

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

Efecto de la semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) dietaria sobre la homeostasis de la glucosa, inflamación, fibrosis y estrés oxidativo hepático en un modelo de Síndrome Metabólico experimental

Lic. Michelle Berenice Vega Joubert

Directora de tesis: Dra. María Eugenia D'Alessandro

Co-directora de tesis: Dra. María Eugenia Oliva

Lugar de realización: Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas relacionadas con la Nutrición. Cátedra de Química Biológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL

AÑO: 2026

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a quienes han colaborado y hecho posible la realización de este trabajo de tesis.

En lo institucional quisiera mostrar mi agradecimiento a la Universidad Nacional del Litoral, en particular a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas que me brindó la posibilidad de realizar mi formación de posgrado en esta casa de estudios. Al Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas relacionadas con la Nutrición –Cátedra de Química Biológica por darme la posibilidad de pertenecer al grupo, formar parte de sus proyectos, y permitirme desarrollar profesionalmente. Asimismo, agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca doctoral que hizo posible la realización de este trabajo de tesis.

Un agradecimiento enorme a mi directora Dra. María Eugenia D'Alessandro y codirectora Dra. María Eugenia Oliva por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio, por su dedicación puesta en mi crecimiento, por su apoyo y compromiso. Gracias por su responsabilidad y profesionalismo, pero ante todo gracias por su calidad humana.

A los docentes, investigadores y colegas del laboratorio quienes me han brindado su apoyo y motivación durante estos años de trabajo y estudio.

A mi familia, por siempre estar presente, por inculcarme valores como el compromiso y el esfuerzo, y por su apoyo incondicional en mi formación académica. Gracias por recibirme siempre con tanto amor y alegría.

A mis amigas, por su apoyo y comprensión en mis ausencias debido al estudio, y por la alegría y diversión de cada encuentro.

A todos ellos mis más sentidos agradecimientos

APORTES CIENTIFICOS-TECNOLÓGICOS

1. **Vega Joubert, M. B.**, Oliva M. E, Ingaramo P., D'Alessandro M. E. (2025). α -Linolenic acid rich-chia seed improves glucose tolerance, modulates gluconeogenic pathway and hepatic insulin signaling in an experimental model of Metabolic Syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 20:112643. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2025.112643>
2. **Vega Joubert, M. B.**, Degraeve, V., Ingaramo, P., Oliva, M. E., & D'Alessandro, M. E. (2022). *Salvia hispanica* L. (chia) seed improves liver inflammation and endothelial dysfunction in an experimental model of metabolic syndrome. *Food & Function*, 13(21), 11249–11261. <https://doi.org/10.1039/d2fo02216h>
3. **Vega Joubert, M. B.**, Ingaramo, P., Oliva, M. E., & D'Alessandro, M. E. (2022). *Salvia hispanica* L. (chia) seed ameliorates liver injury and oxidative stress by modulating Nrf2 and NF κ B expression in sucrose-rich diet-fed rats. *Food & Function*, 13(13), 7333–7345. <https://doi.org/10.1039/d2fo00642a>
4. Oliva, M. E., Ingaramo, P., **Vega Joubert, M. B.**, Ferreira, M. R. & D'Alessandro, M. E. (2021). Effects of *Salvia hispanica* L. (chia) seed on blood coagulation, endothelial dysfunction and liver fibrosis in an experimental model of Metabolic Syndrome. *Food & Function*, 12, 12407-12420. <https://doi.org/10.1039/D1FO02274A>

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	8
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	14
INTRODUCCIÓN.....	17
1. Síndrome Metabólico: Prevalencia, causas y consecuencias.....	18
2. Generalidades del tejido hepático.....	24
3. Tejido hepático en situaciones patológicas.....	36
3.1 Alteraciones del metabolismo lipídico y glucídico.....	36
3.2 Estrés oxidativo.....	37
3.3 Inflamación hepática.....	37
3.4 Fibrosis hepática.....	38
4. Modelo experimental inducido por ingesta de dieta rica en sacarosa.....	39
5. Ácidos grasos n-3 como estrategia de reversión del daño hepático.....	43
5.1 Semilla de <i>Salvia hispánica</i> L. (chia).....	44
6.1.1. Origen, cultivo y características botánicas.....	44
6.1.2. Composición de la semilla de chia.....	46
6.1.3. Usos de la semilla de chia.....	48
6.1.4 Estudios experimentales y clínicos con semilla de chia.....	49
HIPÓTESIS.....	53
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y METODOS.....	57
1. Diseño experimental.....	58
2. Seguimiento de los animales durante el período experimental.....	62
3. Obtención de muestras de sangre y tejidos.....	62
4. Procedimientos experimentales.....	63
4.1. Determinaciones séricas.....	63
4.1.1. Glucosa.....	63
4.1.2. Insulina.....	63
4.1.3. Triacilglicéridos (TG).....	63
4.1.4. Ácidos grasos no esterificados (AGNE).....	63
4.1.5. Colesterol total (CT).....	63
4.1.6. Ácido úrico.....	64

4.1.7. Transaminasa glutámico pirúvico (GPT) y Transaminasa glutámico oxalacética (GOT).....	64
4.1.8. Fosfatasa alcalina.....	64
4.1.9. Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP).....	64
4.1.10. Citoquinas plasmáticas.....	64
4.2. Determinaciones en tejido hepático.....	65
4.2.1. Determinación de metabolitos.....	65
4.2.1.1. Contenido de TG.....	65
4.2.1.2. Cuantificación de niveles de hidroxiprolina.....	65
4.2.1.3. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	65
4.2.1.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	66
4.2.1.5. FRAP.....	66
4.2.1.6. Glutación.....	67
4.2.2. Determinación de actividades enzimáticas.....	67
4.2.2.1. Mieoloperoxidasa (MPO).....	67
4.2.2.2. Glucoquinasa (GK) y Hexoquinasa (HK).....	68
4.2.2.3. Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa).....	68
4.2.2.4. Fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa).....	69
4.2.2.5. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK).....	69
4.2.2.6. Superoxido dismutasa (SOD).....	70
4.2.2.7. Catalasa (CAT).....	70
4.2.2.8. Glutación peroxidasa (GPx).....	71
4.2.2.9. Glutación reductasa (GR).....	72
4.2.3. Análisis histológicos.....	72
4.2.3.1. Preparación y tinción de cortes histológicos.....	72
4.2.3.2. Análisis de preparados histológicos.....	72
4.2.4. Evaluación de la expresión de proteínas por inmunohistoquímica.....	73
4.2.5. Real-time PCR.....	74
4.2.6. Western Blot.....	75
4.2.6.1. Niveles de masa proteica de Nrf2, NF-κB, GLUT-2, PAI-1, F4/80, AMPK, p-AMPK, IL-1β y p-AKT ^{Ser473}	75
1. Preparación de extractos proteicos.....	75
2. Determinación por Western Blot.....	76
4.2.7. Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.....	77
4.3. Determinaciones in vivo.....	78
4.3.1. Test de tolerancia endovenoso a la glucosa.....	78
4.3.2. Determinaciones post estímulo insulínico.....	78

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
REACTIVOS.....	79
RESULTADOS.....	80
1. Peso corporal, ganancia de peso e ingesta energética.....	81
2. Bioquímica del suero.....	82
3. Peso del tejido hepático y parámetros histomorfométricos.....	83
4. Contenido de TG en hígado.....	85
5. Marcadores de fibrosis hepática.....	85
5.1. Contenido de colágeno e hidroxiprolina.....	85
5.2. Expresión proteica de TGF- β 1.....	87
6. Marcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes.....	88
6.1. Peroxidación lipídica y especies reactivas del oxígeno.....	88
6.2. Sistema de defensa antioxidante.....	90
7. Marcadores asociados a inflamación.....	92
7.1. Citoquinas pro y anti-inflamatorias.....	92
7.2. Expresión y niveles de masa proteica de F4/80 y actividad de la enzima MPO.....	94
7.3. Factores de transcripción asociados a estrés oxidativo e inflamación.....	96
8. Prueba <i>in vivo</i>	98
8.1. Test de tolerancia endovenoso a la glucosa (TTEVG).....	98
9. Transporte y fosforilación de glucosa, neoglucogénesis y vía de señalización de la insulina.....	99
9.1. Niveles de masa proteica del transportador hepático de glucosa GLUT-2.....	99
9.2. Actividad de enzimas involucradas en la fosforilación de la glucosa y neoglucogénesis.....	99
9.3. Expresión proteica de IRS-1.....	102
9.4. Expresión relativa del ARNm de PI3K hepático.....	102
9.5. Niveles de masa proteica de p-AKT ^{Ser473} hepática en condiciones no estimuladas y bajo estímulo con insulina.....	103
9.6. Niveles de masa proteica de AMPK y p-AMPK.....	104
9.7. Expresión relativa del ARNm de FoxO1 hepático.....	105
9.8. Expresión proteica de PGC-1 α hepático.....	106
10. Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana del tejido hepático.....	107
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIÓN.....	120

BIBLIOGRAFÍA.....123

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA: Ácido araquidónico

AACE: *American Association of Clinical Endocrinologist*

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosina difosfato

AGNE: Ácidos grasos no esterificados

AKT: Serina/treonina proteinquinasa

p-AKT: Serina/treonina proteinquinasa fosforilada

AL: Ácido linoleico

ALA: Ácido α -linolénico

ALAD: Asociación Latinoamericana de Diabetes

AMPK: Quinasa activada por AMP

AMP: Adenosina monofosfato

ANG II: Angiotensina II

ATP: Adenosina trifosfato

CAT: Catalasa

CHC: Carcinoma hepatocelular

CPT-1: Carnitina palmitoiltransferasa 1

DHA: Ácido docosahexaenoico

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DPA: Ácido docosapentaenoico

DR: Dieta de referencia

DRS: Dieta rica en sacarosa

DRS+Chia: Dieta rica en sacarosa + semilla de chia

ECV: Enfermedad cardiovascular

EGIR: *European Group for Insulin Resistance*

EPA: Ácido Eicosapentaenoico

FAS: Sintasa de ácidos grasos

Fructosa-6P: Fructosa-6 fosfato

FBPasa: Fructosa-1,6-bifosfatasa

FoxO1: Forkhead box O1

GLUT-2: Transportador de glucosa 2

G6P: Glucosa 6 fosfato

G6Pasa: Glucosa 6 Fosfatasa

G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

HQ: Hexoquinasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

IDF: *International Diabetes Federation*

IL-6: Interleuquina 6

IL-10: Interleuquina 10

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-12: Interleuquina 12

IL-18: Interleuquina 18

IR: Receptor de insulina

IRS 1: Sustrato del receptor de insulina 1

IRS 2: Sustrato del receptor de insulina 2

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

MASLD: Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica.

MASH: Esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica

MDA: Malondialdehído

MEC: Matriz extracelular

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NCEP ATP III: *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

Nrf2: Factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PCR: Proteína C reactiva

PDHc: Complejo piruvato deshidrogenasa

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PGC-1 α : Coactivador 1-alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa

PPAR α : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

RI: Resistencia a la insulina

RAS: Sistema renina angiotensina

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

ROS: Sustancias reactivas del oxígeno

SHR: Ratas espontáneamente hipertensas

SM: Síndrome metabólico

SOD: Superóxido dismutasa

SREBP-1: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TG: Triacilglicéridos

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de factores de riesgo metabólicos interrelacionados que incluyen obesidad central, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y dislipidemia aterogénica, y se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y Diabetes mellitus tipo 2. El aumento sostenido de su incidencia en las últimas décadas, lo posiciona como un problema de salud pública a nivel mundial.

El hígado, además de desempeñar un rol central en el metabolismo de los lípidos, los carbohidratos y las proteínas, es un órgano clave en el mantenimiento de la homeostasis metabólica sistémica. Su disfunción se reconoce actualmente como un componente fundamental en el desarrollo y la progresión del SM. Si bien la patogenia del SM es compleja y aún no se encuentra completamente dilucidada, la interacción de factores genéticos, metabólicos y ambientales, entre ellos los nutricionales, cumple un rol determinante.

Entre las fuentes vegetales de ácidos grasos n-3, la semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) se destaca por su elevado contenido de ácido α -linolénico (ALA, 18:3 n-3). Además, la semilla de chia presenta un elevado contenido de proteínas, superior al de otras semillas, así como fibra dietética y diversos compuestos con actividad antioxidante. Este perfil nutricional la posiciona como una alternativa de origen vegetal de interés frente a las fuentes tradicionales de n-3 de origen marino.

En estudios previos de nuestro grupo, realizados en un modelo experimental ampliamente reconocido de SM y trastornos relacionados inducido por la administración crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS), se demostró que la administración de semilla de chia fue capaz de mejorar el metabolismo lipídico hepático alterado, así como parámetros de la coagulación y disfunción endotelial. Sin embargo, hasta el momento no han sido explorados los efectos de la semilla de chia sobre mecanismos vinculados con la neoglucogénesis, resistencia a la insulina, inflamación, fibrosis y estrés oxidativo hepático en el modelo experimental de SM.

De lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo fue: “Estudiar en un modelo experimental consolidado, que mimetiza el fenotipo del Síndrome Metabólico (SM) humano, posibles mecanismos que puedan mediar el efecto beneficioso de la semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) sobre el mejoramiento de la homeostasis de la glucosa, resistencia insulínica, inflamación, fibrosis y estrés oxidativo en tejido hepático”.

Para llevar a cabo este objetivo ratas macho Wistar (8 semanas de edad) recibieron durante 3 meses una DRS (60% energía) conteniendo como fuente de grasa aceite de maíz. Al cabo de este período las ratas que recibieron la DRS se dividieron en 2 subgrupos: uno continuó con la DRS hasta los 6 meses de ingesta, mientras que el otro recibió una DRS conteniendo semilla de chia como fuente de grasa dietaria en reemplazo del aceite de maíz por 3 meses adicionales. Otro grupo de animales (grupo de referencia) recibió una dieta estándar comercial para roedores durante todo el período experimental (6 meses).

En el presente trabajo demostramos que la semilla de chia promueve una marcada reducción de las enzimas indicadoras de daño hepático (GOT, GPT y FA en suero), así como también, del contenido de gotas lipídicas y puntaje NAS en el tejido hepático. Además, la intervención con semilla de chia redujo el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, evidenciado por la disminución del contenido de ROS, TBARS y de la expresión de 4-HNE, junto con una restauración del sistema de defensas antioxidantes. En este sentido, se incrementaron los niveles de FRAP y GSH, así como la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx, GR y SOD. Estos efectos se asociaron con un aumento del factor de transcripción Nrf2 y una disminución de NF- κ B. Esto se relacionó con una reducción del depósito de colágeno, de los niveles de hidroxiprolina, y de TGF- β , junto a una disminución de marcadores inflamatorios, tales como F4/80, la actividad de la MPO y de citoquinas proinflamatorias (PAI-1 e IL-6) incrementando los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Finalmente, la administración de semilla de chia mejoró la homeostasis hepática de la glucosa, reflejada en una mejor tolerancia a la glucosa y un aumento de la capacidad de fosforilación de la glucosa, evidenciado por la mayor actividad de la GK. Además, fue capaz de reducir la actividad de enzimas neoglucogénicas (G6Pasa, FBPasa y PEPCK) y el factor de transcripción FoxO1. Estos efectos se acompañaron de una mejora en moléculas clave de señalización de la insulina (p-AKT y PI3K), así como de la restauración del sensor metabólico AMPK y p-AMPK, junto con el transportador hepático de glucosa GLUT-2. Cabe destacar que estos hallazgos se acompañaron de un enriquecimiento en PUFA n-3 y una reducción del ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6), lo que dio lugar a un aumento de la relación n-3/n-6 en los fosfolípidos de la membrana plasmática del tejido hepático.

En conclusión, la intervención con semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) ejerce efectos beneficiosos sobre la morfología y metabolismo del tejido hepático en el modelo experimental de SM inducido por la ingesta crónica de una DRS. En conjunto, estos resultados posicionan a la semilla de chia como una intervención dietética prometedora con potencial impacto favorable sobre la salud hepática y el cuidado metabólico general.

SUMMARY

Metabolic syndrome (MS) is a cluster of interrelated metabolic risk factors that includes central obesity, high blood pressure, insulin resistance, and atherogenic dyslipidemia, and is associated with an increased risk of developing cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. The steady rise in its incidence over the past few decades has made it a global public health problem.

The liver, in addition to playing a central role in the metabolism of lipids, carbohydrates, and proteins, is a key organ in maintaining systemic metabolic homeostasis. Its dysfunction is now recognized as a fundamental component in the development and progression of MS. Although the pathogenesis of MS is complex and not yet fully understood, the interaction of genetic, metabolic, and environmental factors, including nutritional factors, plays a decisive role.

Among plant sources of n-3 fatty acids, the seed of *Salvia hispanica* L. (chia) highlight for its high content of α -linolenic acid (ALA, 18:3 n-3). In addition, chia seeds have a high protein content, higher than that of other seeds, as well as dietary fiber and various compounds with antioxidant activity. This nutritional profile positions chia as a plant-based alternative of interest to traditional marine-derived n-3 sources.

In previous studies conducted by our group, using a widely recognized experimental model of MS and related disorders induced by chronic administration of a sucrose-rich diet (SRD), chia seed administration has been shown to improve altered hepatic lipid metabolism, as well as parameters of coagulation and endothelial dysfunction. However, until now, the effects of chia seed on mechanisms related to gluconeogenesis, insulin resistance, inflammation, fibrosis, and hepatic oxidative stress have not been explored in the experimental model of MS.

Based on the above, the general objective of this study was: “To study, in a consolidated experimental model that mimics the phenotype of human MS, possible mechanisms that may mediate the beneficial effect of *Salvia hispanica* L. (chia) seeds on improving glucose homeostasis, insulin resistance, inflammation, fibrosis, and oxidative stress in liver tissue”.

To achieve this objective, male Wistar rats (8 weeks of age) were fed a SRD (60% of energy) containing corn oil as the fat source for 3 months. At the end of this period, the rats that received SRD were divided into two subgroups: one continued on the SRD for a total of 6 months, whereas the other received an SRD in which chia seed replaced corn oil as the dietary fat source for an additional 3 months. Another group of animals (reference group) was fed a standard commercial rodent diet throughout the experimental period (6 months).

In the present study, we demonstrated that chia seed promotes a marked reduction in serum enzymes indicative of hepatic injury (AST, ALT, and ALP), as well as a decrease in lipid droplet content and the NAFLD activity score (NAS) in hepatic tissue. In addition, chia seed intervention reduced oxidative stress and lipid peroxidation, as evidenced by decreased ROS and TBARS

levels and reduced 4-HNE expression, together with reestablishment of the antioxidant defense system. In this context, FRAP and GSH levels, as well as the activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx, GR, and SOD, were increased. These effects were associated with upregulation of the transcription factor Nrf2 and downregulation of NF- κ B. These effects were associated with reduced collagen deposition, lower hydroxyproline levels, and decreased TGF- β expression, together with a reduction in inflammatory markers such as F4/80, MPO activity, and proinflammatory cytokines (PAI-1 and IL-6), along with increased levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Finally, chia seed administration improved hepatic glucose homeostasis, as reflected by improved glucose tolerance and increased glucose phosphorylation ability, evidenced by higher GK activity. In addition, it reduced the activity of gluconeogenic enzymes (glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-bisphosphatase, and PEPCK) and the transcription factor FoxO1. These effects were accompanied by improvements in key insulin signaling molecules (p-AKT and PI3K), as well as restoration of the metabolic sensor AMPK and p-AMPK, together with the hepatic glucose transporter GLUT-2. Notably, these findings were associated with an enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids and a concomitant decrease in arachidonic acid (AA, 20:4 n-6), thereby increasing the n-3/n-6 ratio in hepatic plasma membrane phospholipids.

In conclusion, dietary intervention with *Salvia hispanica* L. (chia) seed exerts beneficial effects on hepatic morphology and metabolic function in an experimental model of MS induced by chronic consumption of a SRD. Collectively, these findings support chia seed as a promising dietary strategy with potential beneficial effects on hepatic health and overall metabolic management.

INTRODUCCIÓN

1. Síndrome Metabólico: Prevalencia, causas y consecuencias

El Síndrome Metabólico (SM) es considerado una epidemia silenciosa que representa un importante problema de salud pública a nivel mundial. Éste abarca un conjunto de alteraciones metabólicas interrelacionadas que incluyen obesidad central, resistencia a la insulina (RI), dislipidemia, hipertensión arterial, estrés oxidativo, estado protrombótico e inflamatorio, esteatosis hepática, entre otros (Ahmed et al., 2022; Silveira Rossi et al., 2022). Esta condición se asocia con un aumento significativo del riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). En particular, se ha reportado que el SM multiplica por cinco el riesgo de DM2, duplica el riesgo de ECV en los próximos 5 a 10 años, aumenta de 2 a 4 veces el riesgo de accidente cerebrovascular, e incrementa de 3 a 4 veces el riesgo de infarto de miocardio. Además, las personas con SM presentan un riesgo dos veces mayor de morir por alguno de estos eventos en comparación con quienes no presentan este síndrome (Bovolini et al., 2021).

Estudios epidemiológicos evidencian que la prevalencia del SM ha aumentado de manera sostenida, consolidándose como un fenómeno global. Se estima que entre el 20 y el 30 % de la población adulta mundial presenta SM (Engin, 2017; Grundy, 2008). En Argentina, la prevalencia alcanza el 28,7 % (Díaz et al., 2018), lo que indica que aproximadamente uno de cada cuatro adultos cumple los criterios diagnósticos, aunque se considera que esta cifra probablemente subestima la incidencia real. Tradicionalmente considerado un trastorno del adulto, el SM ha comenzado a observarse con mayor frecuencia en poblaciones pediátricas y adolescentes. En 2020, se reportó que el 3 % de los niños y el 5 % de los adolescentes a nivel mundial presentaban este síndrome, y su prevalencia aumenta progresivamente con la edad, alcanzando alrededor del 40 % en personas mayores de 60 años. El SM afecta tanto a hombres como a mujeres, aunque en determinados grupos étnicos su frecuencia es mayor en mujeres (Swarup et al., 2024).

Diversas organizaciones han propuesto diferentes criterios diagnósticos clínicos para el SM. La **Tabla 1** resume los criterios utilizados según los principales organismos internacionales. La *International Diabetes Federation* (IDF) y la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) incluyen a la obesidad abdominal como requisito principal y necesario (IDF-2019; Rosas Guzmán et al., 2010). Es importante destacar que la adiposidad abdominal es estimada generalmente utilizando métodos antropométricos indirectos, tales como el perímetro de cintura y la relación cintura/cadera, entre otros (Rosales- Ricardo, 2012). Para la Organización Mundial de la Salud (OMS- 1999) y el *European Group for Insulin Resistance* (2002), la RI constituye la base fundamental para el diagnóstico del SM (Aydin et al., 2014; Balkau et al., 1999). Mientras que los criterios diagnósticos del *Adult Treatment Panel III* (ATP III-2004) -como parte de un programa educativo para la prevención de la enfermedad coronaria (*National Cholesterol*

Education Program- NCEP)- no incluyen a la RI como componente fundamental y no se “centran en la glucosa”, dando igual importancia para el diagnóstico a las anormalidades del metabolismo de la glucosa y al resto de los componentes (Rubio et al., 2004). El informe realizado por un grupo de expertos de la *American Association of Clinical Endocrinologist* (AACE-2011) considera al aumento de las concentraciones de glucosa (alteración de la glucosa en ayuno pero no DM2) como criterio principal (Handelsman et al., 2011).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico clínico de SM según distintos organismos internacionales.

	OMS (1999)	EGIR (1999)	NCEP ATP III (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)	ALAD (2010)
Criterio principal	Glucosa en ayuno alterada, Tolerancia a la glucosa alterada, DM2, IR <u>Dos o más de los siguientes:</u>	Hiperinsulinemia en ayuno: >P75 (no diabéticos) <u>Dos o más de los siguientes:</u>	Ninguno <u>Tres o más de los siguientes:</u>	Glucosa en ayuno alterada, Tolerancia a la glucosa alterada <u>Más cualquiera de los siguientes según juicio clínico:</u>	Obesidad abdominal	Obesidad abdominal <u>Dos de los 4 siguientes:</u>
Obesidad abdominal	Hombres: C/C>0,90 Mujeres: C/C>0,85 y/o IMC>30kg/m ²	Hombres: PCin ≥ 94cm Mujeres: PCin ≥ 80cm	Hombres: PCin ≥ 102cm Mujeres: PCin ≥ 88cm	Hombres: PCin ≥ 102cm Mujeres: PCin ≥ 88cm IMC >25 kg/m ²	PCin elevado según población. Dos o más de los siguientes:	Hombres: PCin ≥ 94cm Mujeres: PCin ≥ 88cm
Dislipemia	TG>150mg/dL Hombres: HDL-c<35 mg/dL Mujeres: HDL-c<39 mg/dL	TG>150mg/dL HDL-c<39 mg/dL o tratamiento para dislipemia	TG>150mg/dL Hombres: HDL-c<40 mg/dL Mujeres: HDL-c<50 mg/dL o tratamiento específico	TG>150mg/dL Hombres: HDL-c<40 mg/dL Mujeres: HDL-c<50 mg/dL	TG>150mg/dL Hombres: HDL-c<40 mg/dL Mujeres: HDL-c<50 mg/dL o tratamiento específico	TG>150mg/dL o en tratamiento hipolipemiente específico
Presión arterial	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg o tratamiento con antihipertensivos	≥ 130/85 mmHg o tratamiento con antihipertensivos	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg o tratamiento con antihipertensivos	≥ 130/85 mmHg o tratamiento con antihipertensivos
Glucemia	Glucosa en ayuno alterada, Tolerancia a la glucosa alterada o DM2	≥ 110 mg/dL	≥ 110 mg/dL o tratamiento antidiabético	Glucosa en ayuno alterada, Tolerancia a la glucosa alterada pero no DM2	≥ 110 mg/dL Incluyendo diabéticos	Glucemia en ayunas anormal, Intolerancia a la glucosa o diabetes
Otros	Microalbuminuria					

Tabla adaptada de Grundy et al. (2005).

