean \pm SEM in at least three mice, * $p < 0.05$ vs control cells, # $p < 0.05$ vs western cells.

We and others have reported that is the kind of lipid rather than the amount of them that determines the grade of cellular damage [5,6,9], particularly the increment in hepatic cholesterol governs severity of liver diseases as we previously reported [8,9,26]. In our *in vitro* model, we show that cholesterol is significantly increased (5-fold) in hepatocytes. The excess of cholesterol in cells particularly targets mitochondria, inducing oxidative stress, mitochondria fission, decrement in ATP production and sensitization to damage [5,7]. Hepatocytes isolation by the two-step collagenase perfusion leads to the preservation of the steatotic phenotype, as we clearly show (Fig. 2). Cholesterol overload in addition, represents another challenge, persistent liver accumulation could induce apoptosis resistance [7] promoting tumorigenesis, as we recently reported [6].

There is no doubt regarding the problem of liver cholesterol accumulation. New alternatives directed to decrease noxious lipids are required, particularly nutritional ones.

It has been extensively published that the Mediterranean diet which is plant-centric, but moderate to low amounts of animal components, could play key role in chronic disease prevention [27–29]. Recently, it has been published that Mediterranean diet also provides beneficial effects in patients with NAFLD, diminishing parameters of severity such as lipid profile, glycemic index, serum liver enzymes activity, among others [30,31].

Focused exclusively in some the main types of FFA such as those found in plasma in persons who consume Mediterranean diet [19,32], we explored, at the cellular level, the effects induced by this FFA mix (HMPFA) on steatotic hepatocytes, comparing with a saturated FFA mix (HSPA). It is important to emphasize that both FFA mixtures are composed with the same lipids but with different content (Table 1).

It could be paradoxical, but our data clearly show that the presence of some lipids could influence the content of others. Fig. 3 depicts that HMPFA induces lipid content reduction in western hepatocytes, while HSPA seems to have no influence judged by oil red staining.

In addition to essential nutritional functions, FFA activate multiple signaling pathways, particularly those related to metabolism, by interacting with specific FFA receptors [33]. It is evident that HMPFA are activating changes in lipid metabolism or mobility, effect not observed with the saturated-rich mix. Although, both lipid combinations have the same fatty acids, the HMPFA has more n-3 PUFA. Some studies have shown that dietary supplementation with n-3 PUFA in obese mice under a high fat diet reduces hepatic lipid content, normalize TG with an improvement in the inflam-

matory response and decreasing oxidative stress, favoring insulin sensitivity, same effects have been observed in hepatic cells with lipid overload [34–36].

It is interesting that HMPFA exerted differential effect preferential controlling TG (Fig. 3G) rather than cholesterol (Fig. 3H), although cholesterol certainly decreased with the HMPFA treatment regarding untreated animal under western diet, cholesterol levels remain significantly increased when comparing with cells from control diet fed mice however, the decrement in cholesterol was related to an improvement in mitochondrial function judged by MTT test (Fig. 4).

It has been extensively published that cholesterol overload in hepatic cells is particularly relevant in mitochondrial functionality. Cholesterol accumulates in this organelle inducing oxidative stress and sensitization to a second insult [5,6,9].

Our data clearly show that, although the decrement of cholesterol induced by HMPFA treatment, it did not reach basal values, but it was good enough to decrease ROS content (Fig. 5A) and oxidative damage, judged by lipid peroxidation (Fig. 5B). Although, it has been observed that Mediterranean diet has the ability to decrease ROS by a polyphenol-dependent mechanism [37], the antioxidant properties elicited by mono or polyunsaturated FFA should be revisited, particularly in the context of NAFLD as recently published [11], and as our results clearly show.

Olive oil represents the main fat source in the Mediterranean diet, it is composed particularly of monounsaturated fatty acids (mainly oleic acid, 55–83%) and polyunsaturated fatty acids (4–20%) [11], in fact these FFA are excellent ROS scavengers due to the capacity of their double bonds to react with reactive substances, our data provide evidence that the HMPFA induced a decrement in ROS content and cellular lipid peroxidation (Fig. 5), mediated by the western diet.

PUFA, particularly n-3, have demonstrated to display protective effects in the liver, in fact, it is well known that enteral nutrition in hospitals is associated to deterioration of liver function, n-3 PUFA induced an improvement in the liver [38], the effect was associated to the downregulation of Cyp450 enzymes, this could represent an adaptive mechanism tending to improve oxidative stress phenomena.