AACE: *American Association of Clinical Endocrinologist*, **ALAD:** Asociación Latinoamericana de Diabetes, **NCEP ATP III:** *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, **C/C:** Cociente entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera, **EGIR:** *European Group for Insulin Resistance*, **H:** Hombres, **HDL-c:** lipoproteínas de alta densidad-colesterol, **IDF:** *International Diabetes Federation*, **IMC:** Índice de masa corporal, **M:** Mujeres, **OMS:** Organización Mundial de la Salud, **PCin:** Perímetro de la cintura, **P 75:** Percentil 75, **TG:** Triacilglicéridos.

La fisiopatología del SM involucra múltiples mecanismos complejos que aún no han sido completamente dilucidados. Persiste el debate sobre si sus diferentes componentes constituyen patologías independientes o si forman parte de un proceso patogénico común, más amplio. Además de los factores genéticos y epigenéticos, se reconoce que diversos factores relacionados con el estilo de vida, como la ingesta excesiva de alimentos y la falta de actividad física, contribuyen de manera significativa al desarrollo del SM. El elevado consumo calórico tiene un papel causal, ya que la adiposidad visceral se ha identificado como un desencadenante clave que activa la mayoría de las vías asociadas al SM. Entre los mecanismos propuestos, la RI, la inflamación crónica y la activación neuroendócrina parecen desempeñar funciones centrales en su progresión y en la transición hacia ECV y DM2 (Fahed et al. 2022; Zheng et al., 2025).

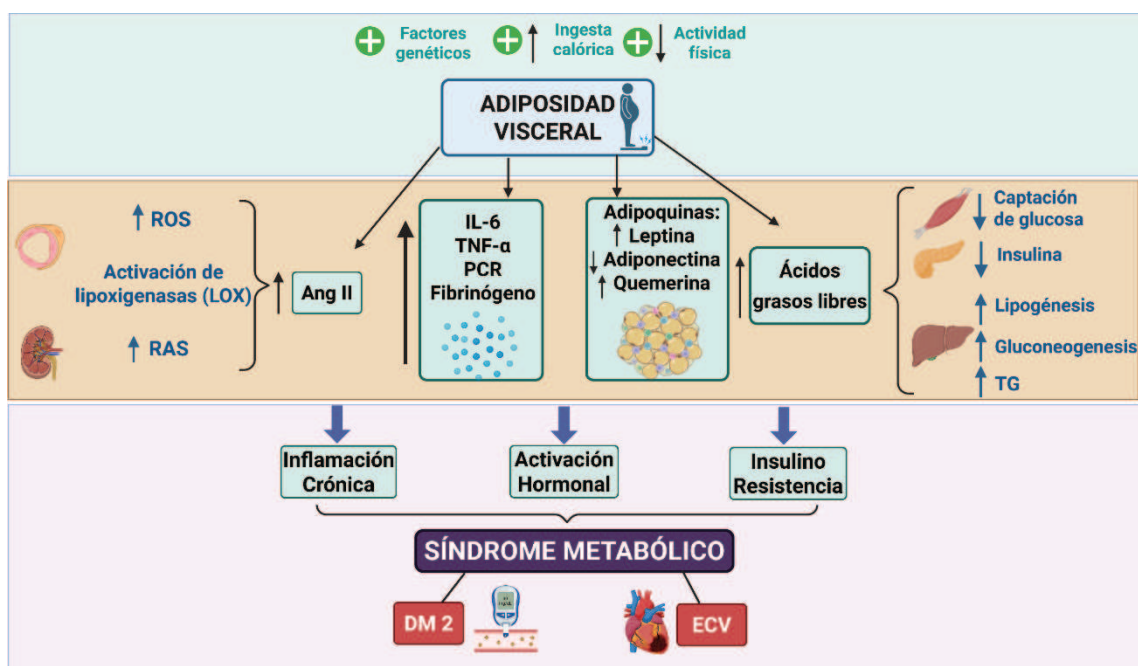


Figura 1. Fisiopatología del SM. Imagen adaptada de Fahed et al. 2022 y modificada en BioRender.com. **ANG II:** Angiotensina II, **DM2:** Diabetes mellitus tipo 2, **ECV:** Enfermedad cardiovascular, **IL-6:** Interleuquina 6, **PCR:** Proteína C reactiva, **RAS:** Sistema renina angiotensina, **ROS:** Especies reactivas del oxígeno, **TG:** Triacilglicéridos, **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral α .

Entre las alteraciones sistémicas derivadas del Síndrome Metabólico, el hígado ocupa un lugar central debido a su papel en la homeostasis energética y metabólica. En este sentido, la disfunción hepática se reconoce actualmente como una consecuencia directa de las alteraciones metabólicas que caracterizan al SM. De hecho, se considera que la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés) representa su manifestación hepática, al compartir los mismos mecanismos fisiopatológicos subyacentes, particularmente la resistencia a la insulina, la inflamación crónica y el estrés oxidativo (Li et al., 2024).

MASLD se define por la presencia de al menos un 5 % de esteatosis hepática junto con al menos un factor de riesgo metabólico (sobrepeso, hiperglucemia, hipertensión, hiperlipidemia) en ausencia de otras causas de esteatosis, como fármacos, consumo de alcohol, hepatitis viral u otras enfermedades. MASLD constituye un espectro de afecciones hepáticas que puede ir desde la esteatosis hepática simple hasta la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH), cuando existe evidencia histológica de inflamación y daño hepatocelular (balonización de hepatocitos con o sin fibrosis). La persistencia de la agresión puede producir fibrosis hepática progresiva y, en última instancia, cirrosis e incluso carcinoma hepatocelular (Elshaer et al., 2024).

La patogénesis de MASLD es compleja y multifactorial e implica disfunción metabólica, predisposición genética y factores de riesgo ambientales (Rao et al., 2023). Diferentes estudios han demostrado que los factores dietéticos influyen en el desarrollo de MASLD, entre ellos, dietas ricas en grasas y azúcares simples (fructosa/sacarosa) favorecen la resistencia a la insulina, la inflamación y la fibrosis, al aumentar la expresión de genes proinflamatorios y profibróticos (Burger et al., 2025). Uno de los mecanismos fisiopatológicos más relevantes es la resistencia a la insulina, cuando la sensibilidad a la insulina se ve comprometida, el tejido adiposo libera de forma sostenida ácidos grasos libres, que son transportados al hígado, incrementando el depósito lipídico. Además, la resistencia a la insulina aumenta la lipogénesis *de novo* hepática, promoviendo la conversión de los carbohidratos excedentes en ácidos grasos. El acúmulo progresivo de lípidos en los hepatocitos desencadena lipotoxicidad, daño celular y estrés metabólico (Neuschwander-Tetri, 2010; Samuel & Shulman, 2016; Savage et al., 2005). En este contexto, las mitocondrias se tornan disfuncionales, comprometiendo la oxidación de ácidos grasos y exacerbando la acumulación de triglicéridos hepáticos. El exceso lipídico activa respuestas de estrés del retículo endoplásmico y eleva la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), generando un entorno de estrés oxidativo y peroxidación lipídica que amplifica el daño celular e impulsa la respuesta inflamatoria. Esta secuencia de eventos facilita la transición desde MASH, donde la inflamación crónica y el daño hepatocelular activan mecanismos de reparación y cicatrización que incluyen la activación de las células estrelladas hepáticas y la síntesis de colágeno. El resultado final es el desarrollo de fibrosis hepática, que puede progresar a cirrosis, caracterizada por una distorsión estructural del hígado y una pérdida significativa de su función (Tilg & Moschen, 2010).

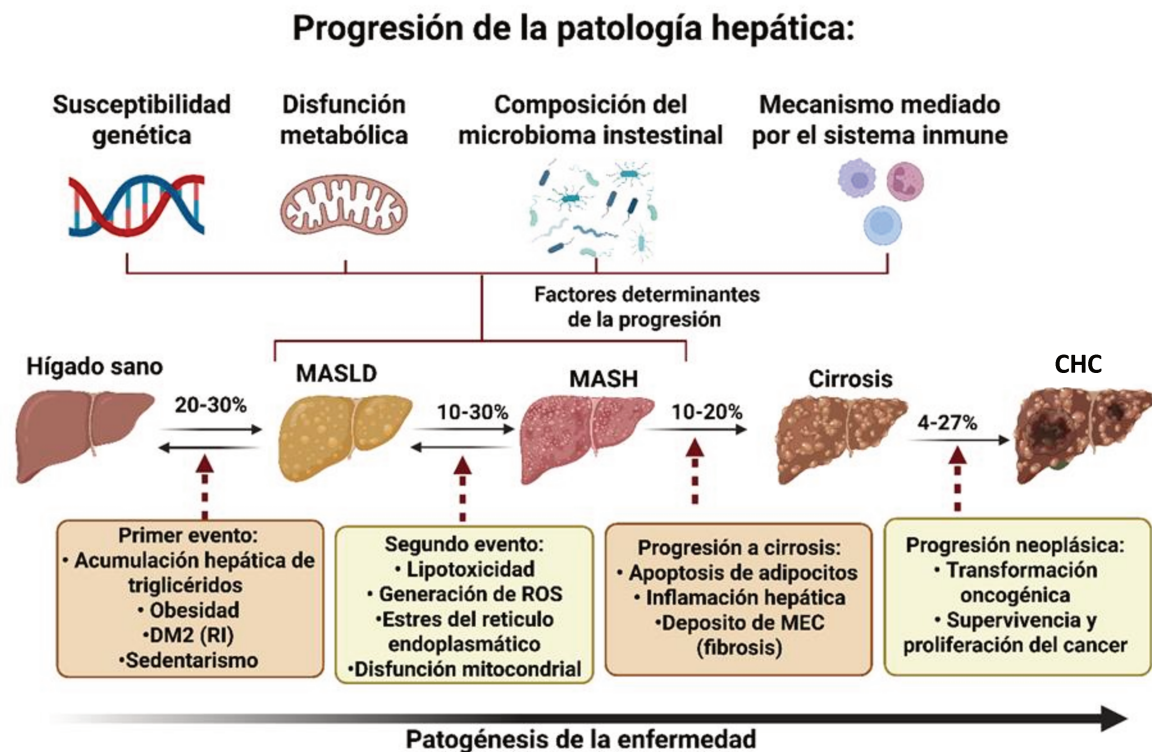


Figura 2: Progresión de la patología hepática. Adaptada de Wang et al., 2024 y modificada en Biorender.com. **CHC:** Carcinoma hepatocelular, **DM2:** Diabetes mellitus tipo 2, **MASLD:** Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica, **MASH:** Esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica, **MEC:** Matriz extracelular, **ROS:** Especies reactivas del oxígeno.

El diagnóstico de MASLD se basa en una combinación de métodos no invasivos y procedimientos histológicos. Entre las herramientas no invasivas más utilizadas se incluyen la ecografía, la elastografía transitoria controlada por vibración y la elastografía por resonancia magnética, además de diversos índices bioquímicos orientados a estimar fibrosis. Pese a estos avances, la biopsia hepática continúa siendo el estándar de referencia, ya que permite cuantificar la esteatosis, la balonización hepatocitaria y el grado de inflamación y fibrosis.

En los últimos años, el entendimiento conceptual de la enfermedad hepática grasa ha evolucionado significativamente. Tradicionalmente, se empleaban los términos “enfermedad hepática grasa no alcohólica” (NAFLD) y “esteatohepatitis no alcohólica” (NASH) para describir este espectro patológico. Sin embargo, estas denominaciones presentaban limitaciones al depender de criterios de exclusión y por el uso de terminología potencialmente estigmatizante (Alabdul Razzak et al., 2024; Mubarak et al., 2024; Rinella et al., 2023; Younossi et al., 2025). Actualmente, en 2023, un consenso internacional Delphi multidisciplinario propuso la nomenclatura actual de “enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica” (MASLD), reemplazando de manera oficial el término NAFLD (Rinella et al., 2023).

Este consenso internacional propuso la definición actual de MASLD, estableciendo que su diagnóstico requiere la presencia de esteatosis hepática junto con al menos uno de los cinco factores de riesgo cardiometabólicos: índice de masa corporal o circunferencia de cintura elevados, alteración del metabolismo de la glucosa, hipertensión arterial, hipertriacilgliceridemia o niveles reducidos de colesterol HDL (Rinella et al., 2023). Actualmente, MASLD es la causa más común de enfermedad hepática crónica y uno de los principales factores que contribuyen a la morbilidad y mortalidad relacionadas con el hígado (Zhou et al., 2023).

En términos epidemiológicos, MASLD afecta a más de un tercio de la población adulta mundial (Miao et al., 2024). Un estudio de metaanálisis realizado entre 1990 y 2019 indicó una prevalencia global del 30 %, con incrementos notables en los últimos años: el 38 % de los adultos presentaban MASLD en el período 2016–2019, lo que representa un aumento del 50 % respecto a las décadas anteriores (Younossi et al., 2023). La prevalencia es particularmente elevada en América Latina (44,4 %) y más baja en Europa Occidental (25,1 %), proyectándose que alcanzará el 55,4 % para 2040 (Le et al., 2022).

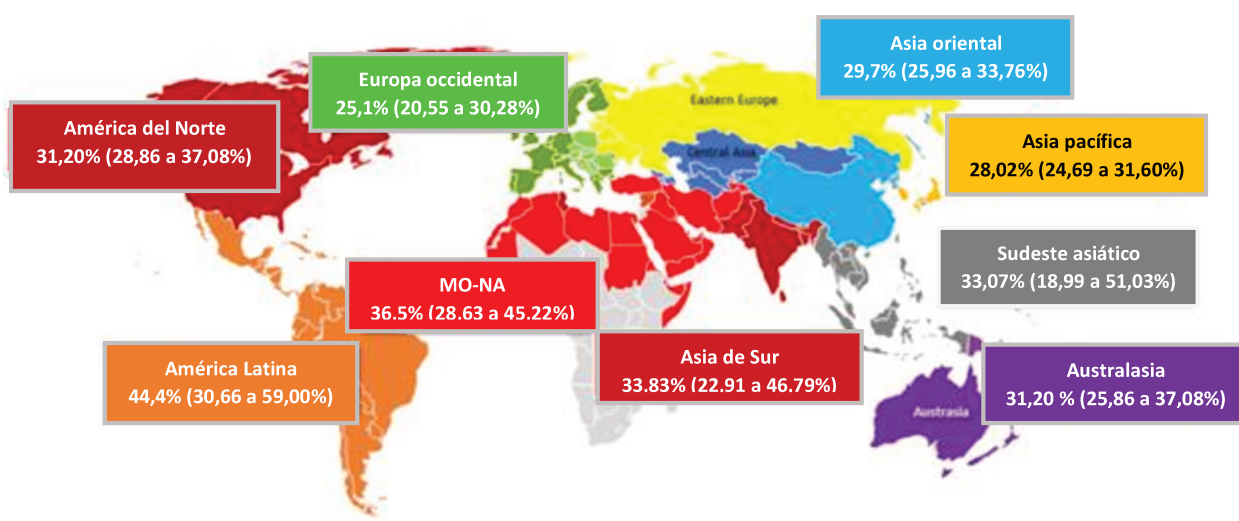


Figura 3. Prevalencia de NAFLD según datos de regiones globales recopilados entre 1990 y 2019. Adaptada de Yonoussi et al. (2023). MO-NA: Medio oriente y norte de África.

En Sudamérica, la prevalencia estimada de MASLD es del 35,7 % en la población general y puede llegar al 68 % en grupos de alto riesgo, como individuos con DM2 u obesidad (Díaz et al., 2025). En Argentina, la prevalencia se estima en torno al 37,2 %, con un 22,2 % de los casos presentando fibrosis significativa. Las tasas son más altas en sujetos con sobrepeso (25 %), hipertriacilgliceridemia (32 %) y alteraciones del metabolismo de la glucosa (34 %) (Villamil et al., 2023).

El aumento de la prevalencia en la población pediátrica también resulta alarmante, estimándose que entre el 15 % y el 20 % de los niños presentan MASLD, cifra que asciende al 47 % entre los

obesos, con predominio en varones (Lee et al., 2024). Esta tendencia se correlaciona directamente con el incremento global de la obesidad y la DM2. Según la OMS, en 2016 existían 650 millones de adultos obesos y más de 340 millones de niños con sobrepeso u obesidad. Se proyecta que para el año 2035 una de cada cuatro personas en el mundo será obesa, con un incremento del 100 % en varones jóvenes y del 125 % en mujeres jóvenes (Federación Mundial de la Obesidad, 2023). Estas cifras refuerzan la estrecha relación entre obesidad, resistencia a la insulina y MASLD, y advierten sobre su impacto en la salud pública global.

El MASLD se perfila como una de las principales causas del carcinoma hepatocelular (CHC), originando el denominado CHC asociado a MASLD, cuya incidencia podría aumentar entre un 45 % y un 130 % para el año 2030 (Koh et al., 2025; Wang et al., 2024). En consecuencia, si no abordamos los factores de riesgo de MASLD y el acceso a los tratamientos, se producirá un aumento significativo de la prevalencia de MASLD, el CHC y otras consecuencias para la salud relacionadas con esta patología (Phoolchund & Khakoo, 2024; Zheng et al., 2024).

2. Generalidades del tejido hepático

La rata de laboratorio (*Rattus norvegicus albinus*) ha sido usada como modelo para investigaciones médicas, biológicas y de diversa índole desde hace mucho tiempo. Es la especie más empleada en investigación biomédica teniendo en cuenta el volumen de información existente acerca de ella. El hígado se ubica inmediatamente por debajo del diafragma, sobre su cara caudal, y se extiende a ambos lados del plano mediano, desde el arco costal derecho hasta el izquierdo, ocupando gran parte de la región superior del abdomen. Presenta dos caras: una cara parietal (craneal), de forma convexa, en relación con el diafragma, y una cara visceral (caudal), de superficie cóncava, en relación con el estómago y la porción craneal del duodeno. Se encuentra dividido en los lóbulos derecho (lateral y medial), izquierdo (lateral y medial), cuadrado (de pequeño tamaño) y caudado, el cual presenta los procesos caudado y papilar, este último subdividido en porciones dorsal y ventral. El proceso caudado se relaciona con el riñón derecho, mientras que el proceso papilar se dispone sobre la curvatura menor del estómago. En comparación con los seres humanos, las ratas no tienen vesícula biliar (Möller Bredo & Vazquez Odo, 2011).

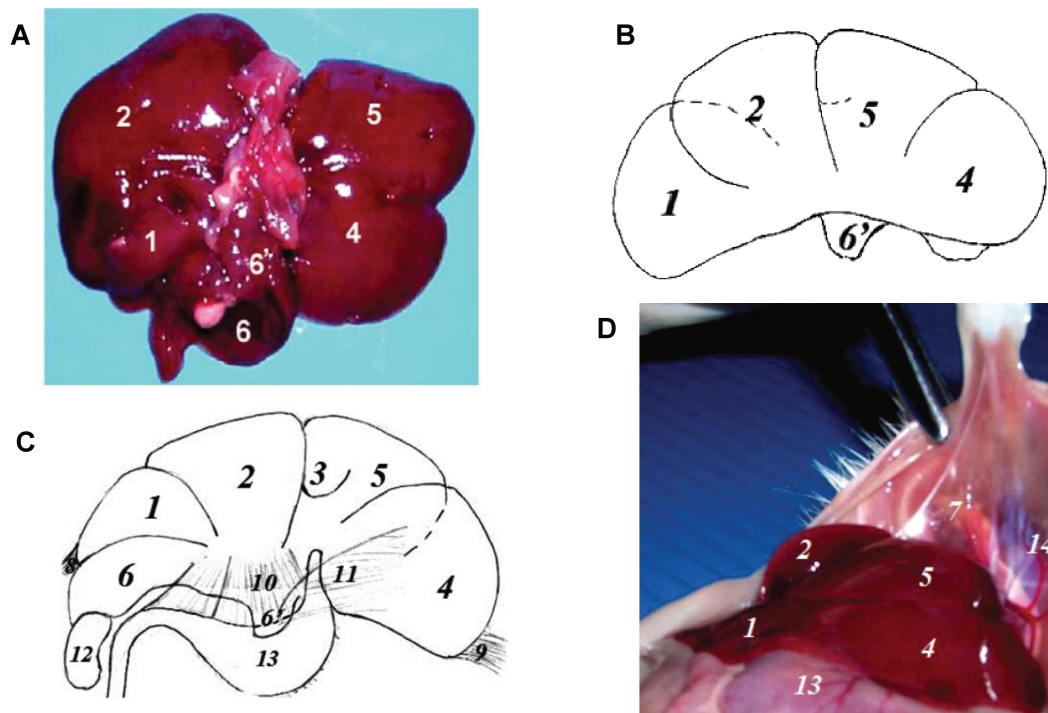


Figura 4: Anatomía del hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*). Adaptada de Möller Bredo & Vazquez Odo, 2011. (A) Cara visceral del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado. (B) Cara parietal del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6'. Proceso papilar del lóbulo caudado. (C) Cara visceral del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 3. Lóbulo cuadrado; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado; 6'. Proceso papilar del lóbulo caudado; 8. Ligamento triangular derecho; 9. Ligamento triangular izquierdo; 10. Omento menor; 11. Ligamento hepatoomental; 12. Riñón derecho; 13. Estómago. (D) Cara parietal del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 13. Estómago, 14. Diafragma.

El hígado está constituido por diversos tipos celulares de distinto origen embriológico, entre los que se incluyen hepatocitos, células epiteliales biliares (colangiocitos), células estrelladas, células de Kupffer y células endoteliales sinusoidales hepáticas. Cada una de estas poblaciones cumple funciones específicas que, de manera integrada, regulan la función hepática en múltiples niveles. Los hepatocitos constituyen la principal población epitelial y funcional del hígado, representan la mayor parte de su volumen y participan en una amplia variedad de funciones metabólicas, secretoras y endócrinas. Los colangiocitos conforman la segunda población epitelial más abundante y cumplen una función epitelial clásica como células que recubren la luz de los conductos biliares. Las células estrelladas (también denominadas células de Ito) representan una población dinámica que puede encontrarse en estado quiescente o activo. En estado quiescente almacenan vitamina A en gotas lipídicas. Ante daño hepático, las células estrelladas se activan, proliferan y pierden progresivamente sus reservas de vitamina A. Además, las células estrelladas son responsables del depósito y la organización del colágeno en el hígado lesionado, proceso que

conduce a la formación de cicatrices y puede progresar hacia cirrosis, una patología crítica que contribuye a la enfermedad hepática terminal. Las células endoteliales sinusoidales hepáticas constituyen una población especializada del endotelio con características únicas, forman placas fenestradas en la luz sinusoidal lo que resulta esencial para el intercambio de proteínas y partículas entre el plasma y los diferentes tipos celulares del hígado, al tiempo que mantiene funciones selectivas de barrera. Finalmente, las células de Kupffer constituyen la población de macrófagos residentes del hígado, reconociendo múltiples estímulos patogénicos que ingresan a través de la circulación portal y pueden desempeñar funciones pro- o antiinflamatorias en la reparación hepática, dependiendo de diversos factores moduladores (Trefts et al., 2017). Las células de Kupffer se localizan en la luz de los sinusoides hepáticos y constituyen aproximadamente el 30 % de las células sinusoidales. Durante la embriogénesis, los macrófagos migran al hígado fetal desde el saco vitelino y se detectan como macrófagos F4/80+ en el día embrionario 11 en ratones (Gómez Perdiguero et al., 2015). En la etapa tardía del desarrollo embrionario y después del nacimiento, estas células proliferan y se diferencian en células de Kupffer, que se caracterizan por la actividad de la peroxidasa en la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico rugoso. Debido a su origen, los marcadores de macrófago como F4/80, CD11b y CD68 también son marcadores representativos de las células de Kupffer (Koyama & Brenner, 2017). Aunque durante mucho tiempo se asumió que las células de Kupffer no se autorrenovaban y que procedían exclusivamente de monocitos derivados de la médula ósea (Diesselhoff-den Dulk et al., 1979; Scott et al., 2016), evidencias más recientes indican que constituyen una población con capacidad de autorrenovación o que pueden originarse a partir de precursores tisulares residentes (Gómez Perdiguero et al., 2015; Schulz et al., 2012). En condiciones fisiológicas, las células de Kupffer secretan diversas citoquinas y factores de crecimiento, como interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis hepática. Estas moléculas regulan la proliferación y regeneración de los hepatocitos, la remodelación de la matriz extracelular y la modulación de la respuesta inmunitaria local. Este entorno citoquínico controlado permite equilibrar los procesos inflamatorios y antioxidantes, esenciales para la función normal del hígado.

La matriz extracelular (MEC) en el hígado desempeña un papel crucial en la fisiología hepática ya que regula la arquitectura, función y regeneración del órgano. La MEC es una red tridimensional de proteínas estructurales, glicoproteínas, proteoglucanos y polisacáridos que rodea y sostiene a las células del hígado. Esta se encuentra en 3 compartimentos: Espacio de Disse, Espacios portales y Cápsula de Glisson. Entre sus funciones fisiológicas se encuentra ser soporte estructural manteniendo la arquitectura lobulillar del hígado, regulación de la diferenciación celular, filtración selectiva, reserva de factores de crecimiento y comunicación

celular (Arteel et al., 2024). En condiciones normales la MEC hepática es escasa y dinámica. Los macrófagos hepáticos, incluidas las células de Kupffer, son la principal fuente de TGF- β , el cual desempeña un papel clave en la fibrogenesis hepática (Arriazu et al., 2014; Dooley & ten Dijke, 2012). El TGF- β se une a su receptor en las células estrelladas hepáticas, promoviendo su activación en miofibroblastos y la síntesis de colágeno tipo I y III.

Además, el hígado cumple un rol fundamental en el metabolismo de los macronutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), la secreción de bilis, la regulación del volumen sanguíneo, funciones inmunológicas, biotransformación de compuestos xenobióticos y hormonas, excreción de bilirrubina, almacenamiento de vitaminas, depósito de hierro en forma de ferritina, entre otras (Tortora & Derrickson, 2013; Trefts et al. 2017).

A continuación, se describen los principales destinos metabólicos de los azúcares que ingresan al hígado desde el torrente circulatorio. En este sentido, el transportador de glucosa de los hepatocitos GLUT-2, es tan eficiente que la concentración de glucosa en el interior de un hepatocito es esencialmente igual a la de la sangre. GLUT-2 transporta la glucosa a través de la membrana hepática de forma bidireccional, lo que permite el flujo de glucosa necesario tanto para la glucólisis como para la gluconeogénesis (Thorens, 2015). La glucosa que ingresa a los hepatocitos es fosforilada por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) para formar glucosa 6 fosfato (G6P). Esta enzima presenta un K_m para la glucosa de aproximadamente 10 mM, considerablemente más alta que la de las isoenzimas de la hexoquinasa en otros tipos celulares, y no es inhibida por su producto, la G6P. La presencia de glucoquinasa permite que los hepatocitos continúen fosforilando glucosa incluso cuando su concentración alcanza niveles muy superiores a los que saturarían a las demás hexoquinasas. Otros monosacáridos como fructosa, galactosa y manosa, absorbidas en el intestino delgado, también se convierten en G6P en el hígado. La G6P se encuentra en la encrucijada del metabolismo de los carbohidratos en este tejido y puede dirigirse hacia distintas rutas metabólicas según las necesidades energéticas del organismo. La G6P puede ser desfosforilada por la glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa) para generar glucosa libre, que se exporta a la sangre para mantener la glucemia. Esta vía predomina cuando la cantidad de G6P es limitada, ya que la concentración de glucosa en sangre debe mantenerse lo suficientemente alta para garantizar el aporte energético al cerebro y otros tejidos dependientes de este combustible energético. Cuando la G6P no se requiere de inmediato para formar glucosa sanguínea, se transforma en glucógeno hepático o tiene algún otro destino. Tras la glucólisis y la acción de la enzima piruvato deshidrogenasa, el acetil-CoA formado puede oxidarse en el ciclo del ácido cítrico y posteriormente, la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa, permiten la producción de energía (síntesis de ATP). El acetil-CoA también puede servir de precursor para la síntesis de ácidos grasos en el citosol, los cuales se incorporan a triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Una buena parte de los lípidos sintetizados en el hígado se transporta a otros tejidos a

través de lipoproteínas plasmáticas (VLDL-TG). Por otro lado, alternativamente, la G6P puede ingresar a la vía de las pentosas fosfato, que proporciona D-ribosa-5-fosfato, precursor de la síntesis de nucleótidos, y poder reductor (NADPH) necesario para la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y hormonas esteroideas, así como contrarrestar los efectos perjudiciales de los radicales libres (Nelson & Cox, 2009).

Otra vía importante en el metabolismo de los carbohidratos es la gluconeogénesis, síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. Los principales sustratos son los aminoácidos glucogénicos, el lactato, el glicerol y en menor proporción, propionato. El hígado y los riñones son los principales tejidos gluconeogénicos, aunque el intestino delgado también puede contribuir a la producción de glucosa en el estado de ayuno. La gluconeogénesis satisface las necesidades de glucosa del organismo cuando los carbohidratos disponibles a partir de la dieta o de las reservas de glucógeno son insuficientes, asegurando la provisión de glucosa a tejidos glucosa dependientes, como el sistema nervioso y los eritrocitos (Murray, et al., 2020).

Si bien la gluconeogénesis y la glucólisis comparten varios pasos, no constituyen rutas opuestas idénticas. De las diez reacciones enzimáticas que conforman la glucólisis, siete son reversibles y comunes a ambos procesos, mientras que tres son prácticamente irreversibles *in vivo*. Estas últimas, catalizadas por la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa-1 y la piruvato quinasa en la glucólisis, deben ser reemplazadas en la gluconeogénesis por reacciones alternativas catalizadas por enzimas específicas: piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa y G6Pasa, que posibilitan la síntesis neta de glucosa (Nelson & Cox, 2009).

El flujo a través de una reacción catalizada por una enzima puede modularse mediante cambios en el número de moléculas de enzima o mediante cambios en la actividad catalítica de cada molécula enzimática ya presente. Los cambios alostéricos, que son muy rápidos, se desencadenan generalmente de forma local mediante cambios en la concentración de una molécula pequeña, un sustrato de la ruta en la que la reacción es un paso, un producto de la ruta o un metabolito o cofactor clave que indica el estado metabólico de la célula. Los segundos mensajeros generados intracelularmente en respuesta a señales extracelulares también intervienen en la regulación alostérica, en una escala de tiempo ligeramente menor impuesta por la velocidad del mecanismo de transducción de señal. En este sentido, el mantenimiento del equilibrio energético celular depende de la disponibilidad de ATP y de la relación entre ATP, ADP y AMP. Cuando los niveles de ATP disminuyen, el aumento relativo de AMP activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), un sensor energético fundamental que inhibe los procesos anabólicos consumidores de energía y estimula las rutas catabólicas que la generan. Esta quinasa también participa en la regulación de la biogénesis mitocondrial, la autofagia y el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, desempeñando un papel clave en la homeostasis energética y redox (Aslam & Ladilov, 2022).

Por otra parte, señales extracelulares de naturaleza hormonal pueden modular tanto la actividad enzimática como la expresión génica a través de factores de transcripción, que al activarse se unen a regiones específicas del ADN promoviendo o reprimiendo la síntesis de las proteínas correspondientes (Nelson & Cox, 2009). En este contexto, la hormona insulina actúa como un regulador central del metabolismo energético, orquestando la homeostasis de los nutrientes y coordinando de manera precisa el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Su acción se inicia cuando la hormona se une a su receptor específico en la membrana plasmática de los hepatocitos, desencadenando una cascada de señalización intracelular que integra respuestas metabólicas y génicas (Burchfield et al., 2025, Nelson & Cox, 2017). El receptor de insulina consta de dos subunidades α y dos subunidades β unidas entre sí por enlaces disulfuro. La insulina se une a las subunidades α extracelulares del receptor de insulina, lo que induce la autofosforilación de los residuos de tirosina de las subunidades β intracelulares. Esta autofosforilación aumenta la actividad tirosina quinasa del receptor y conduce a la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS) a través de sus dominios de unión a fosfotirosina. Aunque se han identificado varias isoformas de IRS, IRS-1 e IRS-2 son las principales expresadas en el hígado. La vía de señalización IRS-1/PI3K/AKT desempeña un papel central en la homeostasis hepática de la glucosa. La fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas IRS permite el reclutamiento de los heterodímeros de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La PI3K actúa como un regulador esencial de la acción metabólica de la insulina a través de su interacción con los sustratos del receptor de insulina. En respuesta a la insulina, IRS-1 se une a la subunidad

p85 de PI3K y la activa. El incremento en los niveles de fosforilación de PI3K y AKT en el hígado se asocia con una reducción de la resistencia a la insulina (Huang et al., 2018; Truong & Lee, 2025).

La PI3K cataliza la formación del segundo mensajero lipídico fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que activa la proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido 1 (PDK1). Esta, a su vez, activa AKT/proteína quinasa B (AKT/PKB), de la cual existen tres isoformas: AKT1/PKB α , AKT2/PKB β y AKT3/PKB γ . La fosforilación de AKT en Thr308 por PDK1 y en Ser473 por mTOR2, conduce a la fosforilación de distintos sustratos de AKT como GSK3 β , FoxO1, BAD, PDE3B y TSC2, lo que favorece el metabolismo de la glucosa, la proliferación, el crecimiento celular y la traducción de proteínas, y reduce la lipólisis y la apoptosis (Hales et al., 2014).

El factor de transcripción Forkhead box O1 (FoxO1) desempeña un papel clave en la regulación de la gluconeogénesis mediada por la insulina. FoxO1 se localiza en el núcleo, donde se une directamente a los promotores de genes gluconeogénicos, incluidos los que codifican G6Pasa y la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK), estimulando la producción de glucosa (Teaney & Cyr, 2023; Zhang et al., 2006). La insulina promueve la fosforilación de FoxO1 en los residuos Thr-24, Ser-256 y Ser-319 por AKT. Una vez fosforilado, el FoxO1 se transloca fuera del núcleo, es ubiquitinado y posteriormente degradado, lo que resulta en la regulación negativa de los genes gluconeogénicos. Además de esta regulación directa, el coactivador del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PGC-1 α), un coactivador transcripcional, también desempeña un papel esencial en la expresión de genes gluconeogénicos. PGC-1 α interactúa directamente con FoxO1 en el núcleo del hepatocito (Puigserver et al., 2003). Se ha demostrado que PGC-1 α no puede inducir gluconeogénesis en ratones con deficiencia específica de FoxO1 en hígado (Matsumoto et al., 2007). Por lo tanto, FoxO1 y PGC-1 α parecen cooperar para inducir la expresión de los genes G6Pasa y PEPCK (Kubota et al., 2025).

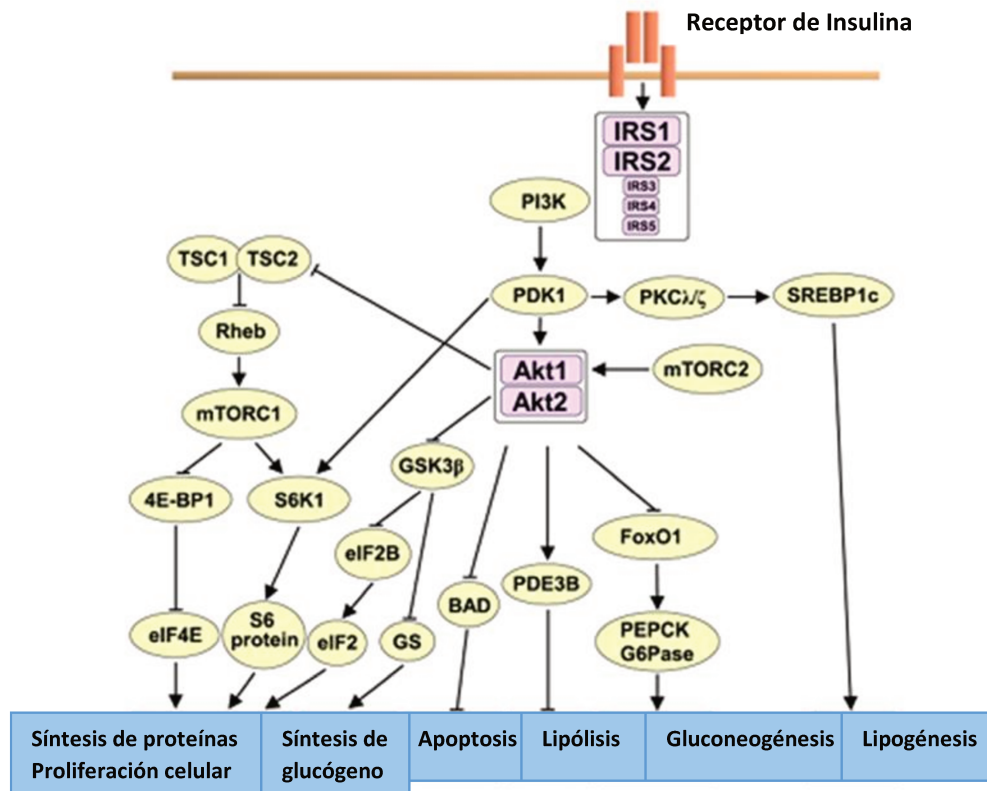


Figura 6: Vías de señalización de la insulina en el hígado. Adaptada de Kubota et al., 2025. **AKT1:** Serina/treonina proteinquinasa 1, **AKT2:** Serina/treonina proteinquinasa 2, **BAD:** Promotor de muerte asociado a Bcl-2, **eIF2B:** Factor de iniciación eucariota 2B, **eIF2:** Factor de iniciación eucariota 2, **4E-BP1:** Proteína 1 unidora del factor de iniciación de la traducción eucariota 4E, **FoxO1:** Forkhead box O1, **G6Pase:** Glucosa 6 Fosfatasa, **GS:** Glutathión sintasa, **GSK3β:** Quinasa 3 de la síntesis de glucógeno beta, **IRS-1:** Sustrato del receptor de insulina 1, **IRS-2:** Sustrato del receptor de insulina 2, **IRS-3:** Sustrato del receptor de insulina 3, **IRS-4:** Sustrato del receptor de insulina 4, **IRS-5:** Sustrato del receptor de insulina 5, **mTORC1:** Complejo 1 de la diana de rapamicina en mamíferos, **mTORC2:** Complejo 2 de la diana de rapamicina en mamíferos, **PI3K:** Fosfatidilinositol-3 quinasa, **PDK1:** Quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos, **PKCζ:** proteína quinasa C zeta, **PDE3B:** Fosfodiesterasa 3B, **PEPCK:** Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, **Rheb:** homólogo de Ras enriquecido en cerebro, **S6K1:** Quinasa 1 de la proteína ribosomal S6, **S6:** proteína ribosomal S6, **S6K1:** Quinasa 1 de la proteína ribosomal S6, **eIF4E:** Factor de iniciación eucariota 4E, **SREBP1c:** Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c, **TSC1:** Complejo de Esclerosis Tuberosa 1, **TSC2:** Complejo de Esclerosis Tuberosa 2.

Por otra parte, durante los procesos metabólicos normales del hígado, las reacciones de oxidación-reducción involucradas en la producción de energía, la detoxificación y la respuesta inmune generan inevitablemente subproductos reactivos. Entre ellos, los radicales libres constituyen intermediarios clave que, en equilibrio con los sistemas antioxidantes, participan en la señalización celular y en el mantenimiento de la homeostasis hepática.

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Debido a su configuración electrónica, los radicales libres son inestables y extremadamente reactivos, rápidamente extraen electrones de las moléculas cercanas, por lo que presentan una vida media corta. Los radicales libres de oxígeno son los principales mediadores en las reacciones de los radicales libres. En la **Tabla 2** se mencionan las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen en los sistemas biológicos (Gil, 2017).

Tabla 2: Principales ROS que se producen en los sistemas biológicos

$O_2^{\bullet-}$	Radical anión superóxido
$HO_2^{\bullet-}$	Radical perhidroxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxilo
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxilo
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxilo
$^1\Delta gO_2$	Oxígeno singlete delta
O_2	Oxígeno molecular

Tabla adaptada de Gil, 2017

En cuanto a las fuentes exógenas de radicales libres de oxígeno se encuentran distintos compuestos, entre ellos, pesticidas, contaminantes atmosféricos, el humo del tabaco, anestésicos, antimicrobianos, fármacos anticancerígenos y otros medicamentos que cuando son metabolizados en el organismo dan lugar a radicales libres. Además, hay distintos sistemas intracelulares que están implicados en la producción de estos radicales, incluyendo pequeñas moléculas citosólicas, hemoglobina y mioglobina, proteínas enzimáticas, peroxisomas, cadena de transporte de electrones mitocondrial, entre otras. Los radicales libres de oxígeno se producen continuamente en los sistemas biológicos. Muchos de ellos son necesarios para la actividad celular normal e incluso, en determinadas circunstancias, hasta resultan beneficiosos. Para contrarrestar el efecto pernicioso de los radicales libres de oxígeno existe en los sistemas biológicos una gran diversidad de sustancias, de naturaleza enzimática y no enzimática, que constituyen los denominados sistemas de defensa antioxidante (**Figura 7**). Estos sistemas de defensa antioxidante funcionan muy eficientemente de forma coordinada y su misión es proteger la homeostasis celular frente a la alteración oxidativa causada por radicales libres y otras especies reactivas originadas durante el metabolismo del oxígeno (Chandimali et al., 2025; Gil, 2017; Tumilaar et al., 2024).

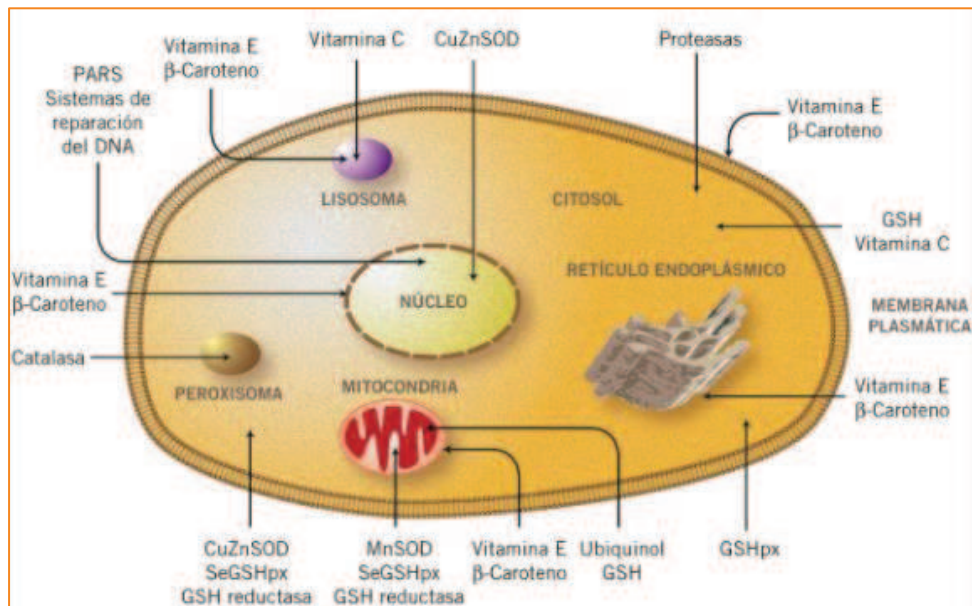


Figura 7: Sistemas de defensa antioxidante. Adaptada de Gil, 2017. **CuZnSOD:** CuZn superóxido dismutasa; **GSH:** glutatión; **GSH reductasa:** glutatión reductasa; **GSHpx:** glutatión peroxidasa; **MnSOD:** Mn superóxido dismutasa; **PARS:** poli-(ADP-ribosa) sintetasa; **SeGSHpx:** glutatión peroxidasa dependiente de selenio.

Entre los sistemas de defensa antioxidante se distinguen los sistemas de defensa antioxidantes primarios o preventivos y los sistemas de defensa antioxidante secundarios o rompedores de cadena. Las defensas primarias interactúan con los radicales libres generados directamente del O_2 , y de esta manera, disminuyen la velocidad de inicio de las reacciones de los radicales libres. Por su parte, las defensas secundarias atrapan los radicales propagadores, deteniendo su efecto nocivo en las etapas iniciales. En cuanto a los sistemas de defensa antioxidantes primarios, existen diversas enzimas cuya función primaria es disminuir las concentraciones intracelulares e intercelulares de las ROS, entre ellas se encuentran: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), entre otras (Pisoschi & Pop, 2015). La **Figura 8** resume la acción concertada de estas enzimas intracelulares.

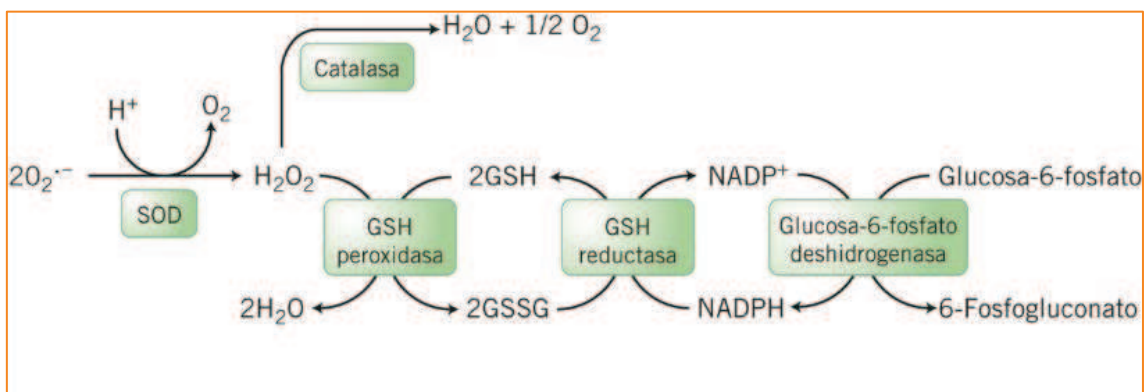


Figura 8: Sistema enzimático de defensa antioxidante. Adaptada de Gil A 2017. **GSH:** glutatión; **GSSG:** glutatión oxidado; **H⁺:** protón (ión hidrógeno); **H₂O:** agua; **H₂O₂:** peróxido de hidrogeno; **NADP:** nicotinamida adenindinucleótido-fosfato; **NADPH:** nicotinamida adenindinucleótido-fosfato reducido; **O₂:** oxígeno; **SOD:** superóxido dismutasa.

Además de las enzimas descriptas anteriormente, existe otra línea de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática secuestrando los radicales libres que escapan de las enzimas antioxidantes. Dentro de este grupo se encuentran diversas proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, la vitamina C, el ácido úrico y la taurina. Por otro lado, existe un sistema de defensa antioxidante secundario el cual incluye enzimas (Oxidoreductasas específicas de proteínas, proteasas, fosfolipasas, sistemas de reparación del ADN, poli-(ADP-ribosa) sintetasa) y secuestradores no enzimáticos (vitamina E, carotenoides, ubiquinol, bilirrubina) (Gil, 2017; Manful et al., 2025).

El factor nuclear kappa de linfocitos B (NF- κ B), es un factor de transcripción que está presente en muchos tipos celulares y desempeña un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos. Está implicado en las respuestas inmunitaria e inflamatoria, la apoptosis y la proliferación celular. La activación de la respuesta antioxidante también está mediada, al menos parcialmente, por el NF- κ B. Este es un complejo proteico constituido por dos subunidades de peso molecular 50 kDa (p50) y 65 kDa (p65) y se encuentra en la mayoría de las células unido a una proteína inhibidora denominada I κ B. Este complejo permanece inactivo en el citoplasma mientras está unido a I κ B, sin embargo, cuando I κ B se fosforila, se activa una señal para su ubiquitinación que estimula la degradación de la proteína inhibidora. El heterodímero NF- κ B activo puede translocar al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN y estimula la transcripción de genes específicos. La activación de NF- κ B se produce en respuesta de un amplio espectro de estímulos que incluyen citoquinas, factores de crecimiento, infecciones víricas, estrés oxidativo y diversos xenobióticos. Las ROS parecen activar el NF- κ B de diferentes maneras (Gil, 2017).

El factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2 (Nrf2) interviene en múltiples aspectos de la defensa celular y orgánica contra el estrés oxidativo, como la desintoxicación, la regulación del metabolismo celular y la promoción de la proliferación celular, lo cual es crucial en el mecanismo patológico de diversas enfermedades. La expresión de los genes citoprotectores proporciona una red reguladora de enzimas desintoxicantes implicadas en el metabolismo antioxidante, el metabolismo intermedio de los lípidos, la degradación de proteínas y la regulación de la inflamación. Por lo tanto, Nrf2 es capaz de mantener el estado estable del entorno interno respondiendo a diversas formas de estrés. Actualmente, se reconoce ampliamente que Nrf2 desempeña un papel fundamental en la expresión mediada por elementos sensibles a los antioxidantes (ARE) de los genes de las enzimas del estrés oxidativo, incluidos los antioxidantes y los desintoxicantes. La vía Nrf2 es esencial para prevenir enfermedades con estrés oxidativo e

inflamación como características patológicas básicas. Por lo tanto, la vía Nrf2 puede ser una opción potencial para el tratamiento de las enfermedades hepáticas (Zhou et al., 2022). Además, también existe una interacción entre NF- κ B y la vía Nrf2. En general, se ha descrito que NF- κ B modula negativamente la transcripción de Nrf2 al competir con el complejo CBP (proteína de unión a CREB)-p300, y la deficiencia de Nrf2 (knockout) se asocia con una mayor activación de NF- κ B. Del mismo modo, se ha descrito que la activación de Nrf2, tanto in vitro como in vivo, por diferentes antioxidantes, previene la inflamación mediante la inhibición de la vía NF- κ B (Arroyave-Ospina et al., 2021).