Aside this remarkable protective effect induced by HMPFA, the HSPA mix did not exert any change in lipid-overloaded hepatocytes. As expected, treatment with HSPA in control hepatocytes increased cellular lipid overload by a significant increment of TG but not cholesterol. HSPA treatment resulted in a slight increment in ROS content and lipid peroxidation.

6. Conclusion

Our results show that combination of increased proportions of MUFA and PUFA exert cellular protective effects by controlling the levels of TG and cholesterol and decreasing the ROS production and the oxidative damage in hepatocytes with lipid overload induced by the feeding of a western diet. Consumption of increased combination of MUFA and PUFA and low content of saturated FFA, induces a protective effect in steatotic hepatocytes, leading to the improvement of cellular function by decreasing oxidative stress. The ingestion HMPFA (or Mediterranean-like diet) could potentially be a good adjuvant treatment in fatty liver diseases. Although, the *in vitro* study is confined to the effects in the hepatocytes, validation *in vivo* models and, even more in humans, would be of great interest to establish dietary supportive intervention in the treatment of NAFLD.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by National Institute of Genomic Medicine. Cátedra Nestlé-INMEGEN, CONACYT: Fronteras de la Ciencia 1320 and CB-252942. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.06.005>.

References

- Spengler EK, Loomba R. Recommendations for diagnosis, referral for liver biopsy, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc* 2015;90:1233–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjocp.2015.06.013>.
- Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookkian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15080. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>.
- Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 2011;364:2392–404. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1014295>.
- Costa CS, Del-Ponte B, Assuncao MCF, Santos IS. Consumption of ultra-processed foods and body fat during childhood and adolescence: a systematic review. *Public Health Nutr* 2018;21:148–59. <http://dx.doi.org/10.1017/S1368898017001331>.
- Mari M, Caballero F, Colletti A, Morales A, Caballero J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;4:85–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>.
- Enriquez-Cortina C, Bello-Monroy O, Rosales-Cruz P, Souza V, Miranda RU, Toledo-Perez R, et al. Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis. *Oncotarget* 2017;8:104136–48. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.22024>.
- Dominguez-Perez M, Simoni-Nieves A, Rosales P, Nuno-Lambarri N, Rosales-Lemus M, Souza V, et al. Cholesterol burden in the liver induces mitochondrial dynamic changes and restricts cell apoptosis. *J Cell Physiol* 2019;234:7213–23. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27474>.
- Lopez-Islas A, Chagoya-Hazas V, Perez-Aguilar B, Palestino-Dominguez M, Souza V, Miranda RU, et al. Cholesterol enhances the toxic effect of ethanol and acetaldehyde in primary mouse hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:9209825. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9209825>.
- Nuno-Lambarri N, Dominguez-Perez M, Baulies-Domenech A, Monte MJ, Marin JJ, Rosales-Cruz P, et al. Liver cholesterol overload aggravates obstructive cholestasis by inducing oxidative stress and premature death in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:9895176. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9895176>.
- Gomez-Quiroz LE, Seo D, Lee YH, Kitade M, Gaiser T, Gillen M, et al. Loss of c-Met signaling sensitizes hepatocytes to lipotoxicity and induces cholestatic liver damage by aggravating oxidative stress. *Toxicology* 2016;361:362–39–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.004>.
- Abenavoli L, Milanovic M, Milic N, Lizza F, Guaffie AM. Olive oil antioxidants and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;13:739–49. <http://dx.doi.org/10.1080/17474124.2019.1634544>.
- Albracht-Schulte K, Gonzalez S, Jackson A, Wilson S, Ramalingam L, Kalyanana NS, et al. Eicosapentaenoic acid improves hepatic metabolism and reduces inflammation independent of obesity in high-fat-fed mice and in HepG2 cells. *Nutrients* 2019;11. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11030599>.
- Zeng X, Zhu M, Liu X, Chen X, Yuan Y, Li L, et al. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr Metab (Lond)* 2020;17:11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-020-0434-8>.
- Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takekoshi Y, et al. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2015;35:582–90. <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12685>.
- Chiappini F, Colly A, Kadar H, Gual P, Tran A, Desterie C, et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep* 2017;7:46658. <http://dx.doi.org/10.1038/srep46658>.
- Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Cousoarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts sex homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2008;283:14581–9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M707733200>.
- Nafjberg H, Young JF, Bettram HC, Afseth NK, Host V, Kohler A. High-throughput FTIR spectroscopy of intact HepG2 cells reveals additive and non-additive effects of individual fatty acids when given as mixtures. *J Biophotonics* 2013;6:446–56. <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201200073>.