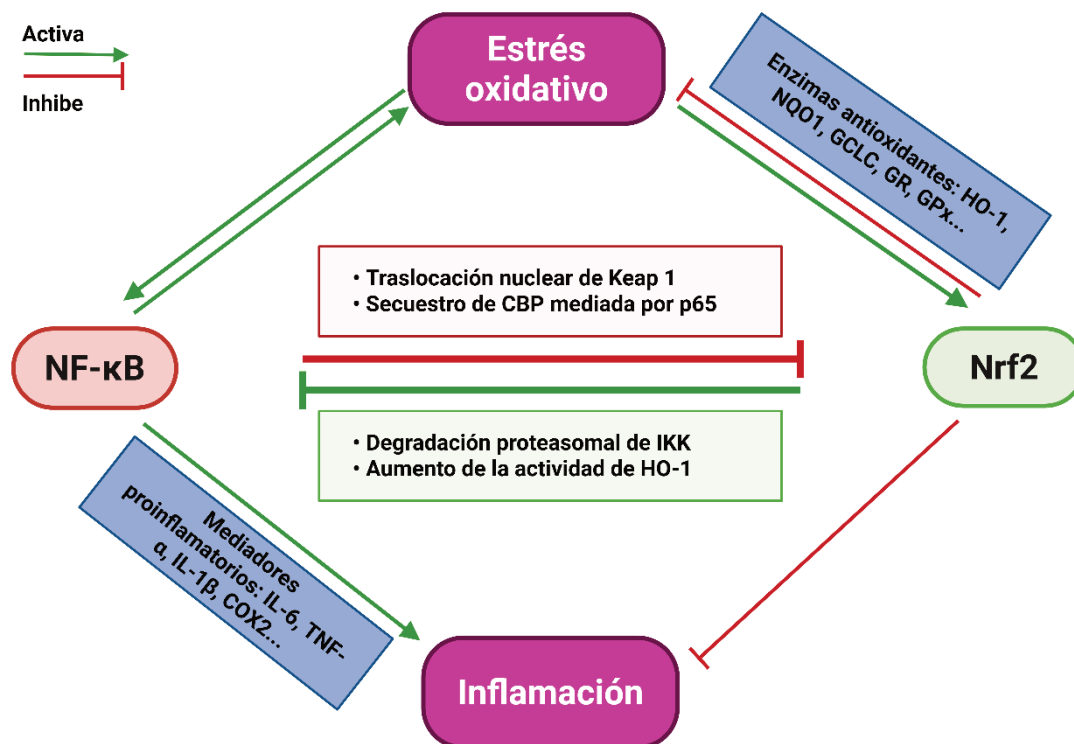


Figura 9: Interacción entre las vías Nrf2 y NF- κ B. Elaboración propia en Biorender.com. **COX2:** Ciclooxygenasa 2; **GCLC:** Subunidad catalítica de la Glutamato-Cisteína Ligasa, **GPx:** Glutatión peroxidasa; **GR:** Glutatión reductasa; **HO-1:** Hemooxygenasa 1; **IL-1 β :** Interleuquina 1 beta; **IL-6:** Interleuquina 6; **NQO1:** NAD(P)H quinona oxidorreductasa 1; **NF- κ B:** Factor nuclear kappa B; **Nrf2:** Factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2; **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa.

3. Tejido hepático en situaciones patológicas

3.1 Alteraciones del metabolismo lipídico y glucídico

En el contexto del SM, el hígado se ve expuesto a un exceso de nutrientes, particularmente ácidos grasos libres y carbohidratos simples, lo que altera profundamente su metabolismo energético. El incremento en la captación de ácidos grasos provenientes de la lipólisis del tejido adiposo, junto con la activación de la lipogénesis *de novo* inducida por la hiperinsulinemia y la hiperactividad del factor de transcripción SREBP-1c, promueve la acumulación de triacilglicéridos en los

hepatocitos. Paralelamente, la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal se ve comprometida por la disfunción mitocondrial y el desequilibrio redox, lo que agrava la esteatosis y favorece la generación de ROS (Stefan et al., 2025; Syed-Abdul, 2024).

En cuanto al metabolismo glucídico, la resistencia a la insulina desempeña un papel central. En condiciones fisiológicas, la insulina inhibe la gluconeogénesis y estimula la glucogenogénesis hepática; sin embargo, en el SM se produce una pérdida de esta regulación, lo que conduce a un aumento de la producción endógena de glucosa y a una mayor disponibilidad de sustratos lipogénicos. Este escenario metabólico disfuncional establece un círculo vicioso en el que la acumulación de lípidos, el estrés oxidativo y la inflamación se retroalimentan mutuamente, contribuyendo a la progresión del daño hepático (Bo et al., 2024).

3.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo constituye un mecanismo clave en la fisiopatología del SM. La sobrecarga de lípidos en los hepatocitos incrementa la actividad de las enzimas oxidativas mitocondriales, peroxisomales y microsomales, lo que resulta en una producción excesiva de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Cuando la generación de estas especies supera la capacidad de los sistemas antioxidantes endógenos, incluidos la SOD, CAT y GPx, se produce daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN. La peroxidación lipídica es uno de los procesos más dañinos, ya que genera productos reactivos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), que alteran la integridad de las membranas celulares y activan vías de señalización proinflamatorias, como NF- κ B y JNK. Además, el estrés oxidativo estimula la activación de las células estrelladas hepáticas y la liberación de citoquinas por las células de Kupffer, promoviendo la inflamación crónica y la fibrosis. En conjunto, el desequilibrio entre la producción de radicales libres y la defensa antioxidante representa un punto de convergencia entre la disfunción metabólica, la inflamación y el daño estructural característico del SM (Li et al., 2024; Svobodová et al., 2025).

3.3 Inflamación hepática

En respuesta a la lesión hepatocitaria, las células de Kupffer se activan y expresan citoquinas y moléculas de señalización. Su activación puede orientarse hacia fenotipos M1 proinflamatorios o M2 antiinflamatorios, dependiendo de las señales recibidas del entorno. La inflamación hepática está regulada por el equilibrio entre estos fenotipos (Wan et al., 2014). Las células de Kupffer están expuestas a diversas sustancias, como nutrientes y productos bacterianos derivados del intestino, a través de la circulación portal. Su función es detectar y eliminar patógenos y moléculas peligrosas mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que incluyen las familias de receptores tipo Toll (TLR) y receptores tipo NOD (NLR). Por ejemplo, los TLR reconocen productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos. La activación de TLR4 por LPS induce la producción de diversas citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12,

IL-18) en condiciones como la MASH, enfermedad hepática alcohólica, lesión por isquemia/reperfusión e inflamación granulomatosa. La producción de estos mediadores también puede exacerbar la resistencia a la insulina y contribuir al SM (Xu et al., 2023).

Los macrófagos reclutados desde la médula ósea son un componente clave de la inflamación hepática aguda y crónica, y participan tanto en la progresión como en la regresión de la enfermedad hepática. Los macrófagos M1, inducidos por IFN- γ , LPS y TNF- α , expresan citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1, y están implicados en la patogénesis de la inflamación hepática crónica. En contraste, los macrófagos M2, inducidos por IL-4, IL-10, IL-13, producen IL-10, TGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), ejerciendo efectos antiinflamatorios y promoviendo la reparación tisular (Koyama & Brenner, 2017).

Otro marcador relevante de inflamación, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), se ha identificado como un factor que agrava la inflamación sistémica. Fisiológicamente, el PAI-1 actúa como uno de los reguladores endógenos más eficaces de la fibrinólisis. Su expresión está modulada por diversos factores, entre ellos los glucocorticoides, la insulina, la glucosa y las citoquinas proinflamatorias (Altalhi et al., 2021). Se han observado niveles elevados de PAI-1 en pacientes con DM2, asociados con un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa y los lípidos. En particular, una respuesta defectuosa a la insulina en el hígado contribuye al desarrollo de hiperglucemia, dislipidemia y resistencia periférica a la insulina, lo que puede favorecer la sobreexpresión hepática de PAI-1 en esta patología. Asimismo, se ha observado una marcada regulación al alza de la expresión de PAI-1 en diversos modelos de lesión hepática. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el hígado no solo constituye un lugar importante de síntesis de PAI-1 en respuesta a cambios hormonales, sino también frente a una amplia variedad de estímulos patológicos (Dimova & Kietzmann, 2008).

3.4 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática se desarrolla como consecuencia de la presencia de daño hepático crónico de diversas etiologías, entre las que se incluyen la hepatitis vírica, el consumo excesivo de alcohol, las enfermedades metabólicas como MASLD, las enfermedades autoinmunes y las colestásicas. La fibrosis se caracteriza por la acumulación progresiva de proteínas de la MEC, principalmente colágeno tipo I y III, resultado de un desequilibrio entre la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs) (Lee et al., 2015; Dawood et al., 2020). A pesar de la alta capacidad regenerativa del hígado, el mantenimiento de estímulos inflamatorios crónicos favorece la progresión del daño hacia la cirrosis, aunque en estadios tempranos la fibrosis aún puede ser reversible (Maroto García et al., 2024). En este contexto, los macrófagos hepáticos, incluidos las células de Kupffer, son una fuente importante del factor de crecimiento

transformante β (TGF- β), una citoquina profibrótica que promueve la activación de las células estrelladas y estimula la síntesis de colágeno (Berumen et al., 2021; Dooley & ten Dijke, 2012). La progresión sostenida de la fibrosis y la cirrosis constituye un factor de riesgo mayor para el desarrollo de CHC, especialmente en el contexto de enfermedades metabólicas y hepatitis crónica.

4. Modelo experimental inducido por ingesta de dieta rica en sacarosa

Estudios previos de nuestro grupo mostraron que el perfil metabólico y hormonal que se observa al administrar una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas macho Wistar normales evoluciona con la cronicidad de la dieta atravesando 3 períodos secuenciales. El período de inducción (3-5 semanas) cuando la administración de una DRS (60-65% de la energía total) se realiza durante un corto período de tiempo, induce un incremento de los niveles de lípidos (TG, colesterol y AGNE) a nivel plasmático, intolerancia a la glucosa, RI periférica global, normoglucemia con hiperinsulinemia, hipertensión arterial, disminución en los niveles circulantes de adiponectina e incremento de marcadores de peroxidación lipídica. El período de adaptación (6-8 semanas), donde se constata una normalización de algunos de los parámetros antes mencionados. El período de recurrencia (12-40 semanas), la dislipidemia se hace más pronunciada y se evidencia un mayor deterioro de la tolerancia a la glucosa y sensibilidad insulínica periférica global. Esto se acompaña por moderada hiperglucemia, normoinsulinemia e incremento del peso corporal y de la adiposidad visceral. La hipertensión arterial, disminución en los niveles de adiponectina y aumento en los marcadores de peroxidación lipídica continúan estando presentes (Chicco et al., 2003; Creus et al., 2016; D'Alessandro et al., 2015). Además, estas alteraciones se acompañan de aumento en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6) y un estado de hipercoagulabilidad (D'Alessandro et al., 2015; Oliva et al., 2021b). Los cambios descriptos se presentan junto con alteraciones metabólicas, morfológicas y funcionales en tejidos claves (hígado, tejido adiposo, páncreas, músculo esquelético, músculo cardíaco y riñón) involucrados en la etiopatogenia del SM y sus complicaciones (Aiassa et al., 2022; Aiassa et al., 2025; Chicco et al., 2003; Creus et al., 2016; Creus et al., 2017; Creus et al., 2020; Creus et al., 2022; D'Alessandro et al., 2006; D'Alessandro et al., 2008; D'Alessandro et al., 2015; Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Ferreira et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Hein et al., 2010; Hein et al., 2012; Illesca et al., 2025; Oliva et al., 2013; Oliva et al., 2021a; Oliva et al., 2021b; Rossi et al., 2010; Selenseig et al., 2010; Vega Joubert et al., 2022a; Vega Joubert et al., 2022b; Vega Joubert et al., 2025a; Vega Joubert et al., 2025b).

El tejido adiposo visceral desempeña un papel central en la génesis y progresión de las alteraciones metabólicas observadas en el modelo experimental utilizado. En particular, el tejido adiposo epididimal se ve afectado por un proceso de hipertrofia de los adipocitos, consecuencia de una mayor actividad de las enzimas involucradas en la lipogénesis y de la lipoproteína lipasa

(LPL). Esta activación enzimática promueve un incremento en el contenido intracelular de triacilglicéridos, generando un desequilibrio en la dinámica normal del almacenamiento y movilización de lípidos. En este contexto, los adipocitos aislados presentan una elevación tanto de la lipólisis basal como de la inducida por isoproterenol, junto con una disminución en la sensibilidad a la acción de la insulina. Asimismo, se ha observado una reducción en la captación de glucosa estimulada por esta hormona, lo cual pone de manifiesto una alteración significativa en la respuesta metabólica del tejido adiposo (Rossi et al., 2005; Rossi et al., 2010; Soria et al., 2002). La disfunción del tejido adiposo epididimal no se limita a los aspectos metabólicos, sino que se acompaña de modificaciones en el perfil secretor del tejido. En este sentido, se registran alteraciones en los niveles plasmáticos de adipocitoquinas, particularmente de leptina y adiponectina, las cuales cumplen funciones esenciales en la regulación del metabolismo energético y en la sensibilidad a la insulina (D'Alessandro et al., 2015; Rossi et al., 2005; Selenscig et al., 2010). Además, dicha disfunción se asocia con un incremento del estrés oxidativo y con cambios estructurales en el tejido, evidenciados por un aumento en los depósitos de colágeno y en los niveles de hidroxiprolina, así como por alteraciones en el remodelado de la matriz extracelular. Estos procesos se acompañan de la instauración de un microambiente proinflamatorio, que refuerza el deterioro funcional del tejido adiposo y contribuye a la alteración sistémica del metabolismo (Aiassa et al., 2022; Aiassa et al., 2025; D'Alessandro et al., 2015).

El músculo esquelético, principal tejido blanco de la acción de la insulina, también se ve afectado en este modelo experimental. La acumulación de TG en las fibras musculares se asocia con un deterioro del metabolismo de la glucosa, tanto en condiciones basales como bajo el estímulo de la hormona insulina (Chicco et al., 2003; D'Alessandro et al., 2000; Oliva et al., 2009; Oliva et al., 2015). Esta alteración contribuye a la RI periférica observada en el modelo. La administración prolongada de una DRS provoca una disminución de la sensibilidad a la insulina, asociada con alteraciones en la captación y el transporte de glucosa, así como en su metabolismo oxidativo y no oxidativo (D'Alessandro et al., 2006). A su vez, se ha demostrado que la DRS induce una disfunción en la vía de oxidación de los ácidos grasos, acompañada de un aumento en la actividad de enzimas lipogénicas clave y de factores de transcripción que regulan la síntesis de lípidos (Ferreira et al., 2020). Estudios más recientes realizados en músculo esquelético de ratas alimentadas con DRS evidenciaron que la acumulación de triacilglicéridos se acompaña de sarcopenia, incremento de la peroxidación lipídica, alteraciones en el estado redox, depósito de colágeno y una disminución en la actividad de la metaloproteínasa de matriz tipo 2 (MMP-2), lo que refleja un proceso de remodelado tisular alterado (Illesca et al., 2025).

De manera similar, el páncreas también se ve afectado por la exposición prolongada a niveles elevados de lípidos plasmáticos. En este órgano, se ha observado un aumento en el contenido de triacilglicéridos, estrechamente relacionado con un deterioro en la funcionalidad de las células β

pancreáticas. Este daño, se manifiesta en la alteración del patrón bifásico de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa, lo que indica una pérdida de la capacidad secretora normal y una disfunción progresiva del islote pancreático (Chicco et al., 2003; Ferreira et al., 2010; Pighin et al., 2003).

A nivel cardíaco, se ha observado que los animales alimentados con una DRS presentan una marcada acumulación de lípidos en el músculo cardíaco, acompañada de una disminución en la oxidación de la glucosa. La elevada disponibilidad de ácidos grasos en la sangre, producto de una lipólisis exagerada y de la RI periférica, favorece su captación por el músculo cardíaco. Sin embargo, la capacidad oxidativa mitocondrial (M-CPT1) no alcanza a compensar este exceso, lo que lleva a la acumulación de lípidos dentro de las células y al desarrollo de un proceso de lipotoxicidad. En este contexto, tanto la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) como de AMPK parecen desempeñar un papel importante en la regulación del metabolismo energético cardíaco. Como consecuencia, se ve afectada la captación de glucosa mediada por GLUT4, su posterior metabolismo oxidativo y no oxidativo, así como la vía de señalización de la insulina (IRS-1). Por otro lado, la presencia de hipertensión arterial y de un estado prooxidante sistémico contribuyen al aumento del contenido de colágeno en el ventrículo izquierdo, lo que sugiere un proceso de remodelado estructural alterado del corazón. Estas alteraciones se asocian a niveles elevados de ROS, debido, al menos en parte, al deterioro de las defensas antioxidantes enzimáticas y del incremento en la producción de radicales libres en el tejido cardíaco (Creus et al., 2017; Creus et al., 2020).

De manera concordante con las alteraciones observadas en otros órganos metabólicamente activos, el funcionamiento renal también se ve comprometido en los animales alimentados con una DRS. En estos animales se han registrado niveles elevados de albúmina y glucosa en la orina, lo que evidencia un deterioro en la capacidad de filtración y reabsorción renal. Dichas alteraciones se acompañan de cambios morfológicos característicos, presencia de fibrosis, incremento en la actividad de las principales enzimas involucradas en la gluconeogénesis (PEPCK, FBPasa y G6Pasa), así como de manifestaciones de lipotoxicidad renal. Además, se observó un marcado estado de estrés oxidativo, evidenciado por un aumento en los niveles de ROS y de peróxidos lipídicos, junto con una disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos. Este desequilibrio redox se encuentra asociado con alteraciones en la regulación de los factores de transcripción Nrf2 y NF- κ B, caracterizado por una disminución en la expresión de Nrf2 y un incremento en la de NF- κ B, lo que sugiere una respuesta adaptativa insuficiente frente al estrés oxidativo y una activación sostenida de mecanismos proinflamatorios (Creus et al., 2022; Vega Joubert et al., 2025b).

Por su parte, el hígado también se ve afectado por el contexto metabólico-hormonal generado por la ingesta crónica de una DRS. Los primeros estudios realizados en este modelo experimental reportaron la presencia de esteatosis hepática, consecuencia del incremento en la síntesis de TG producto de la mayor actividad de enzimas lipogénicas [acetil-CoA carboxilasa (ACC), la sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica] y de la G6PDH, ésta última involucrada indirectamente en esta vía a través de la provisión de cofactores reducidos NADPH. Esto se acompaña de un aumento de los niveles de masa proteica de factores de transcripción que regulan su expresión, tales como la proteína de unión al elemento regulador de esteroides tipo 1 (SREBP-1) y el receptor hepático X (LXR). A su vez, la acumulación de TG hepáticos se ve favorecida por la disminución en la actividad de las enzimas y factores asociados a la oxidación de ácidos grasos, entre ellos la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), la oxidasa de ácidos grasos (FAO) y el factor de transcripción PPAR α (Hein et al., 2010; Oliva et al., 2015; Rossi et al., 2013). Como consecuencia de estas alteraciones, el exceso de lípidos en el tejido hepático conduce a un deterioro del metabolismo de la glucosa y de la vía de señalización de la insulina (Hein et al., 2012). Si bien estos hallazgos permitieron caracterizar las alteraciones metabólicas iniciales inducidas por la DRS en el hígado, los mecanismos involucrados en la progresión hacia etapas más avanzadas de daño hepático —incluyendo el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis— aún no han sido completamente dilucidados en este tejido. La comprensión de estos procesos resulta esencial para establecer las bases fisiopatológicas que vinculan la disfunción metabólica con alteraciones hepáticas asociadas al SM.

En conjunto, los resultados obtenidos en este modelo experimental demuestran que las ratas alimentadas crónicamente con una DRS desarrollan un fenotipo metabólico que reproduce con notable similitud los principales rasgos del SM humano. Por lo tanto, este modelo constituye una herramienta de gran valor para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de las alteraciones metabólicas antes mencionadas, así como para la evaluación de posibles intervenciones nutricionales o farmacológicas orientadas a prevenir o revertir dichas disfunciones.

Dado que el SM no es una enfermedad transmisible, pero sí una de las principales causas de morbilidad global, su diagnóstico temprano y la implementación de estrategias de prevención/reversión resultan fundamentales para reducir su impacto en la salud pública (Ambroselli et al., 2023; Saklayen, 2018).

5. Ácidos grasos n-3 como estrategia de reversión del daño hepático

Numerosos estudios, incluyendo los realizados por nuestro grupo, han demostrado los efectos beneficiosos de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia n-3, principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 n-3), en el manejo de las alteraciones metabólicas que afectan al tejido hepático, como la esteatosis, la inflamación y el estrés oxidativo. Estos ácidos grasos se generan endógenamente a partir del ácido α -linolénico (ALA; 18:3 n-3) mediante una serie de reacciones enzimáticas de elongación y desaturación. El ALA, junto con el ácido linoleico (LA; 18:2 n-6), constituye los ácidos grasos esenciales para el ser humano, ya que el organismo no posee las enzimas necesarias para introducir dobles enlaces más allá del carbono 9 y, por lo tanto, deben ser incorporados a través de la dieta. Ambos ácidos grasos esenciales (ALA y LA) comparten las mismas enzimas elongasas y desaturasas en sus respectivas rutas metabólicas, lo que determina una competencia metabólica entre las series n-3 y n-6, como se ilustra en la **Figura 10**. El equilibrio dietario entre ambos tipos de ácidos grasos es determinante para mantener una adecuada proporción de sus metabolitos bioactivos y preservar la homeostasis lipídica y metabólica hepática (Lee-Okada et al., 2025). Se ha propuesto que la proporción óptima de n-6:n-3 debería oscilar entre 1:1 y 5:1 para mantener un equilibrio saludable. Sin embargo, las dietas occidentales se caracterizan por un alto consumo de n-6, lo que eleva la proporción de n-6:n-3 a un rango de 10:1 a 20:1, lo que aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias como la obesidad (Gonzalez-Becerra et al., 2023).

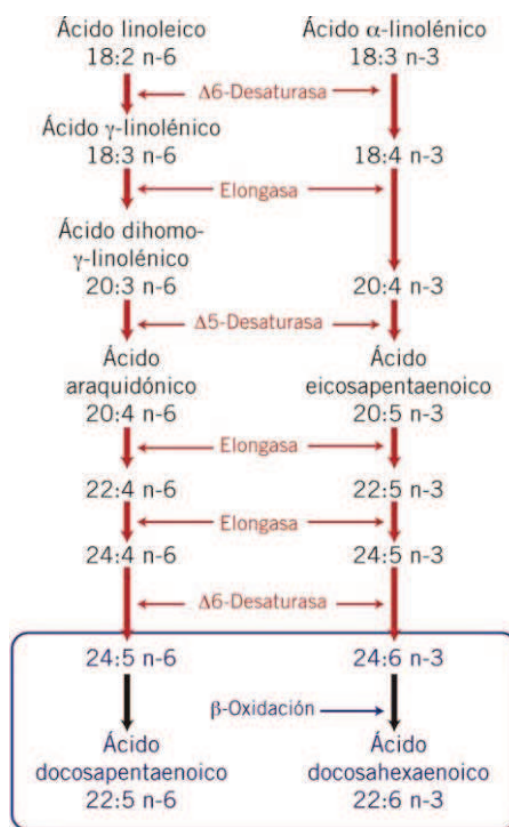


Figura 10: Vías de desaturación y de elongación de los ácidos linoleico y α -linolénico. Adaptada de Gil, 2017.

Los pescados de aguas frías, como el salmón, la caballa, el atún, el arenque y las sardinas, constituyen las principales fuentes dietarias de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga EPA y DHA (Patted et al., 2024). Por su parte, los alimentos ricos en ácido α -linolénico (ALA; 18:3 n-3) incluyen las semillas de lino (linaza), las semillas de chia, las semillas de cáñamo, las semillas de perilla, las nueces y los aceites vegetales como los de soja y canola. Entre las fuentes vegetales, la semilla de chia (*Salvia hispanica* L.) se destaca como una de las más ricas en ALA (18:3 n-3), lo que la convierte en una alternativa botánica de gran valor nutricional para aumentar la ingesta de ácidos grasos n-3 en la dieta, especialmente en poblaciones con bajo consumo de pescado (Knez Hrnčič et al., 2019).

5.1 Semilla de *Salvia hispanica* L. (chia)

5.1.1 Origen, cultivo y características botánicas

Salvia hispanica L., también llamada chia, es una planta herbácea anual perteneciente al orden *Lamiales*, familia *Lamiaceae*, género *Salvia* y especie *hispanica*, originaria del sur de México y el norte de Guatemala (Arctos Specimen Database, 2018). El género *Salvia* se considera el más numeroso de la familia *Lamiaceae*, consta de aproximadamente 900 especies ampliamente

distribuidas por varias regiones del mundo, incluyendo el sur de África, América Central, América del Norte, América del Sur y el sudeste asiático (Gracieri et al. 2019; Takano, 2017).

Inicialmente, la semilla de chia se cultivaba en climas tropicales y subtropicales. En la actualidad se cultiva en todo el mundo, especialmente en Australia, Bolivia, Colombia, Guatemala, Perú, Argentina y México, siendo este último el mayor productor mundial (Knez Hrnčič et al., 2019). La *Salvia hispanica* se adapta a diferentes tipos de suelo tanto en regiones templadas como tropicales, no soporta las inundaciones y requiere suelos aireados y con buen drenaje, por lo que se desarrolla adecuadamente en suelos franco-arenosos y franco-arcillosos con buenas condiciones de drenaje (Ramírez-Jaramillo et al., 2015).

Esta planta puede alcanzar 1 metro de altura, sus hojas verdes de forma ovalada con bordes dentados, dispuestas de forma opuesta, miden entre 4 y 8 cm de largo y entre 3 y 5 cm de ancho. Sus flores miden entre 3 y 4 mm, son hermafroditas, de color blanco o púrpura y están dispuestas en verticilos en el tallo (Motyka et al., 2022). Después de florecer, la planta de chia produce frutos redondos que contienen muchas semillas pequeñas y ovaladas de 2 mm de largo y 1 mm de ancho. La superficie de las semillas es lisa y brillante, de varios colores, incluyendo negro, blanco, grisáceo, beige o marrón, con manchas oscuras dispuestas de forma irregular, siendo los genotipos de color negro y blanco los más comunes en la producción comercial (Peláez et al., 2019; Zare et al., 2024).

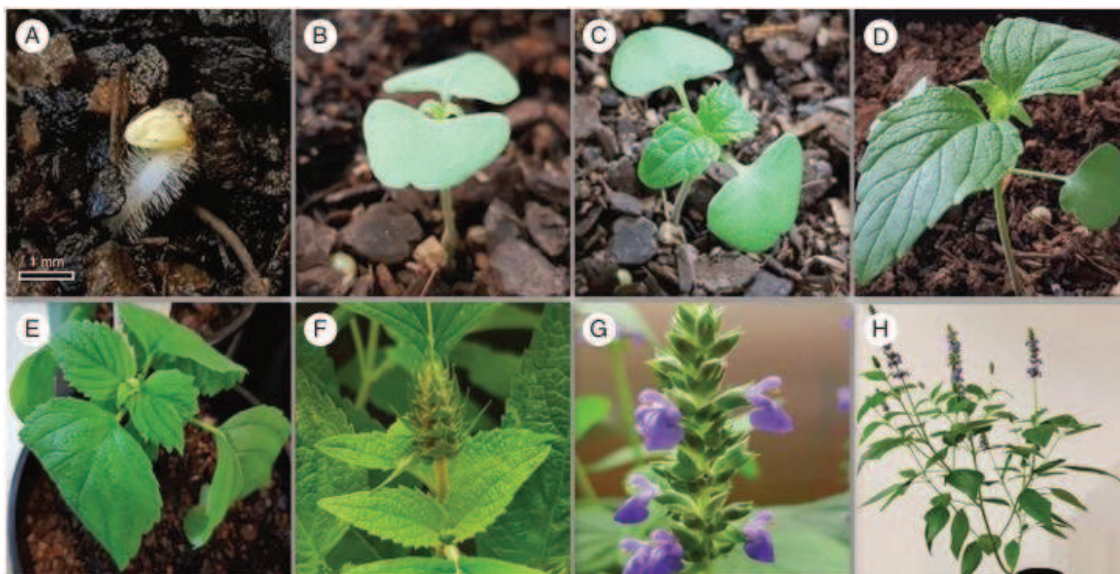


Figura 11: Planta de chia (*Salvia hispanica* L.). Imagen adaptada de Zare et al. (2024). (A) Radícula (raíz primaria) emergiendo de la semilla. (B) Cotiledones completamente desplegados (hipocotilo) (3 días después de la germinación). (C) Plántula (dos hojas desplegadas). (D) Plántula joven de chia (cuatro hojas desplegadas). (E) Planta de chia en fase vegetativa media. (F) Aparición del verticilo. (G) Inflorescencias con flores moradas. (H) Planta de chia madura.

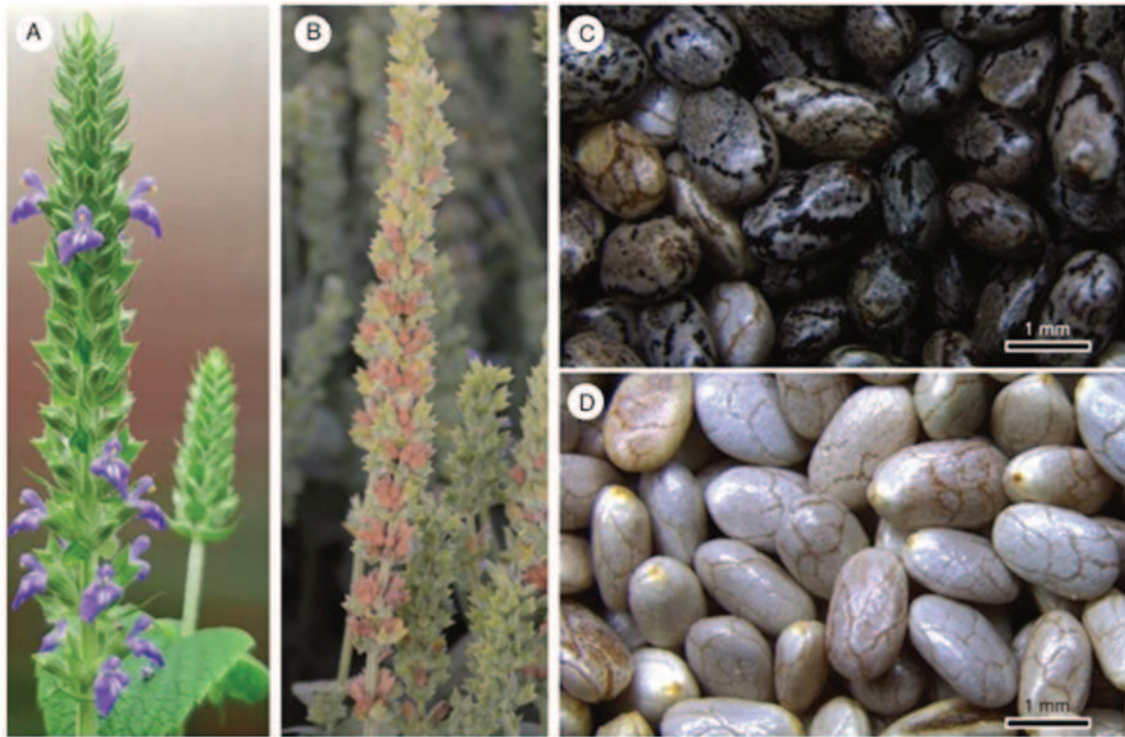


Figura 12: Inflorescencia y semilla de chia. Imagen adaptada de Zare et al. (2024). (A) Las inflorescencias de la chia consisten en varias flores hermafroditas (~80-140). (B) Dehiscencia floral; en esta etapa, el cáliz se secará lentamente y las semillas madurarán hasta que la planta complete su senescencia. (C, D) Semillas maduras de chia blancas y negras con un tamaño medio que oscila entre 1,87 y 2,15 mm de longitud, 1,21 y 1,40 mm de anchura y 0,77 y 0,88 mm de grosor.

5.1.2 Composición de la semilla de chia

La composición química de las semillas de chia ha sido analizada por numerosos estudios (Knez Hrnčič et al., 2019; Kulczyński et al., 2019; Ullah et al., 2016). Las semillas de chia contienen un alto contenido en grasas (30-33 %), carbohidratos (26-41 %), fibra dietética (18-30 %), proteínas (15-25 %), vitaminas, minerales y antioxidantes (**Figura 13**). Particularmente, las semillas de chia tienen un alto valor nutritivo, sobre todo por su alto contenido en grasas y fibra dietética. Se han publicado numerosos estudios sobre los fitoquímicos, en los que se destaca que los principales componentes del aceite de chia son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Entre ellos destaca el ácido α -linolénico (ALA, 18:3 n-3) y ácido linoleico (LA, 18:2 n-6). Las semillas de chia contienen un 39 % de aceite, que consiste hasta un 68 % de ALA y 19 % de LA. La proporción entre el ácido graso n-6 y n-3 es de 0,3-0,35 (Knez Hrnčič et al., 2019). Las semillas de chia contienen aproximadamente entre 30 y 34 g de fibra dietaria en 100 g de semilla, de la cual la fracción insoluble representa aproximadamente entre el 85 % y el 93 %, mientras que la fibra dietética soluble es aproximadamente del 7 % al 15 %. En términos de contenido de fibra dietética, las semillas de chia superan a los frutos secos, los cereales o las nueces. Las semillas de chia

también son una buena fuente de proteína vegetal, que representa aproximadamente el 18 y 24 % de su masa. En el análisis de la composición de aminoácidos destacan la presencia de arginina, leucina, fenilalanina, valina, lisina, ácidos glutámico y aspártico, alanina, serina y glicina. Cabe destacar que las semillas de chia no contienen gluten, por lo que pueden ser consumidas por pacientes celíacos (Kulczyński et al. 2019). Además, las semillas de chia aportan muchos minerales, entre los que destacan el fósforo, el calcio, el potasio y el magnesio. Los estudios también confirman la presencia de algunas vitaminas, principalmente vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina) y vitamina B3 (niacina). Esta semilla también es una fuente rica en fitocompuestos particularmente interesantes que se caracterizan por su alta actividad biológica, en particular de polifenoles, entre ellos ácido gálico, cafeico, clorogénico, cinámico y ferúlico, quercetina, kaempferol, epicatequina, rutina, apigenina y ácido p-cumárico. Las isoflavonas, como la daidzeína, la gliciteína, la genisteína y la genistina, se encuentran en pequeñas cantidades. Además, se descubrió que las semillas de chia también contienen tocoferoles: α -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol.

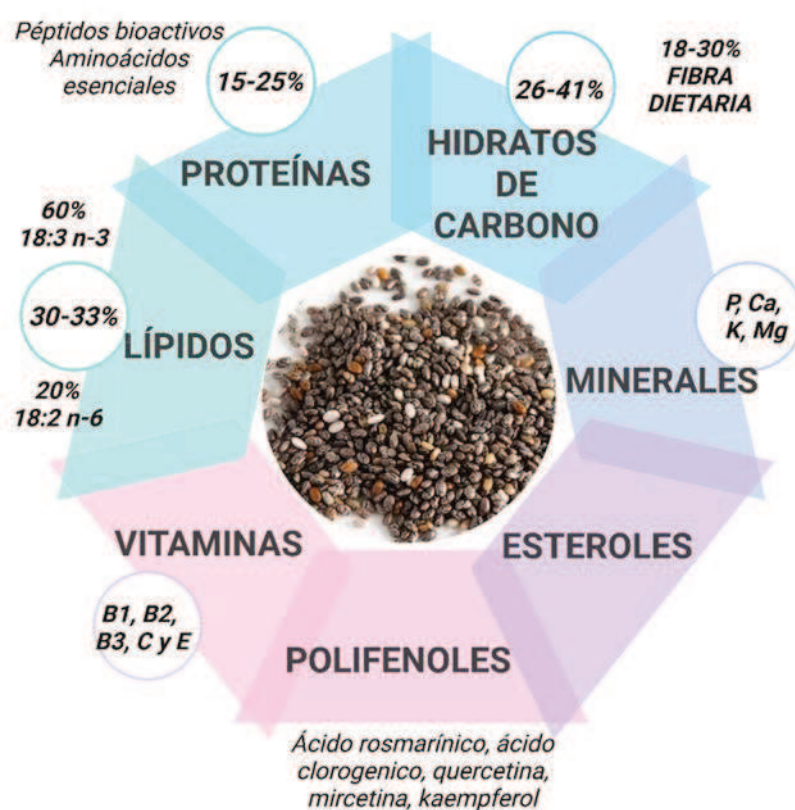


Figura 13: Representación elaborada con BioRender.com, a partir de la descripción de Motyka et al. (2023). Vitaminas: B: Tiamina; B2: Riboflavina; B3: Niacina; C: Ácido ascórbico; E: Tocoferol. Minerales: Ca: Calcio; K: Potasio; Mg: Magnesio; P: Fósforo.

5.1.3. Usos de la semilla de chia

El consumo de chia ha ido aumentando a lo largo de los años, dados sus beneficios para la salud relacionados con enfermedades crónicas como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer (Khalid et al., 2022). Recientemente, el Panel de Nutrición, Nuevos Alimentos y Alergenos Alimentarios (NDA) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha evaluado y aprobado la incorporación de semillas de chia y polvo desgrasado como ingrediente alimentario seguro en diferentes productos alimenticios (Turck et al., 2023). Las semillas de chia poseen propiedades nutricionales y tecnológicas que favorecen su aplicación en una amplia variedad de productos alimentarios. Consideradas un alimento funcional, aportan compuestos biológicamente activos asociados con beneficios fisiológicos para la salud. Además, pueden emplearse como agentes espesantes o hidrocoloides, así como sustitutos del huevo, la grasa o el gluten (Melo et al., 2019).

En la actualidad, la semilla de chia se consume entera, en forma de harina o aceite, sola o añadida a otros alimentos, como yogures, ensaladas y frutas o en preparaciones como panes, budines, galletas, barras de cereales, granolas, bebidas, mermeladas y otros (Grancieri et al., 2019).



Figura 14. Diferentes usos de la semilla de chia. Adaptada de Grancieri et al., 2019.

5.1.4. Estudios experimentales y clínicos con semilla de chia

Diversos grupos de investigación han examinado los efectos metabólicos de la semilla de chia en modelos experimentales y en poblaciones humanas, aportando evidencia consistente sobre su potencial bioactivo. En modelos animales de disfunción metabólica, la suplementación con chia ha mostrado beneficios mejorando la RI, el perfil alterado de lípidos, la homeostasis de la glucosa, la hipertensión arterial y la adiposidad (Coates, 2011; Kulczynski et al., 2019). En este contexto, varios estudios realizados en animales han permitido caracterizar con mayor precisión las acciones de la chia sobre el metabolismo. Entre ellos, los trabajos de Ayerza & Coates (2005; 2007) aportaron evidencia sobre los efectos de la semilla de chia dietaria cuando se administró a ratas normales. En dichos estudios, la semilla de chia se incorporó como fuente grasa (7% p/p) en reemplazo del aceite de maíz durante 4 semanas. Esta intervención redujo los TG plasmáticos y elevó las concentraciones de colesterol HDL, sin modificar los niveles de colesterol LDL. La suplementación también incrementó el contenido plasmático de ALA, EPA y DHA. Resultados comparables se observaron al administrar aceite de chia o chia molida. Por otro lado, los estudios de Poudyal et al. (2012a; 2012b) aportaron información relevante sobre los efectos de la chia en un modelo de disfunción metabólica inducido por una dieta alta en grasa saturada y fructosa. En este modelo, las ratas desarrollaron dislipidemia, RI y un marcado aumento de la adiposidad visceral. La incorporación de semilla de chia (5% p/p) a la dieta —administrada durante períodos adicionales de 8 o 24 semanas— atenuó el incremento del tejido adiposo visceral, mejoró la intolerancia a la glucosa y la acumulación de lípidos en el hígado. Estas mejoras estuvieron acompañadas por una recuperación de parámetros estructurales y funcionales tanto hepáticos como cardiovasculares. En concordancia con estos hallazgos, el estudio de Fernández-Martínez et al. (2019) aportó evidencia adicional sobre los efectos beneficiosos de la semilla de chia en un modelo de dislipidemia aguda y daño hepático (inducida por tiloxapol y tetracloruro de carbono). En este modelo, la inducción de dislipidemia y esteatohepatitis se acompañó de un marcado aumento de lípidos plasmáticos, acumulación hepática de TG y alteraciones histológicas compatibles con inflamación y lesión tisular. La suplementación dietaria con 15 g de harina de chia/100 g de dieta durante 4 semanas, redujo significativamente los niveles plasmáticos de lípidos y atenuó la esteatohepatitis, disminuyendo tanto la acumulación lipídica hepática como los indicadores bioquímicos de daño. Estos efectos se asociaron a una mejora del perfil inflamatorio hepático y a una reducción del estrés oxidativo, aportando evidencia de la capacidad hepatoprotectora de la chia en condiciones de disfunción metabólica aguda. En línea con estos reportes, el estudio de da Silva Marineli et al. (2015b) evaluó los efectos de la semilla y el aceite de chia en ratas obesas inducidas por dieta alta en grasa y fructosa. En este modelo, los animales desarrollaron intolerancia a la glucosa, RI y estrés oxidativo, sin cambios significativos en el peso corporal ni en la acumulación de grasa abdominal. La inclusión de semilla de chia (5% p/p) o

aceite de chia en la dieta —administrada durante 6 o 12 semanas— mejoró la tolerancia a la glucosa y la respuesta insulínica. Estos cambios se asociaron con la inducción de proteínas de choque térmico HSP70 y HSP25 en músculo esquelético y con la restauración de la expresión de PGC-1 α , un regulador clave del metabolismo energético. Asimismo, el aceite de chia aumentó la actividad de enzimas antioxidantes, incluyendo SOD y GPx, contribuyendo a la mejora del sistema antioxidante frente al estrés oxidativo. En conjunto, estos hallazgos evidencian que la suplementación con chia mejora la homeostasis de la glucosa y activa mecanismos moleculares de protección celular y regulación metabólica, aún en presencia de obesidad y acumulación de grasa abdominal.

Además de la evidencia obtenida en modelos experimentales, diversos estudios clínicos han evaluado los efectos de la semilla de chia reportando resultados consistentes con los observados en animales. Entre los hallazgos más destacados se incluyen la mejora del perfil lipídico, la reducción de la presión arterial, la disminución de la glucemia en ayunas y la mejora de la sensibilidad a la insulina, así como efectos favorables sobre marcadores inflamatorios y el balance oxidativo. Estos estudios respaldan el potencial de la semilla de chia como intervención nutricional funcional capaz de mejorar parámetros metabólicos en individuos con riesgo cardiometabólico o con alteraciones relacionadas con el SM (de Cássia Lovato et al., 2022; Ho et al., 2013; Jin et al., 2012; Medina-Urrutia et al., 2020; Nieman et al., 2012; Tavares Toscano et al., 2014; Ullah et al., 2016; Vuksan et al., 2007; Vuksan et al., 2010; Vuksan et al., 2017).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha generado aportes relevantes respecto a los potenciales efectos beneficiosos de la semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) sobre distintas alteraciones y complicaciones asociadas al SM.

Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la administración de semilla de chia, como fuente de grasa dietaria, durante los últimos 3 meses de un periodo total de 6 meses de administración de una DRS disminuye el peso del tejido adiposo visceral epididimal y reduce la hipertrofia adipocitaria, normalizando la lipólisis basal incrementada y restaurando la sensibilidad a la acción antilipolítica de la insulina (Oliva et al., 2013). Estos mecanismos contribuyen, al menos en parte, a explicar la normalización de la dislipidemia observada en los animales alimentados con DRS+Chia. Profundizando en estos hallazgos, estudios posteriores en tejido adiposo epididimal y retroperitoneal demostraron que la suplementación con semilla de chia reduce la hipertrofia de los adipocitos y restablece el patrón alterado de expresión de moléculas clave relacionadas con la señalización de la insulina y el transporte de glucosa (Aiassa et al., 2022; Aiassa et al., 2025). Asimismo, la intervención restauró la actividad de enzimas lipogénicas y los niveles de masa proteica de enzimas lipolíticas. Estos cambios se acompañaron de una disminución en el depósito de colágeno y en los niveles de hidroxiprolina, junto con una mejora

en los patrones de actividad y expresión de proteínas involucradas en el remodelado de la MEC. Además, la suplementación redujo los niveles de citocinas proinflamatorias (PAI-1, MCP-1) e incrementó los niveles de adiponectina en los tejidos adiposos estudiados, así como la disminución de leptina sérica. De manera consistente con estos efectos, los depósitos estudiados mostraron un enriquecimiento en PUFA n-3 en los fosfolípidos de la membrana plasmática. Interesantemente, algunos de estos efectos variaron según el depósito específico de tejido adiposo visceral analizado (Aiassa et al., 2025; Rossi et al. 2005).

Más aún, los efectos descriptos se acompañaron de una normalización del contenido intracelular de lípidos en el músculo esquelético (TG, acil-CoA de cadena larga y diacilglicerol). En este sentido, la reversión de la dislipidemia y la menor disponibilidad de AGNE podrían constituir uno de los mecanismos que contribuyen a la recuperación de la sensibilidad insulínica periférica global y de la homeostasis de la glucosa. Asimismo, en el músculo esquelético, la semilla de chia incrementó los niveles de GSH, así como la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR, efectos que se acompañaron de una reversión de la fibrosis y de cambios favorables en el remodelado de la MEC. (Illesca et al., 2025). A nivel cardíaco, la incorporación de semilla de chia normalizó la presión arterial y atenuó la lipotoxicidad, corrigió la sobreexpresión y translocación anómala de FAT/CD36 y mejoró la oxidación de la glucosa. Además, la intervención redujo la elevada actividad de M-CPT1 sin cambios equivalentes en su masa proteica y produjo leves modificaciones en PPAR α y UCP2, sugiriendo que la normalización de la dislipidemia disminuye la disponibilidad de ácidos grasos y limita su ingreso al miocardio (Creus et al., 2016). Además, la semilla de chia redujo la proporción de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos de membrana y elevó el contenido de PUFA n-3 debido al aumento de ALA y 22:6 n-3. Complementariamente, la sustitución de aceite de maíz por chia en la DRS restauró la actividad de enzimas clave del metabolismo de la glucosa y normalizó la expresión de GLUT-4, IRS-1 y p-AMPK. En conjunto, estos hallazgos evidencian el potencial de la chia para mejorar las alteraciones metabólicas cardíacas asociadas a la dislipidemia y RI (Creus et al., 2017).

Por otra parte, se evaluaron los efectos de la administración de semilla de chia a nivel renal, observándose una mejora en la función renal, una reducción del peso del tejido adiposo perirrenal y en la actividad de enzimas lipogénicas, junto con un aumento de las defensas antioxidantes (Creus et al., 2022).

En esta línea, investigaciones previas de nuestro grupo demostraron que la administración de semilla de chia reduce la acumulación de TG hepáticos y la secreción in vivo de lipoproteína rica en TG (VLDL-TG). Estos efectos se acompañan de una disminución en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (ACC, FAS, G6PDH y enzima málica) y de la masa proteica de la forma madura del factor de transcripción SREBP-1. Paralelamente, se

observó un incremento en la actividad de enzimas hepáticas clave de la oxidación de ácidos grasos (CPT1 y FAO) y en la masa proteica del PPAR α (Chicco et al., 2009; Rossi et al., 2013). Más recientemente, se demostró que la administración de semilla de chia normalizó el recuento plaquetario, los parámetros de coagulación y los niveles plasmáticos de fibrinógeno, además de reducir la expresión de VCAM-1 (Oliva et al., 2021b). Considerando este conjunto de evidencias, el hígado se presenta como un órgano diana de especial relevancia en el abordaje terapéutico de los desórdenes asociados al SM. No obstante, son escasos los trabajos que analizan los efectos de la semilla de chia dietaria sobre mecanismos relacionados con la neoglucogénesis, inflamación, fibrosis y estrés oxidativo hepático en modelos experimentales de SM. El estudio de estos aspectos permitirá dilucidar los posibles mecanismos mediante los cuales la semilla de chia podría contribuir al mejoramiento de las alteraciones metabólicas antes descritas y, en consecuencia, sus potenciales efectos terapéuticos en el modelo experimental empleado.

HIPÓTESIS

a- La semilla de chia modula distintos mecanismos que regulan la neoglucogénesis y/o mejora la acción de la insulina a nivel hepático, corrigiendo la alterada homeostasis de la glucosa.

b- La semilla de chia modula distintos mecanismos que regulan la inflamación, fibrosis y estrés oxidativo hepático.

c- La semilla de chia modifica la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana del tejido.

OBJETIVOS

El **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo fue:

Estudiar en un modelo experimental consolidado, que mimetiza el fenotipo del Síndrome Metabólico (SM) humano, posibles mecanismos que puedan mediar el efecto beneficioso de la semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) sobre el mejoramiento de la homeostasis de la glucosa, resistencia insulínica, inflamación, fibrosis y estrés oxidativo en tejido hepático.

Objetivos específicos: evaluar en tejido hepático el efecto de la administración de semilla de *Salvia hispanica* L. (chia) dietaria en un modelo experimental de SM inducido por la administración crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS), sobre:

1. Tolerancia a la glucosa y producción hepática de glucosa.
2. Mecanismos involucrados en el control de la neoglucogénesis.
3. Vías de señalización de la insulina en condición basal y frente al estímulo de la hormona.
4. Marcadores de inflamación y fibrosis.
5. Marcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes.
6. Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

Estos objetivos fueron llevados a cabo en ratas alimentadas con DRS durante 3 meses, período en que se alcanza una estable dislipidemia, IR, moderada hiperglucemia, adiposidad visceral y acúmulo ectópico de lípidos (músculos, hígado, páncreas, entre otros). A partir de los 3 meses de ingesta se sustituyó la fuente de grasa (aceite de maíz -rico en ácido linoleico 18:2 n-6- por semilla de chia- rica en ALA 18:3 n-3) y se prolongó por un período adicional de 3 meses.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (especie *Rattus norvegicus*) provenientes del Bioterio del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Desde su llegada, los animales fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral). Durante el periodo de aclimatación (1 semana) los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta comercial de laboratorio (GEPSA FEED, Buenos Aires, Argentina), conteniendo (g/kg dieta): carbohidratos (maíz, sorgo, trigo, avena, cebada) 420; proteína 240; grasa 60; fibra 70; minerales y vitaminas 80; humedad 130; energía digerible 11,37 kJ/g según lo declarado por el fabricante. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C), aireación, humedad ($55 \pm 5\%$) y un ciclo de luz-oscuridad fijo de 12 h (luz 7:00 – 19:00 h). Transcurrido el periodo de adaptación, los animales con un peso inicial aproximado de 180-200 g (8 semanas de edad-adultos jóvenes) fueron divididos al azar en dos grupos. Un grupo continuó recibiendo la dieta comercial estándar para roedores durante todo el período experimental (6 meses) [**dieta de referencia (DR)**]. Otro grupo recibió una dieta semisintética basada en las recomendaciones dietarias para la manutención de los roedores adultos realizada por el Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al., 1993) con modificaciones, conteniendo (g/kg dieta): carbohidratos (almidón de maíz 25, sacarosa 555) 580; proteína (caseína libre de vitaminas) 163; grasa (aceite de maíz) 105; fibra (celulosa) 120; cloruro de colina 2; metionina 3; mezcla de sales 35 (AIN-93M-MX); mezcla de vitaminas 10 (AIN-93VX) [**dieta rica en sacarosa (DRS)**]. Luego de 3 meses de ingesta de DRS, los animales se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos. Un subgrupo continuó recibiendo la DRS hasta el final del periodo experimental (6 meses) y el otro recibió una DRS en la que se incorporó la semilla de chia entera como fuente de grasa dietaria, durante los siguientes 3 meses (**DRS+Chia**). Las dietas DRS y DRS+Chia fueron preparadas semanalmente y se mantuvieron a 4 °C hasta su consumo. El protocolo experimental se muestra en la **Figura 15**.