- Hudson L, Eyles HC, McLachlan RJ, Bell ML, Green TJ, Sheaff CM. Plasma and erythrocyte fatty acids reflect intake of saturated and n-6 PUFA within a similar time frame. *J Nutr* 2014;144:33–41. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.113.183749>.
- Jenab M, Slimani N, Bictash M, Ferrari P, Bingham SA. Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. *Hum Genet* 2009;125:507–25. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-009-0662-5>.
- Hernandez I, Dominguez-Perez M, Bucio I, Souza V, Miranda RU, Clemens DL, et al. Free fatty acids enhance the oxidative damage induced by ethanol metabolism in an *in vitro* model. *Food Chem Toxicol* 2015;76:109–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.005>.
- Salas-Silva S, Simoni-Nieves A, Razouf MV, Lopez-Ramirez J, Barrera-Chimal J, Lazzarini R, et al. HGF induces protective effects in alpha-naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis by counteracting oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2020;174:113812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113812>.
- Henley SJ, Ward EM, Scott S, Ma J, Anderson RN, Fiath AU, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: national cancer statistics. *Cancer* 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.32802>.
- Perumpallil BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholanikeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2017;23:8263–76. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i47.8263>.
- Gerardo-Ramirez M, Lazzarini-Lechuga R, Hernandez-Rizo S, Jimenez-Salazar JE, Simoni-Nieves A, Garcia-Ruiz C, et al. GDF11 exhibits tumor suppressive properties in hepatocellular carcinoma cells by restricting clonal expansion and invasion. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019;1865:1540–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2019.03.009>.
- Batis C, Hernandez-Barrera L, Baquetta S, Rivera JA, Popkin BM. Food acculturation drives dietary differences among Mexican, Mexican American, and Non-Hispanic Whites. *J Nutr* 2011;141:1898–906. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.141473>.
- Lopez-Reyes A, Clavijo-Cornejo D, Fernandez-Torres J, Medina-Luna D, Estrada-Villaseñor EG, Gomez-Quiroz LE, et al. Fast morphological gallbladder changes triggered by hypercholesterolemic diet. *Ann Hepatol* 2018;17:85–93. <http://dx.doi.org/10.5604/030010012.3160>.
- Trichopoulos A, Martinez-Gonzalez MA, Tong TY, Forouhi NG, Khandehwal S, Puthakaran D, et al. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Med* 2014;12:112. <http://dx.doi.org/10.1186/1745-7115-12-112>.
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adhering to evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1189–96. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2010.29673>.
- Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Effectiveness of the Mediterranean diet: can it help delay or prevent Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2010;20:795–801. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2010-1418>.
- Moosavi SP, Arab A, Paknahad Z. The effect of a Mediterranean diet on metabolic parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review of randomized controlled trials. *Clin Nutr ESPEN* 2020;35:40–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.10.008>.
- Bullon-Vela V, Abete I, Tur JA, Pinto X, Cosheilla E, Martinez-Gonzalez MA, et al. Influence of lifestyle factors and staple foods from the Mediterranean diet on non-alcoholic fatty liver disease among older individuals with metabolic syndrome features. *Nutrition* 2020;71:110620. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2019.110620>.
- Saadatian-Elahi M, Slimani N, Chajes V, Jenab M, Goudable J, Biessy C, et al. Plasma phospholipid fatty acid profiles and their association with food intake: results from a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 2009;89:331–45. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2008.26834>.

- [33] Hara T, Kimura I, Inoue D, Ichimura A, Hirasawa A. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2013;164:77–116. http://dx.doi.org/10.1007/112_2013_33.
- [34] Valenzuela R, Espinosa A, Gonzalez-Manan D, D'Espessailles A, Fernandez V, Videla LA, et al. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS One* 2012;7:e46400. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046400>.
- [35] Jung UJ, Millman PN, Tall AR, Deckelbaum RJ. n-3 fatty acids ameliorate hepatic steatosis and dysfunction after LXR agonist ingestion in mice. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811:491–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.003>.
- [36] Kang S, Huang J, Lee BK, Jung YS, Im E, Koh JM, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect human hepatoma cells from developing steatosis through FFA4 (GPR120). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:105–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.002>.
- [37] Abenavoli I, Boccuto L, Federico A, Dallio M, Loguercio C, Di Renzo L, et al. Diet and non-alcoholic fatty liver disease: the Mediterranean way. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16073011>.
- [38] Belymnikova K, Daskova N, Vrzackova N, Harant K, Heczkova M, Podzimkova K, et al. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the liver lipidome, proteome and bile acid profile: parenteral versus enteral administration. *Sci Rep* 2019;9:19097. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54225-8>.