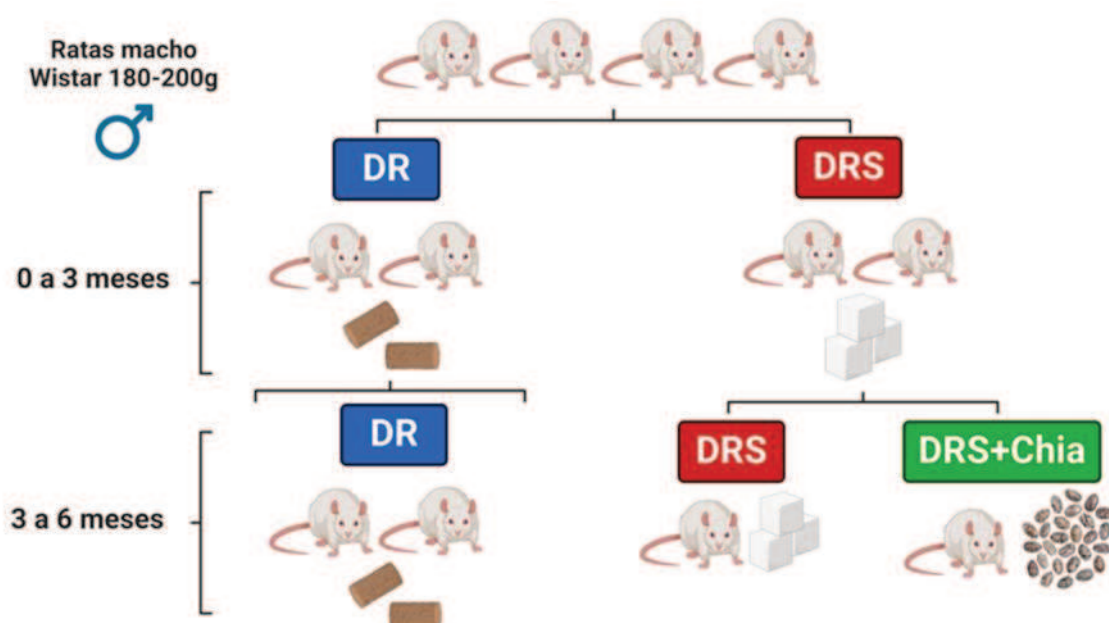


Figura 15. Protocolo experimental. **DR:** Dieta de referencia; **DRS:** Dieta rica en sacarosa; **DRS+Chia:** Dieta rica en sacarosa más semilla de chia.

El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (CAESI, Santa Fe, Argentina) (Acta 04/19, CE 2020-27, 6-03-2020). Se adoptaron todas las medidas necesarias para evitar el estrés y malestar de los animales, empleando el menor número de animales posible, sin comprometer el rigor estadístico, siguiendo las recomendaciones enunciadas en la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del *National Research Council* de los Estados Unidos de Norteamérica del 2011 y las Guías de Eutanasia 2013 de la *American Veterinary Medical Association*.

En el presente estudio, se utilizaron semillas de chia (*Salvia hispánica* L., variedad Salba) cultivadas en Salta, Argentina, proporcionada por ALPA TRADE (Buenos Aires, Argentina). La composición nutricional de la semilla de chia fue descripta previamente por nuestro grupo (Oliva et al., 2021a) y se muestra en la **Tabla 3**. La semilla de Salba es producida bajo estrictas condiciones de cultivo lo cual garantiza la calidad y reproducibilidad de su composición (Vuksan et al. 2010).

Tabla 3. Composición nutricional de la semilla de chia.

Componentes	
<i>Composición de macronutrientes (g/100g)</i>	
Hidratos de carbono ^a	37,45
Grasas	30,23
Proteínas	21,29
<i>Composición mineral (mg/100g)</i>	
Sodio	103,15
Potasio	826,15
Calcio	589,60
Hierro	11,90
Magnesio	77,00
Fósforo	604,00
Zinc	5,32
Cobre	1,66
Manganeso	1,36

^a81 % del total de carbohidratos corresponde a la fibra insoluble. El contenido de carbohidratos, proteínas, fibra, mezcla de vitaminas y minerales en las dietas DRS+Chia y DRS fue similar, teniendo en cuenta la cantidad de estos nutrientes presentes en la semilla de chia.

Las dietas DRS y DRS+Chia proporcionan ~16.3kJ/g y aportan el mismo porcentaje de energía a partir de carbohidratos, proteínas y grasas (**Tabla 4**). Las mismas fueron descriptas en trabajos previos del grupo (Chicco et al., 2009; Oliva et al., 2013). El grupo DRS+Chia recibió 362 g de semilla de chia por kg de dieta. La composición de ácidos grasos de las diferentes dietas fue determinada por cromatografía gas-liquido (**Tabla 5**) en el Instituto INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, La Plata, Argentina. Esto equivale a un aporte de 67,26 g de ALA, de 19,85 g de LA y una relación n-6/n-3 de 0,3 por kg de dieta (Oliva et al., 2021a). La elección de la cantidad de semilla de chia en este trabajo se basó en los estudios de Jeffery et al. (1996) quienes demostraron que la administración en la dieta de una relación n-6/n-3 (LA/ALA) de 0,33 tiene alto efecto hipolipemiante y reductor de la grasa corporal.

Tabla 4. Distribución del porcentaje de energía de los macronutrientes de las dietas DRS y DRS+Chia.

Macronutrientes (% de energía)	DRS	DRS+Chia
Carbohidratos	60,0	60,0
Almidón	2,6	--
Sacarosa	57,4	57,4
Semilla de chia	--	2,6
Proteínas	17,0	17,0
Caseína (libre de vitaminas) ^a	17,0	9,0
Semilla de chia	--	8,0
Grasas	23,0	23,0
Aceite de maíz	23,0	0,2
Semilla de chia	--	22,8

^aLa caseína fue proporcionada por Saputo Molfino Hermanos S.A., Buenos Aires, Argentina.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos (g/kg de dieta) de las diferentes dietas administradas a los animales durante todo el período experimental.

Ácidos grasos ^a	DR	DRS	DRS+Chia
16:0	11,80	10,92	6,96
18:0	11,84	2,73	2,42
18:1 n-9	26,94	33,71	7,39
18:2 n-6	5,68	54,10	19,85
18:3 n-3	0,12	0,80	67,26
20:1 n-9	0,09	0,47	0,36
AG saturados totales	23,64	13,65	9,38
AG monoinsaturados totales	27,03	34,18	7,75
AG poliinsaturados totales	5,80	54,90	87,11
n-6	5,68	54,10	19,85
n-3	0,12	0,80	67,26
n-6/n-3	47,61	66,66	0,30
n-3/AG saturados totales	0,005	0,59	7,17

^a Otros ácidos grasos minoritarios se han excluido.

2. Seguimiento de los animales durante el período experimental

El peso corporal de cada animal de los diferentes grupos dietarios fue registrado dos veces por semana durante todo el periodo experimental. La ingesta energética se determinó una vez a la semana. Para su cálculo, se determinó la comida efectiva (CE) expresada en g/rata x día. Para esto, a los animales se les ofreció diariamente una cantidad estipulada de comida en un recipiente previamente tarado (comida ofrecida húmeda COh). Una alícuota de la misma (10-15 g) se llevó a estufa a 60°C hasta pesada constante (aproximadamente 1 semana) para calcular el % de agua contenido (factor de humedad FH), y expresar la comida ofrecida en base seca (COs). Al día siguiente se retiró y se pesó la comida remanente del recipiente (R1h) al cual se le aplicó el FH, para expresarlo en base seca (R1s). La comida desperdiciada (R2h) se recolectó separándola de la materia fecal, y se la colocó en pequeños contenedores, llevándola a estufa a 60°C hasta pesada constante. Este residuo constituye el R2s. El residuo o resto seco total (Rst) resulta de la sumatoria de R1s + R2s. La comida efectiva por animal se calculó según:

$$CE (g) = \frac{(COs - Rst)(g)}{N (cantidad\ ratas \times jaula)}$$

La ingesta energética diaria (expresada en kJoules/día) se calculó multiplicando la comida efectiva ingerida en 24 h por la energía aportada por las respectivas dietas (DR, DRS, DRS+Chia).

3. Obtención de muestras de sangre y tejidos

Finalizado el protocolo experimental, el alimento fue removido al finalizar el periodo de oscuridad (7:00 h). Los animales fueron pesados y anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico en una dosis de 60 mg/kg de peso corporal y los experimentos fueron llevados a cabo entre las 7:00 y 9:00 h, a excepción de las determinaciones realizadas in vivo o bajo el estímulo de la insulina, las cuales se indican más adelante.

Las muestras de sangre basal fueron extraídas de la vena cava inferior y centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. El suero obtenido se procesó en el momento o fue almacenado a -80 °C hasta su procesamiento. Estas muestras se emplearon para cuantificar los niveles de glucosa, insulina, triacilglicéridos, ácidos grasos no esterificados, colesterol, ácido úrico, y medir la actividad de las enzimas transaminasa glutámico pirúvica (GPT), transaminasa glutámico oxalacética (GOT), fosfatasa alcalina (FA) y la capacidad reductora férrica del plasma (FRAP).

El tejido hepático fue removido en su totalidad y pesado inmediatamente después de la extracción de sangre. Se calculó el índice somático como el cociente entre el peso del tejido hepático respecto al peso corporal total del animal. Según la técnica empleada, se utilizaron de inmediato –análisis histológico e inmunohistoquímico según se describe posteriormente- o fueron congelados a temperatura de nieve carbónica utilizando una pinza de Wollemberger previamente enfriada a

dicha temperatura. Luego los tejidos congelados fueron pulverizados en un mortero con nieve carbónica y transferidos a tubos crioscópicos donde se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

Luego de la extracción de las muestras biológicas los animales fueron eutanizados mediante la extirpación de un órgano vital (el corazón).

4. Procedimientos experimentales

4.1. Determinaciones séricas

4.1.1. Glucosa

La glucosa fue dosada por un método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (Wiener lab., Argentina) basado en el método enzimático Glucosa Oxidasa/ Peroxidasa. Los resultados se expresaron en mM.

4.1.2. Insulina

La insulina inmunoreactiva fue dosada por el método propuesto por Herbert et al., (1965) utilizando como estándar insulina de rata (Novo Nordisk, Denmark). Los resultados se expresaron como pM.

4.1.3. Triacilglicéridos (TG)

Los niveles de TG se cuantificaron por un método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (Wiener lab., Argentina) basado en el método enzimático Lipoprotein lipasa/Glicerol quinasa/Glicerol fosfato oxidasa/Peroxidasa. Los resultados se expresaron en mM.

4.1.4. Ácidos grasos no esterificados (AGNE)

Los niveles de AGNE se cuantificaron por un método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (RANDOX, Reino Unido) basado en el método enzimático AcilCoA sintetasa/ AcilCoA oxidasa. Los resultados se expresaron en μM .

4.1.5. Colesterol total (CT)

El CT se cuantificó por un método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (Wiener lab., Argentina) basado en el método enzimático Colesterol esterasa, Colesterol oxidasa, Peroxidasa. Los resultados se expresaron en mM.

4.1.6. Ácido úrico

El ácido úrico fue dosado por el método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (Wiener lab., Argentina) basado en el método enzimático Uricasa/Peroxidasa. Los resultados se expresaron en μM .

4.1.7. Transaminasa glutámico pirúvica (GPT) y Transaminasa glutámico oxalacética (GOT)

El dosaje de GOT y GPT se llevó a cabo mediante un método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (Wiener lab, Argentina). La enzima GOT cataliza la reacción entre L-aspartato y α -cetoglutarato para producir glutamato y oxalacetato. Por otro lado, la enzima GPT cataliza la reacción entre L-alanina y α -cetoglutarato para producir glutamato y piruvato. El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. Los resultados se expresaron en U/L.

4.1.8. Fosfatasa alcalina (FA)

El dosaje de FA se llevó a cabo mediante un método enzimático colorimétrico de punto final utilizando un kit comercial (Wiener Lab, Argentina). La FA desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con 4-amino- antipirina y ferricianuro como agente oxidante. Los resultados se expresaron en U/L.

4.1.9. Poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)

La capacidad antioxidante del suero se midió utilizando un ensayo de poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP) de acuerdo con Benzie y Strain (1996), como se detalla más adelante en tejido hepático (ítem 4.2.1.5). Los resultados se expresaron como μM Trolox.

4.1.10. Citoquinas plasmáticas

Las concentraciones plasmáticas de las citoquinas IL-6 y TNF- α se determinaron empleando el método de ELISA utilizando kits comerciales (Thermo Scientific, Rockford, USA; Legend maxTM Biolegend® Inc., San Diego, USA, y Thermo Scientific rat TNF- α ELISA kit, Rockford, USA), respectivamente. Los resultados se expresaron como pg/mL.

4.2. Determinaciones en tejido hepático

4.2.1. Determinación de metabolitos

4.2.1.1. Contenido de TG

Los lípidos totales del tejido hepático se extrajeron según el método de Folch et al. (1957) con algunas modificaciones. Brevemente, el tejido congelado se homogeneizó a 4 °C con buffer fosfato 0,5 mM (pH 7,4) y, a continuación, se extrajeron los lípidos totales de 200 µL de homogeneizado con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 vol/vol), se agitó vigorosamente tres veces cada 10 min (tiempo total de extracción, 30 min). Posteriormente, el extracto se filtró y se sometió a lavados consecutivos con soluciones que contenían cloroformo, metanol, agua y solución de cloruro cálcico en proporciones adecuadas (Folch et al. 1957). La fase acuosa se separó por centrifugación y se eliminó después de cada lavado. Al final de los lavados, se tomó una alícuota de la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad en un baño termostatzado a 60 °C. El contenido de TG se determinó por el método enzimático espectrofotométrico utilizando un kit comercial según los protocolos del fabricante (Wiener Lab, Argentina). Los resultados se expresaron como µmol/g de tejido húmedo.

4.2.1.2 Cuantificación de niveles de hidroxiprolina

El contenido de hidroxiprolina en hígado se determinó de acuerdo con el procedimiento de Leach (1960). La técnica consiste en (i) oxidación de hidroxiprolina con peróxido de hidrógeno en presencia de sulfato de cobre alcalino, (ii) destrucción del exceso de peróxido por calor y (iii) reacción del producto de oxidación con p-dimetilaminobenzaldehído por calentamiento en presencia de ácido sulfúrico diluido para producir un compuesto de color rojo. Brevemente, 150 mg de tejido hepático fueron hidrolizados con HCl 6 N a una temperatura de 120 °C durante 24 h, posteriormente se neutralizó y filtró. El hidrolizado fue tratado con CuSO₄ 0,05 M, seguido de NaOH 2,5 N, se agitó y colocó en un baño de agua a 40 °C por 5 min. Se agregó a continuación peróxido de hidrógeno al 6%, agitando inmediatamente. Luego de una incubación a 40 °C durante 10 min se agregó H₂SO₄ 3 N y solución de p-dimetilaminobenzaldehído al 5%. Finalmente, el desarrollo de color se obtuvo por incubación en baño de agua a 70 °C durante 15 min. La absorbancia fue medida a 540 nm contra un blanco conteniendo los reactivos de ensayo excepto la muestra. El contenido de hidroxiprolina en las muestras se calculó empleando una curva estándar de hidroxiprolina (0-18,75 µg/mL). Los resultados se expresaron en µg hidroxiprolina/g tejido húmedo.

4.2.1.3. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La peroxidación lipídica en el tejido hepático fue estimada determinando la presencia de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, según el método de Lee y Csallany (1987).

Brevemente, el hígado fue pesado (~100mg) y homogeneizado en PBS 10 mM (pH 7,0) a 4°C (dilución 1/10). A un volumen de este homogenato se le adicionó 6 volúmenes de H₃PO₄ 1% y 2 volúmenes de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. Posteriormente, se llevó a baño de ebullición durante 45 min en tubos tapados y luego a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue extraída con 8 volúmenes de n-butanol. La fase butanol fue separada por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y la absorbancia de esta fase fue medida espectrofotométricamente a 535 nm. Diferentes concentraciones de MDA, uno de los productos de la peroxidación lipídica preparado por hidrólisis ácida (HCl 10 mM) del 1,1,3,3 tetraetoxipropano, se sometieron al mismo procedimiento para establecer la curva estándar para el complejo MDA-TBA. El contenido de TBARS en hígado se calculó como equivalente de MDA a partir de dicha curva. Todas las muestras y estándares se procesaron por duplicado y los resultados fueron expresados como nmol/gramo de tejido húmedo.

4.2.1.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los niveles de ROS intracelulares se determinaron utilizando el método de la 2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) adaptando la metodología propuesta por Wang et al. (2015). La DCFH₂-DA es un colorante permeable a membrana capaz de difundir pasivamente dentro de las células, donde sus grupos acetato son clivados activamente por esterasas para formar 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂). Esta es oxidada por radicales libres para formar el compuesto fluorescente 2'7'-diclorofluoresceína (DCF). Brevemente, muestras de tejido hepático fueron pesadas (aproximadamente 100 mg), diluidas 1/10 con buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,4) y homogeneizadas a 4°C. Posteriormente, el homogenato se centrifugó a 3900 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante obtenido fue fraccionado para la determinación de los niveles de ROS en hígado. Para ello, se incubó una alícuota del sobrenadante con DCFH₂DA a una concentración en el ensayo de 10 µM durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. La intensidad de fluorescencia se determinó utilizando un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS55 a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 538 nm. Para corregir la fluorescencia de fondo, las muestras se incubaron en las mismas condiciones, pero sin colorantes fluorescentes (blanco de muestra). Una alícuota del sobrenadante fue utilizada para determinar la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford (1976) (reactivo de Bradford Sigma Aldrich B6916). Los resultados se normalizaron por concentración de proteína (intensidad de fluorescencia/mg proteína) y expresado en relación con el grupo de referencia.

4.2.1.5. FRAP

La capacidad antioxidante del suero y del hígado se midió utilizando un ensayo de poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP, según sus siglas en inglés) de acuerdo con Benzie

y Strain (1996). La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6, tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico (Fe^{3+} - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridil-triazina coloreado (Fe^{2+} - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm. Brevemente, el tejido hepático fue pesado (~200 mg) y diluido 1/10 con buffer fosfato de sodio 0,01 M (pH: 7), posteriormente se homogeneizó y centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue fraccionado para la determinación de FRAP en hígado y una alícuota del mismo fue utilizada para determinar la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford. En microplaca se colocaron 10 μL de muestra y se mezclaron con 240 μL de reactivo FRAP previamente preparado, conteniendo: buffer acetato 300 mM (pH: 3,6), solución TPTZ (complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina, 10 mM en HCl 40 mM) y solución de FeCl_3 20 mM, luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 593 nm con un lector de microplacas Biochrom EZ Read-400 ELISA. FRAP se expresó como $\mu\text{mol Trolox/mg}$ de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2.1.6. Glutación

La forma reducida del glutatión se determinó utilizando el método de Ellman (1959) con modificaciones. Brevemente, muestras de tejido hepático fueron homogeneizadas en buffer fosfato 50 mM (pH 7,5) (dilución 1/10), centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante fue separado. Una alícuota fue utilizada para la determinación de proteínas totales y otra alícuota (150 μL) fue precipitada utilizando ácido sulfosalicílico (15% p/p). El tubo se agitó en vórtex, se dejó reposar durante 10 min a 4°C y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente, 200 μL del sobrenadante fueron incubados en buffer fosfato (50mM), conteniendo EDTA (5mM) a pH 8,4 y 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) (DTNB). Tras 5 min a temperatura ambiente, la absorbancia del producto amarillo se midió espectrofotométricamente a 412 nm. La concentración de GSH (nmol/mg de proteína) se calculó usando una curva estándar de GSH. La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Bradford (1976) (reactivo de Bradford Sigma Aldrich B6916).

4.2.2. Determinación de actividades enzimáticas

4.2.2.1. Mieloperoxidasa (MPO)

La actividad de la enzima MPO se determinó en el tejido hepático según el método de Belcastro et al. (1996). Brevemente, 100 mg de hígado fueron pesados y homogeneizados con buffer fosfato de potasio 20 mM (pH 7,4) con EDTA 1 mM (dilución 1/5). El homogenato fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado, y el pellet resultante fue resuspendido en 200 μL de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 6,0) que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5%, y homogeneizado. Posteriormente, se congelaron y

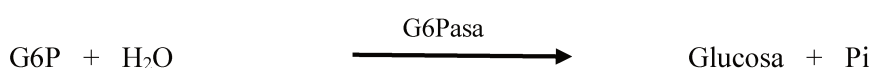
descongelaron tres veces. La actividad de la MPO se evaluó espectrofotométricamente: Se mezclaron 0,1 mL de muestra con 2,9 mL de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 6,0) que contenía 1,7 mg/mL de dihidrocloruro de o-dianisidina y 2 µL de peróxido de hidrógeno. La lectura se realizó en espectrofotómetro a 460 nm. Los resultados se expresaron como mU/mg proteína. La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Bradford (1976) (reactivo de Bradford Sigma Aldrich B6916).

4.2.2.2. Glucoquinasa (GK) y Hexoquinasa (HK)

Las actividades de GK y HK fueron determinadas espectrofotométricamente según el método propuesto por Barzilai y Rossetti (1993). El tejido hepático congelado y pulverizado (0,2 g) fue homogeneizado en un buffer conteniendo: HEPES 50 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM y ditioneitol (DTT) 2,5 mM. Luego se centrifugó a 30000 rpm durante 45 min a fin de separar la fracción microsomal (utilizada para cuantificar la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfatasa). La fracción post-microsomal (sobrenadante) fue empleada para analizar las actividades totales (GK + HK) y HK y por su diferencia la actividad GK. Se utilizó un medio (pH: 7,4; 37°C) que contenía HEPES 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 7,5 mM, ATP 5 mM, DTT 2,5 mM, albúmina 10 mg/mL y glucosa 0,5 mM (actividad de HK) y 7, 10, 15, 18 y 50 mM de glucosa (actividad total: GK + HK), NAD⁺ 0,5 mM y 4 unidades de G-6-PDH (*Leuconostoc mesenteroides*) y el equivalente a 1 mg de tejido hepático húmedo. La reacción fue iniciada por la adición de ATP 5 mM, registrándose el incremento de las densidades ópticas por la reducción del NAD⁺ a 340 nm. La fosforilación de la glucosa se determinó por el cambio de absorbancia en presencia y ausencia de glucosa, bajo condiciones en la cual se registra un incremento lineal en función del tiempo. Los resultados se expresaron en mU/mg proteína. La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Bradford (1976) (reactivo de Bradford Sigma Aldrich B6916).

4.2.2.3. Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)

La actividad de la G-6-Pasa fue determinada espectrofotométricamente a partir de tejido hepático congelado según el método descrito por Bergmeyer (1963) con algunas modificaciones. El principio de la determinación se basa en la hidrólisis de la Glucosa-6-fosfato (G6P) con liberación de fosfato inorgánico (Pi).



El precipitado obtenido según la descripción efectuada para la técnica de la enzima GK, fue resuspendido en el mínimo volumen (0,5 mL) de buffer citrato 100 mM (pH 6,5). En la reacción enzimática: 0,1 mL de homogeneizado hepático fue adicionado a 0,1 mL de G-6-P 0,08 M incubando 15 min a 37°C. Paralelamente, se incubaron 0,1 mL de homogeneizado hepático con

0,1 mL de buffer citrato y 0,1 mL de buffer citrato con 0,1 mL de G-6-P 0,08 M, utilizados como controles. Se adicionó 2 mL de ácido tricloroacético a cada tubo, se centrifugaron y se utilizaron los sobrenadantes para la determinación de Pi liberado. La determinación del fosfato liberado se realizó según Fiske y Subbarow (1925). Brevemente, 1 mL de sobrenadante se adicionó a 5 mL de solución de molibdato de amonio y 1 mL del agente reductor (1-amino-2-naftol-4-ácido sulfónico 42 mM; 0,56 M SO_3^{2-}). Luego de 15 min se determinó la densidad óptica a 660 nm. Se construyó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de Pi. Los resultados se expresaron en mU/mg proteína. La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Bradford (1976) (reactivo de Bradford Sigma Aldrich B6916).

4.2.2.4. Fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa)

La actividad de la FBPasa se determinó en homogeneizados hepáticos según Andrikopoulos et al. (1996). Brevemente, 200 mg de tejido hepático fueron homogeneizados (dilución 1:10) en un buffer conteniendo trietanolamina 50 mM (pH 7,2), DTT 0,1 mM y sacarosa 0,25 mM. Los homogenatos fueron centrifugados a 25500 rpm durante 40 min, y el sobrenadante fue empleado para la determinación de la actividad enzimática. La actividad de FBPasa se ensayó espectrofotométricamente de acuerdo a Pontremoli et al. (1965). La mezcla de reacción contenía buffer trietanolamina 0,04 M (pH 7,5), MnCl_2 0,5 mM, glucosa-6-P deshidrogenasa 0,2 U, hexosa-fosfato isomerasa 6,6 U, NADP 0,5 mM, fructosa-1,6-di-P 1,0 mM y 100 μL de sobrenadante, a una temperatura de reacción de 22°C. Cambios en la absorbancia a 340 nm debido a la reducción de NADP a NADPH fueron registrados durante el ensayo. Los resultados se expresaron en mU/mg proteína. La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Bradford (1976) (reactivo de Bradford Sigma Aldrich B6916).

4.2.2.5. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)

La enzima PEPCK se extrajo a partir de homogeneizado de tejido hepático congelado según Blakely et al. (1981). Aproximadamente, 200 mg de tejido hepático se homogeneizaron con 9 volúmenes de buffer Tris 10 mM (pH 7,0) a 4 °C. Luego de la homogenización, se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C y se separó el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática.

La actividad de la enzima neoglucogénica PEPCK se determinó espectrofotométricamente según la técnica descrita por Petrescu et al. (1979). El medio de reacción consistió en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo MnCl_2 1 mM, NADH 0,1 mM, deoxiguanosina difosfato (dGDP) 0,2 mM, fosfoenolpiruvato (PEP, sal triciclohexilamonio) 0,5 mM, NaHCO_3 20 mM, 2 unidades de málico deshidrogenasa y 0,2-1,0 mg del extracto enzimático fueron agregados a 1 mL del medio de reacción. La reacción se inició mediante la adición de 0,2 mM de dGDP, registrando la oxidación del NADH a 340 nm y a 25 °C. Un blanco empleado como control, al cual no se le

adicionó el NaHCO_3 , fue sometido al mismo procedimiento anterior. Los resultados se expresaron en mU/mg proteína. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Bradford 1976).

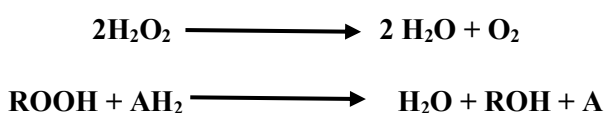
4.2.2.6 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD fue determinada de acuerdo al método espectrofotométrico propuesto por Kakkar et al. (1984). El tejido hepático se homogeneizó (dilución 1/10) en buffer fosfato salino (PBS) 10 mM (pH 7,4) y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad enzimática y en una fracción del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

La mezcla de ensayo contenía: buffer pirofosfato de sodio 0,052 M (pH 8,3), metosulfato de fenazina 186 μM , nitroazul de tetrazolio (NBT) 300 μM , NADH 780 μM . La reacción se inició mediante la adición de NADH y se incubó a 30°C durante 90s, posteriormente, la reacción se detuvo mediante la adición de ácido acético glacial. A la mezcla de reacción se agregó n-butanol y se agitó enérgicamente, luego se dejó reposar la mezcla durante 10 min, se centrifugó y se extrajo la capa de butanol. La intensidad del color del cromógeno en el butanol se midió a 560 nm en el espectrofotómetro JENWAY 6305 frente al butanol. Una unidad de actividad SOD se define como la concentración de enzima necesaria para inhibir la producción de cromógeno en un 50% en 1 min en las condiciones del ensayo. Los resultados se expresan en U/mg de proteína.

4.2.2.7. Catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa se determinó espectrofotométricamente mediante el método propuesto por Aebi (1984). La enzima cataliza las siguientes reacciones:



La descomposición del H_2O_2 debido a la acción de la catalasa disminuye su absorción en función del tiempo, y a partir de esta disminución la actividad de la enzima catalasa puede ser calculada. La absorción ultravioleta del H_2O_2 es fácilmente medida a 240 nm.

El tejido hepático fue diluido en buffer fosfato 50 mM (pH 7,0) (dilución 1/10) y homogenizado. El homogenato fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido fue utilizado para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976) y la actividad de la enzima catalasa por el método espectrofotométrico antes mencionado. La reacción se inició mediante la adición de una solución de H_2O_2 30 mM (concentración final de 10 mM en la mezcla de ensayo). La descomposición de H_2O_2 se monitoreó a 240 nm durante 60s

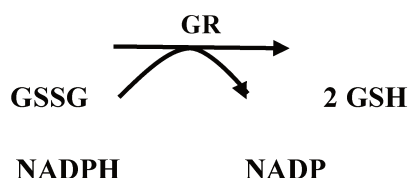
a 20°C. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

4.2.2.8. Glutati3n Peroxidasa (GPx)

El glutati3n reducido (GSH) es utilizado por la glutati3n peroxidasa (GPx) para la reducci3n del per3xido de hidr3geno (H₂O₂) y de lipoper3xidos (L-OOH), los cuales son elementos t3xicos. Por lo tanto, la enzima cataliza con alta especificidad la detoxificaci3n *in vitro* del per3xido de hidr3geno seg3n la siguiente reacci3n:



La actividad enzimática de la GPx se determin3 spectrofotom3tricamente mediante el m3todo propuesto por Paglia y Valentine (1967), en el cual, la adici3n ex3gena de glutati3n reductasa y NADPH convierten inmediatamente el glutati3n oxidado producido a la forma reducida, seg3n la reacci3n:



Por lo tanto, la formaci3n del glutati3n oxidado fue determinada siguiendo la disminuci3n de absorbancia en la mezcla de reacci3n a 340 nm.

Para este ensayo, el tejido hepático fue homogeneizado en 9 volúmenes de buffer fosfato de sodio 10 mM (pH 7). El homogenato fue centrifugado 10000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante obtenido fue posteriormente centrifugado a 33000 rpm durante 1 h y 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante se utiliz3 para determinar la concentraci3n de prote3nas por el m3todo de Bradford (Bradford 1976) y la actividad de la GPx por el m3todo espectrofotom3trico antes mencionado. Brevemente, una al3cuota de muestra se adicion3 al medio de reacci3n compuesto por buffer fosfato 50 mM (pH 7,0) conteniendo EDTA 5 mM, glutati3n reductasa 0,33 U/mL, NaN₃ 3,75 mM, glutati3n 5 mM y NADPH 0,28 mM. La mezcla de reacci3n fue equilibrada a 20 °C por 5 min y la reacci3n se inici3 por el agregado de H₂O₂ 0,073 mM, cuya concentraci3n fue obtenida por titulaci3n. La conversi3n de NADPH a NADP se registr3 cada 15 s a 340 nm por 3 a 5 min. Una unidad enzimática se define como el n3mero de μmoles de NADPH oxidados por min. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron en mU/mg de prote3na. La concentraci3n de prote3na del extracto se determin3 empleando alb3mina s3rica bovina como estándar (Bradford 1976).

4.2.2.9. Glutatión reductasa (GR)

La glutatión reductasa (GR) es una flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), según la siguiente reacción:



La actividad de la enzima glutatión reductasa fue determinada mediante el método propuesto por Horn (1974). Brevemente, la muestra se adicionó a un buffer fosfato 0,067 M (pH 6,6) conteniendo NADPH 0,1 mM y glutatión oxidado 0,5 mM y se procedió a leer inmediatamente la absorbancia a 340 nm, a 25 °C por 3 min. Para cada una de las muestras se preparó un control conteniendo buffer que reemplazó a la solución de glutatión oxidado y se procedió a realizar las determinaciones de la misma manera. Bajo estas condiciones experimentales la reducción del glutatión dependiente de NADPH es lineal en función del tiempo. Una unidad de glutatión reductasa se define como la cantidad de enzima que reduce 1 μmol de GSSG por min a 25 °C. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron como mU/ mg proteína. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Bradford 1976).

4.2.3. Análisis histológicos

4.2.3.1. Preparación y tinción de cortes histológicos

Alícuotas de tejidos hepáticos de los tres grupos dietarios fueron fijados en formalina al 10% durante 24 h. Luego de la fijación, los tejidos se colocaron en etanol 70% durante 48 h y luego se deshidrataron con una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en parafina. Se utilizó un micrótopo rotatorio semiautomático (Leica ®M2255) para obtener cortes de secciones de parafina (5 μm), se colocaron en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropil trietoxisilano (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina). Previo a la tinción las secciones de hígado fueron desparafinizadas por inmersión en Bioclear (Biopack) para posteriormente ser evaluadas por inmunohistoquímica o para ser teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) o Sirius Red (Direct Red 80, Sigma-Aldrich, Argentina) en solución de ácido pícrico (Picrosirius).

4.2.3.2. Análisis de preparados histológicos

La estructura del hígado y la organización del colágeno se evaluaron mediante microscopía óptica Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd, Japón) (Altamirano et al., 2018). Las imágenes de las secciones teñidas con H&E se tomaron con un objetivo de 20x. El análisis de las imágenes se realizó con el programa informático Image Pro-Plus 5.0.2.9 system (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.). El grado de esteatosis hepática se evaluó semicuantitativamente como el porcentaje de hepatocitos afectados. La puntuación de actividad NAFLD (NAS, por sus siglas en

inglés-NAFLD activity score) se realizó como se describe en Lackner (2018): esteatosis 0 (<5%); 1 (5-33%); 2 (34-66%); 3 (>66%); balonización hepatocelular 0 (ninguna); 1 (unas pocas células balonizadas); 2 (muchas células/inflamación lobular balonizada predominante); Focos inflamatorios 0 (ninguno); 1 (<2 focos/20× campo); 2 (2-4 focos/20× campo); 3 (>4 focos/ 20× campo). En consecuencia, el NAS oscila entre 0 y 8. El NAS es uno de los pocos sistemas de clasificación de NAFLD que ha sido validado externamente. Un NAS inferior a 3 muestra una buena correlación con los diagnósticos histológicos no NASH. y superior a 5 o «NASH», respectivamente. Una puntuación mayor o igual a cinco muestra correlación con los diagnósticos histológicos de NASH.

Por otro lado, la birrefringencia del colágeno de las muestras de hígado teñidas con Picrosirius se cuantificó mediante microscopía de polarización (Montes, 1996). Se evaluaron al menos 10 campos por sección de cada animal. El área ocupada por el colágeno se midió como densidad óptica integrada (IOD, por sus siglas en inglés) utilizando el programa informático Image Pro-Plus 4.1.0.1® System (Media Cybernetics, Silver Spring, EE.UU.). Las imágenes se registraron con una cámara de vídeo en color Spot Insight V3.5 acoplada a un microscopio Olympus BH2 y se convirtieron a escala de grises. La IOD se calculó como una combinación lineal de la intensidad gris media y la superficie relativa ocupada por el área estromal (Altamirano et al. 2018). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias.

4.2.4. Evaluación de la expresión de proteínas por inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica en la sección de hígado embebida en parafina (5 µm de grosor) para evaluar la expresión proteica del marcador de peroxidación lipídica 4-HNE, los factores de transcripción Nrf2 y NF-κB p65, TGF-β1 (Factor de crecimiento transformante β1), el marcador de macrófagos F4/80, la citoquina pro-inflamatoria IL-1β, IRS-1 y PGC-1α. Posteriormente a la desparafinización de las secciones de tejido, se realizó un pretratamiento con microondas para la recuperación de los antígenos. Se bloquearon la actividad de la peroxidasa endógena por inmersión en agua oxigenada de 30 vol. y los sitios de unión no específicos con una solución PBS-leche 2% p/v. Las muestras se incubaron en cámara húmeda primero con el anticuerpo primario específico durante 14-16 h a 4 °C y previo lavado con solución de PBS (pH 7,5) se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 30 min a temperatura ambiente. Las reacciones para la detección de marcación positiva se desarrollaron utilizando el método de estreptavidina-biotina peroxidasa y diaminobencidina (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) como sustrato cromógeno. Cada análisis inmunohistoquímico incluyó controles positivos (secciones de tejidos con alta expresión de las proteínas de interés) y controles negativos (en los que el anticuerpo primario se reemplazó por suero no inmune de la especie utilizada para generar el anticuerpo primario).

La expresión de 4-HNE, Nrf2, NFκB p65, TGF-β1, F4-80, IL-1β, IRS-1 y PGC-1α en las muestras de tejido hepático se evaluaron mediante análisis de imágenes utilizando el programa informático Image Pro-Plus system 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.). Las imágenes inmunomarcadas se capturaron utilizando un objetivo Dplan 40 × (apertura numérica, 0,65; Olympus) acoplado a una cámara de video en color Spot Insight V3.5. La cuantificación se realizó en al menos 10 campos seleccionados al azar por sección. Después de convertir cada imagen a escala de grises, se midió la densidad óptica integrada (IOD) como una combinación lineal de la intensidad media de grises y el área relativa ocupada por células positivas, como describieron previamente Ingaramo et al. (2019). Los anticuerpos utilizados se describen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Característica	Dilución	Nombre
Anti 4-HNE*	Monoclonal de ratón	1/50	MAB3249
Anti Nrf2	Monoclonal de ratón	1/50	sc-365949
Anti NFκB p65	Monoclonal de ratón	1/50	sc-8008
Anti TGF-β1	Monoclonal de ratón	1/50	sc-52893
Anti F4/80	Monoclonal de ratón	1/50	sc-377009
Anti IL-1β	Monoclonal de ratón	1/50	sc-52012
Anti IRS-1	Policlonal de conejo	1/50	sc-559
Anti PGC-1α	Monoclonal de ratón	1/50	sc-518025
Anti-ratón [#]	Conjugado con biotina/ policlonal de cabra	1/100	B8774

Proveedor de los anticuerpos utilizados: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.

*Proveedor de anticuerpo utilizado: R&D Systems.

[#]Proveedor de anticuerpo utilizado: Sigma-Aldrich.

4.2.5. Real-time PCR

Los niveles de ARNm de IL-10, FoxO1 y PI3K se determinaron mediante RT-PCR. El ARN total se obtuvo de muestras de tejido hepático utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). El ARN total (1 µg) se transcribió inversamente en ADNc con una transcriptasa inversa (Promega, Madison, WI, EE. UU.), utilizando cebadores aleatorios (Promega) y desoxinucleótido trifosfato (dNTP). La transcripción inversa se realizó a 37 °C durante 90 min y a 42 °C durante 15 min. Cada producto de la transcripción inversa se diluyó con agua libre de ribonucleasa a un volumen final de 60 µL y amplificado adicionalmente utilizando el sistema StepOne en tiempo real (ThermoFisher Scientific, Buenos Aires, Argentina). Para la amplificación de ADNc, se combinaron 5 µL de ADNc con HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix

Plus y 10 pmol de cebador (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ L. Para amplificar los genes, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando herramienta *primer BLAST* disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen de la proteína ribosomal L19. Los cebadores utilizados se describen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cebadores directo y reversos utilizados en las reacciones de qPCR para el estudio de la expresión génica.

Gen de interés	Cebador directo	Cebador reverso
L19	5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3'	5'-TGGCAGTACCCCTCCTCTTC-3'
IL-10	5'-CTGCTCTTACTGGCTGGA-3'	5'-CACTTGACTGAAGGCAGC-3'
FoxO1	5'-TGGTCTGAGGAGAGGATGGA-3'	5'-CAGCCCAGTTTACCTACCCA-3'
PI3K	5'-TTAACCCCTCACAGCAGAG-3'	5'-TTTCTGAACTGCAATGGCCC-3'

Después de la desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 min, la mezcla de reacción fue sometida a sucesivos ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación/ annealing durante 7 s a 55 °C y extensión a 72 °C durante 20 s. Para cada muestra, se calculó el umbral de ciclo (CT) como la diferencia en CT entre el ARNm objetivo y el ARNm L19. El CT para cada muestra se calculó utilizando el software StepOne (ThermoFisher Scientific, Buenos Aires, Argentina). Dependiendo de las condiciones específicas de la PCR, la eficiencia varió entre 95% y 105%. La expresión relativa de cada gen en los distintos experimentos se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa. Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen de referencia fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen de referencia en cada grupo experimental. No se observaron diferencias en la expresión del gen de referencia entre los diferentes grupos experimentales.

4.2.6. Western Blot

4.2.6.1 Niveles de masa proteica de Nrf2, NF- κ B, GLUT-2, PAI-1, F4/80, AMPK, p-AMPK, IL-1 β y p-AKT^{Ser 473}

1. Preparación de extractos proteicos

Para la preparación de los extractos proteicos, aproximadamente 100 mg de tejido hepático congelado de cada animal perteneciente a cada uno de los lotes experimentales fueron homogeneizados a 4 °C en buffer RIPA conteniendo: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio al 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM, Na₃VO₄ 1 mM y cocktail inhibidor de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA) 3 μ L de

cocktail/ 100 µL de buffer. Luego de 30 min de incubación a 4 °C, el homogenato fue centrifugado a 12500 rpm durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue recolectado y almacenado a -80 °C hasta su utilización. El contenido de proteínas en el extracto fue determinado utilizando un kit comercial (método de Bradford) y albúmina sérica bovina como standard.

2. Determinación por Western Blot

Las muestras se desnaturalizaron durante 3 min a ebullición en un buffer de muestra según Laemmli (1970) (Tris-HCl 60 mM, glicerol 10 %, SDS 2 %, β mercaptoetanol 1,25 %, azul bromofenol 0,01 %) y fueron resueltas (80/100 µg proteína/calle) por electroforesis en gel de poliacrilamida (al 10%) conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). La corrida electroforética fue llevada a cabo en un buffer (pH 8,3) conteniendo Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1 %. En cada uno de los geles se sembraron marcadores de peso molecular comerciales. Las proteínas del gel se electro-transfirieron (45 volts constantes) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante toda la noche a 4°C empleando un buffer de transferencia (pH 8,8) conteniendo: Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,01 % y metanol 20 %. La eficiencia de la transferencia fue corroborada mediante la tinción de la membrana con Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas con buffer Tris conteniendo Tween 20 0,1 % y albúmina sérica bovina o leche descremada 5% durante 2 h a 4°C con agitación.

Para el *immunoblotting* las membranas se expusieron a los anticuerpos primarios específicos (**Tabla 8**) durante toda la noche a 4 °C con agitación. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 h, con agitación y a temperatura ambiente. Las bandas fueron visualizadas por quimioluminiscencia de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Super Sigma West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software para capturar imágenes *Scion Image Release Beta* versión 4.0.2 (NIH, USA). La relación entre la cantidad de muestra procesada en el *immunoblotting* y la intensidad de señal observada fue lineal bajo las condiciones previamente descriptas. Los niveles de la masa proteica de la proteína en estudio fueron normalizados con los niveles de la masa proteica del marcador β-actina.

Los niveles de masa proteica de p-AKT^{Ser473} fueron determinados en condiciones basales y tras el estímulo insulínico. Para la evaluación post-estímulo de esta molécula, se extrajeron muestras de tejido hepático al finalizar el protocolo de estimulación con insulina, descrito en el ítem 4.3.2.

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en Western Blot

Anticuerpo	Característica	Dilución	Nombre
Anti-p-AKT ^{Ser 473}	Monoclonal de ratón	1/800	sc-293125
Anti-Nrf2	Monoclonal de ratón	1/400	sc-365949
Anti-NF-κB p65	Monoclonal de ratón	1/400	sc-136548
Anti-GLUT-2	Policlonal de conejo	1/200	sc-9117
Anti-AMPK	Policlonal del conejo	1/200	sc-25792
Anti-p-AMPK	Policlonal de conejo	1/200	sc-33524
Anti-PAI-1	Monoclonal de ratón	1/300	sc-5297
Anti-F4/80	Monoclonal de ratón	1/300	sc-377009
Anti-IL-1β	Monoclonal de ratón	1/200	sc-52012
Anti-conejo IgG-HRP	Monoclonal de cabra	1/1000	sc-2004
m-IgGκ BP-HRP	Ratón (recombinante)	1/1000	sc-516102
Anti-β-actina	Monoclonal de ratón	1/1000	sc-47778

Proveedor de los anticuerpos utilizados: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.

4.2.7 Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana

Se extrajeron los lípidos totales del tejido hepático mediante el método de Folch et al. (1957) utilizando una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 y solución acuosa de NaCl 0,73%. La fase orgánica conteniendo todos los lípidos presentes en la muestra se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílica para obtener la fracción que contenía los fosfolípidos. La pureza de la fracción se verificó por cromatografía en capa fina. Sobre esta muestra disuelta en hexano se procedió con la reacción de transesterificación para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos. Se utilizó para esta reacción KOH 0.7 M en mezcla 70% metanol/agua según Ichihara et al. (2010). Una alícuota de la fase orgánica superior se analizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS).

El equipo empleado fue CGC HP 6890/MS Agilent 5975C VL, la columna capilar utilizada fue DB-FATWAX UI (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm). El gas portador fue Helio a 1,0 ml/min en flujo constante, con un programa de temperatura de 50°C, 1 min, 50°/min - 175°C, 3°/min - 250°, 10 min. El inyector utilizado fue modo splitless a 260°C y el detector MS, 70 Ev, rango de masas 35-600 uma; fuente a 230°C y cuadrupolo a 150°C. La identificación se realizó por comparación de espectros de masa obtenidos con la biblioteca comercial de espectros NIST05, uso de estándar comercial de EMAG y datos bibliográficos.

Los resultados se expresan como % de cada AG respecto al total de ácidos grasos. Esta determinación fue realizada en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Universidad de Ciencias Médicas, La Plata, Argentina.

4.3 Determinaciones in vivo

4.3.1 Test de tolerancia endovenoso a la glucosa

Un grupo de animales de cada lote (6 animales por grupo) fue anestesiado por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (60mg/kg peso) luego de un período de 16 – 18 h de ayuno. Posteriormente, se procedió a canular las dos venas yugulares (utilizando cánulas heparinizadas), por una de ellas se obtuvo con jeringa heparinizada la muestra de sangre basal ($t=0$). A continuación, por la misma vía se administró lentamente una solución de glucosa (0,5 g de glucosa/kg de peso corporal). Luego, por la otra vía se realizaron extracciones de sangre en los tiempos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min. Esto se realizó con jeringa heparinizada y la glucemia se determinó utilizando el equipo Accu-Chek Sensor Confort (Roche) utilizando tiras reactivas adecuadas. Luego de cada extracción, el volumen de sangre extraído se reemplaza por solución salina isotónica. Se calculó la constante de desaparición de glucosa en sangre (K_g) durante la prueba como se describió previamente (D'Alessandro et al. 2012 y D'Alessandro et al. 2014). El área bajo la curva (ABC) se calculó utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA).

4.3.2 Determinaciones post estímulo insulínico

Para las determinaciones post estímulo insulínico, otro lote de animales (6 animales por grupo) de los diferentes grupos experimentales fue ayunado (overnight) al final del periodo experimental. Los animales fueron pesados y anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. Posteriormente, se inyectó por vía intraperitoneal insulina (10 U/kg peso corporal de insulina humana; Humulin R, Lilly Indianápolis, USA). Para obtener datos en condiciones basales, un grupo de ratas de cada lote recibió una inyección de 0.9 g% NaCl. El hígado fue removido luego de 1 min y almacenado a -80 °C (Giani et al., 2009; Bettaieb et al., 2014).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como media $\pm$ SEM. Se probó la varianza de los datos mediante la prueba de *Levene* y la normalidad mediante la prueba *Shapiro Wilk*. Las diferencias estadísticas entre los grupos DR, DRS y DRS+Chia fueron determinadas por ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de *Newman-Keuls*. La significancia estadística entre dos grupos (DR y DRS) se determinó mediante la prueba *t* de *Student*. Los valores de *p* menores a 0,05 fueron

considerados estadísticamente significativos. Los tratamientos estadísticos se realizaron con el software SPSS 17.0 para Windows, SPSS INC. Chicago, Illinois.

REACTIVOS

Los kits enzimáticos para las determinaciones de glucosa (Glicemia enzimática), triacilglicéridos (TG color GPO/PAP AA), colesterol total (Colestat enzimático), ácido úrico (Uricost), transaminasas 200 (GPT y GOT), fosfatasa alcalina (Fosfatasa alcalina optimizada) fueron provistos por laboratorio *Wiener Lab.* (Argentina). El kit enzimático para la determinación de AGNE fue provisto por *Randox Laboratories Limited* (Reino Unido).

La insulina de rata es producto de *Novo Nordisk* (Dinamarca) y la insulina recombinante humana, Humulin R, Lilly (Indianápolis, USA). La membrana de PVDF Amersham™ Hybond™ PO.45 es un producto de *GE Healthcare Life Science* (Alemania). El marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards, #1610374 de Bio-Rad. Sustratos quimioluminiscentes SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, *Pierce Biotechnology*, Rockford, IL. La transcriptasa reversa MMLV es de Promega Inc. (USA). Los random primers son de Genbiotech (Argentina). EvaGreen Supermix es de Bio-Rad. Kits dNTPs es de Inbio Highway.

Los siguientes reactivos fueron provistos por *Sigma-Aldrich Inc.* (USA): reactivo de Bradford, Trizol, cocktail inhibidor de proteasas, estándar de Hidroxiprolina, albumina sérica bovina (BSA), EDTA, EGTA, DTT, NADP⁺, NADPH, trietanolamina, Glucosa-6-P, hematoxilina y eosina, Picrosirius red, p-dimetilaminobenzaldehído, Triton X-100, tween 20, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, Coomassie brilliant blue R-250, Ponceau S, deoxicolato de sodio, HEPES, tris, glutatión reductasa, DTNB, NBT, NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, 3-aminopropil trietoxisilano, G6PDH (*Leuconostoc mesenteroides*), GSH, GSSG.

Los demás reactivos químicos utilizados son de grado analítico.

RESULTADOS

1. Peso corporal, ganancia de peso e ingesta energética

El peso corporal y la ingesta energética fueron cuidadosamente monitoreados en los animales pertenecientes a los diferentes grupos dietarios durante los 6 meses del período experimental. El peso corporal (expresado en g) y la ingesta energética (expresada en kJ) a lo largo del mismo se muestran en la **Figura 16 y Tabla 9**. Las diferentes dietas fueron aceptadas y asimiladas por los animales en forma adecuada. Además, durante los últimos 3 meses del período experimental se observó que el peso corporal de los animales alimentados con DRS y DRS+Chia fue significativamente mayor ($p<0,05$) que el registrado en el grupo DR. Esto se acompañó de un patrón similar en la ingesta energética.

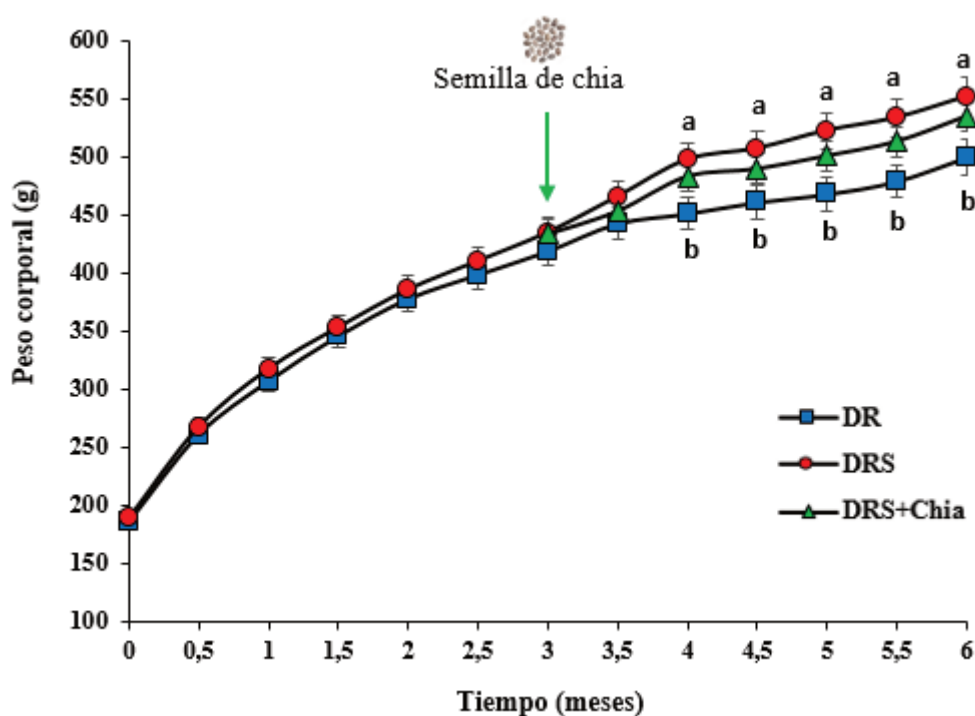


Figura 16: Peso corporal en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). * DR vs DRS y DRS+Chia ($p<0,05$).

Tabla 9: Peso corporal inicial, ganancia de peso, ingesta energética de los animales alimentados con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia).

	DR	DRS	DRS+Chia
Peso corporal inicial (g)	185,9 ± 1,0 ^a	189,8 ± 1,0 ^a	
Ganancia de peso (0-3 meses) (g)	236,1 ± 5,4 ^a	237,5 ± 8,5 ^a	
Ganancia de peso (3-6 meses) (g)	71,9 ± 3,3 ^b	90,6 ± 4,4 ^a	84,6 ± 4,3 ^a
Ingesta energética final (kJ/día)	299,4 ± 9,3 ^b	405,3 ± 11,2 ^a	409,1 ± 9,8 ^a

Los valores se expresan como media ± SEM (n= 6). Los valores en una fila que no comparten la misma letra superíndice son significativamente diferentes ($p<0,05$).

2. Bioquímica del suero

En la **Tabla 10** se observa, al final del período experimental, un incremento significativo ($p<0,05$) en los niveles séricos de glucosa, TG, colesterol total, AGNE, ácido úrico y las enzimas de daño hepático (GPT, GOT y FA) en ratas alimentadas crónicamente con DRS cuando se comparan con el grupo DR. Al reemplazar la fuente grasa, aceite de maíz por semilla de chia los valores hallados en los parámetros mencionados anteriormente fueron similares a los observados en los animales alimentados con DR. Niveles similares de insulinemia se observaron en los animales de los tres grupos dietarios en estudio. En conjunto, estos hallazgos confirman los datos obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo (Chicco et al., 2009; Rossi et al. 2013).

Tabla 10. Niveles de metabolitos e insulina séricos en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia).

	DR	DRS	DRS+Chia
Glucosa (mM)	6,66 ± 0,03 ^b	7,86 ± 0,19 ^a	6,59 ± 0,07 ^b
Insulina (pM)	398,2 ± 29,1	410,9 ± 26,5	432,9 ± 29,3
TG (mM)	0,96 ± 0,04 ^b	1,47 ± 0,05 ^a	0,95 ± 0,04 ^b
Colesterol total (mM)	2,95 ± 0,13 ^b	3,68 ± 0,03 ^a	3,20 ± 0,06 ^b
AGNE (μM)	361,3 ± 32,8 ^b	575 ± 54,0 ^a	358 ± 48,5 ^b
Ácido Úrico (μM)	67,51 ± 6,45 ^b	87,97 ± 9,34 ^a	48,06 ± 4,21 ^b
GPT (U/L)	20,99 ± 0,60 ^b	41,43 ± 6,81 ^a	19,69 ± 1,03 ^b
GOT (U/L)	23,43 ± 2,70 ^b	60,98 ± 6,46 ^a	19,24 ± 2,08 ^b
FA (U/L)	299,03 ± 28,24 ^b	495,53 ± 42,06 ^a	257,52 ± 35,98 ^b

Los valores se expresan como media ± SEM (n= 6). Los valores en una fila que no comparten la misma letra superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$). **TG**: Triacilglicéridos; **AGNE**: Ácidos grasos no esterificados; **GPT**: Transaminasa glutámico pirúvica; **GOT**: Transaminasa glutámico oxalacética; **FA**: Fosfatasa alcalina.

3. Peso del tejido hepático y parámetros histomorfométricos

La **Figura 17 A y B**, muestran el peso y el índice somático del tejido hepático. Ambos parámetros fueron similares en los tres grupos experimentales (DR, DRS y DRS+Chia). La **Figura C** muestra el análisis histológico del hígado de los animales pertenecientes a los diferentes lotes en estudio. En el grupo DRS se observó la presencia de esteatosis (gotas pequeñas o grandes), balonización hepatocelular y agregados inflamatorios, mientras que no se encontraron anomalías histológicas en los grupos DR y DRS+Chia. La puntuación NAS fue mayor en el grupo DRS (puntuación = 4). En el grupo DRS+Chia, este parámetro disminuyó ($p < 0,05$) alcanzando valores de referencia (Tabla inserta en **Figura C**).

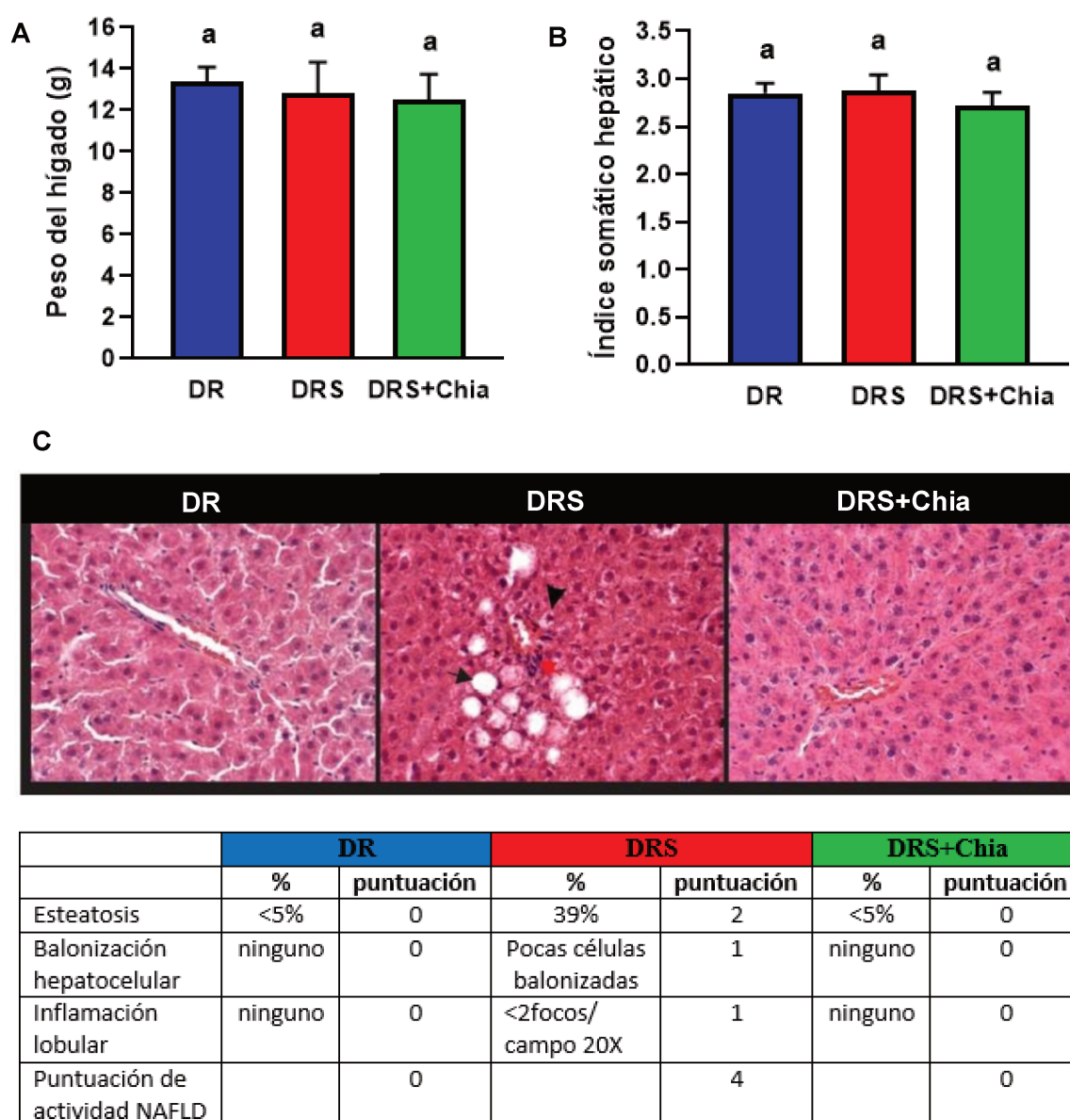


Figura 17: (A) Peso del hígado, (B) índice somático hepático, (C) microfotografía representativa de las anomalías histológicas observadas en secciones de hígado de ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semillas de chia (DRS+Chia). Los hepatocitos balonizados (punta de flecha negra), la acumulación de gotas de lípidos (flecha negra) y focos inflamatorios (flecha roja). Aumento de 400x. Tabla inserta: Sistema de puntuación histológica del grado de actividad de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAS) en secciones hepáticas. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

4. Contenido de TG en hígado

La **Figura 18** muestra el contenido de TG en el tejido hepático de los diferentes grupos dietarios. El grupo DRS presentó un aumento significativo ($p<0,05$) del contenido de triglicéridos hepático en comparación con el grupo DR. En el grupo DRS+Chia este parámetro disminuyó significativamente ($p<0,05$) alcanzando valores similares al grupo DR.

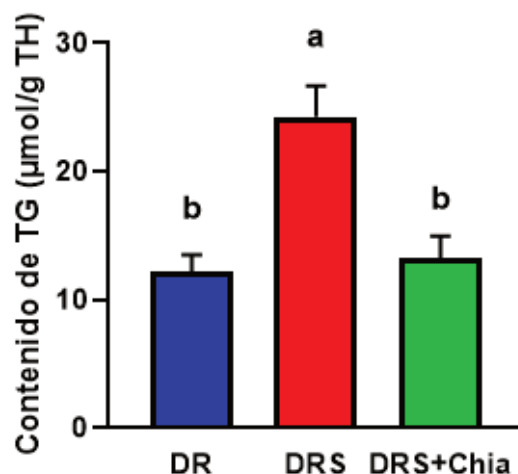


Figura 18: Contenido de triacilglicéridos en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls. TH: Tejido húmedo.

5. Marcadores de fibrosis hepática

5.1. Contenido de colágeno e hidroxiprolina

En la **Figura 19, A y B** se observa el análisis histológico del tejido hepático de los diferentes grupos experimentales. La deposición del colágeno se cuantificó por el método de Picrosirius-polarización. Las ratas alimentadas con DRS mostraron un aumento significativo de la presencia de fibras de colágeno en la pared vascular y los espacios intersticiales, lo que sugiere una fibrosis temprana. La proporción de colágeno positivo al área total en el grupo DRS fue significativamente mayor ($p<0,05$), mientras que la acumulación de colágeno se redujo significativamente ($p<0,05$) en el grupo DRS+Chia (C). La concentración de hidroxiprolina también fue mayor ($p<0,05$) en el grupo DRS, mientras que este parámetro mejoró significativamente ($p<0,05$) en el grupo DRS+Chia, alcanzando valores similares a los del grupo DR (D).

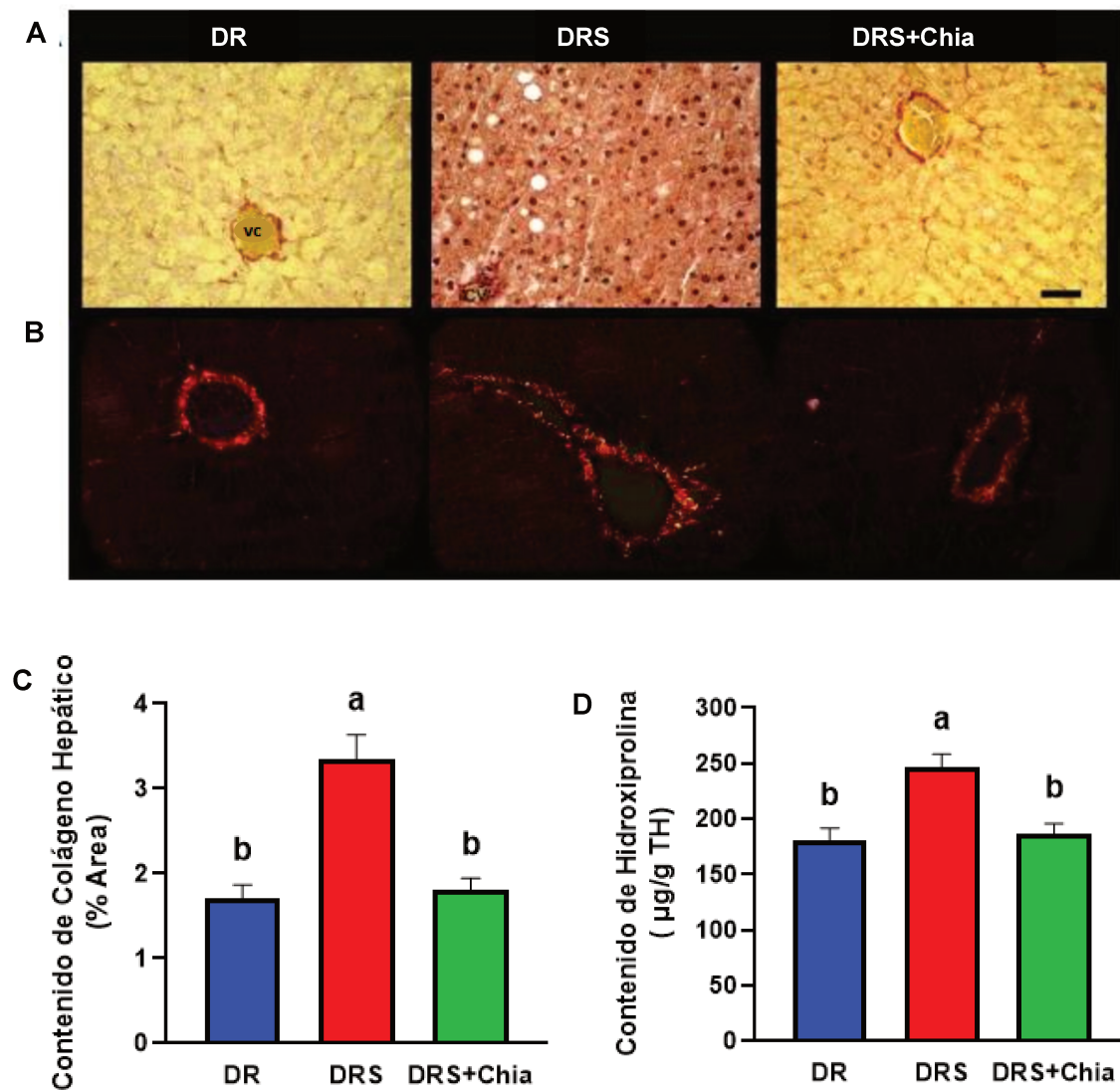


Figura 19: Contenido de colágeno e Hidroxiprolina en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls. TH: Tejido húmedo. Vc: Vena central.

5.2. Expresión proteica de TGF- β 1

La **Figura 20A** muestra las microfotografías representativas y la **Figura 20B** el análisis cuantitativo de la expresión proteica de TGF- β 1 en el hígado. En el grupo DRS se observó un aumento ($p<0,05$) de la expresión proteica del TGF- β 1 en hígado. La expresión de proteína fue más alta alrededor de los vasos que en el estroma. En el grupo DRS+Chia la expresión proteica fue menor ($p<0,05$) en comparación con el grupo DRS alcanzando valores similares al grupo DR.

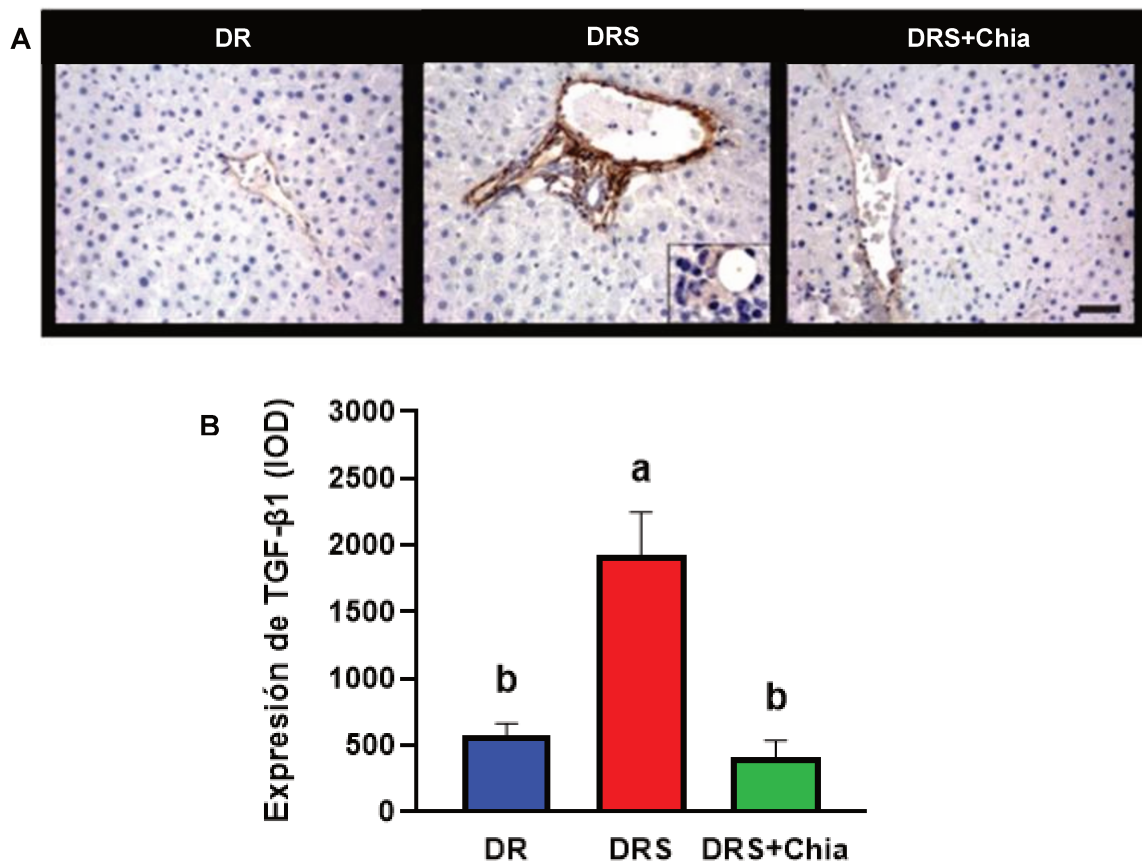


Figura 20: Expresión proteica de TGF- β 1 en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

6. Marcadores de estrés oxidativo y defensas antioxidantes

6.1. Peroxidación lipídica y especies reactivas del oxígeno

La **Figura 21A** muestra un aumento significativo ($p<0,05$) del contenido hepático de TBARS en el grupo DRS en comparación con el grupo DR. En el grupo DRS+Chia, este parámetro disminuyó significativamente ($p<0,05$), alcanzando valores similares a los del grupo DR. Las **Figuras B y C** muestran microfotografías representativas y análisis cuantitativos de la expresión de 4-HNE en el hígado. El grupo DRS presentó una mayor expresión de proteínas modificadas por 4-HNE ($p<0,05$) que el grupo DR. La expresión mostró una localización tanto citoplasmática como nuclear. La administración de semillas de chia revirtió el aumento en la expresión de proteínas modificadas por 4-HNE ($p<0,05$). Estos resultados fueron acompañados por un aumento significativo ($p<0,05$) de ROS hepáticos (**D**) en el grupo DRS comparado con el grupo DR. Cuando se incorporó la semilla de chia como fuente de grasa en el grupo DRS durante los últimos 3 meses del periodo experimental, este parámetro disminuyó significativamente ($p<0,05$), alcanzando valores similares a los del grupo DR.

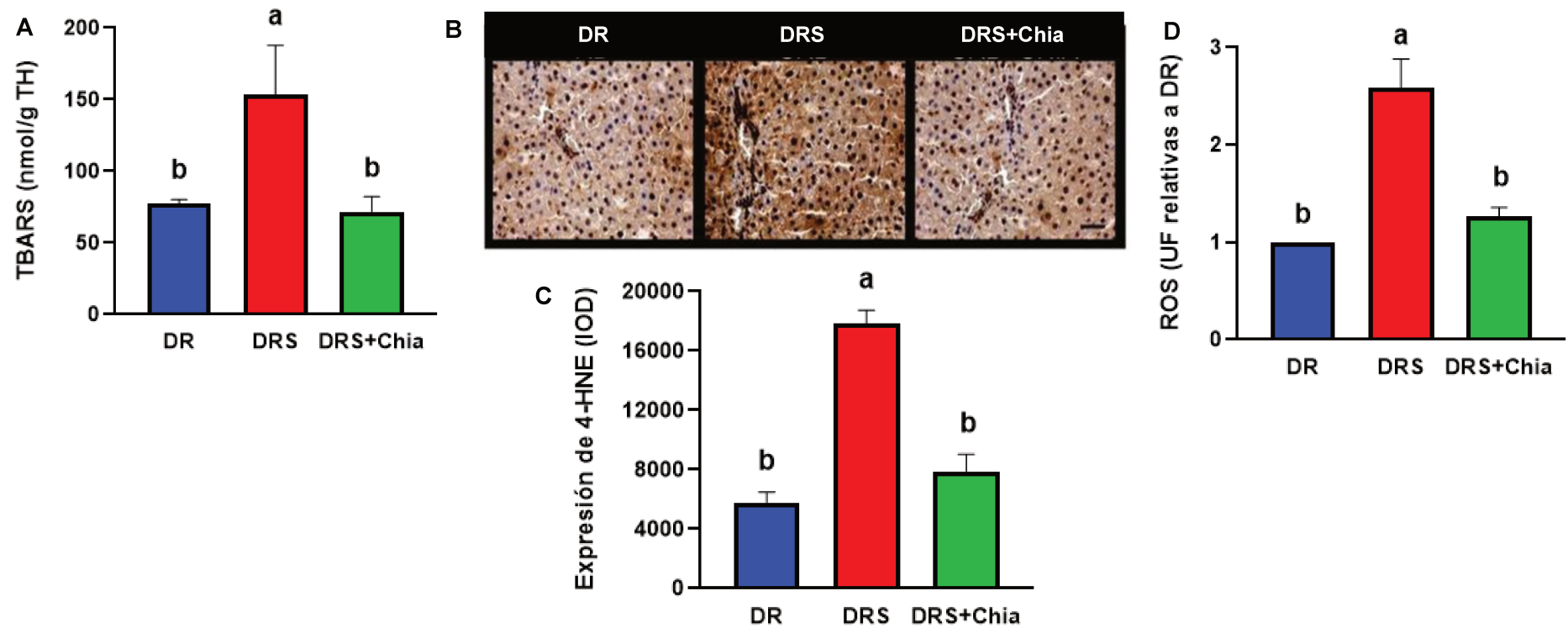


Figura 21: (A) Contenido de TBARS. (B) Microfotografías representativas de cortes histológicos (x400) que muestran el patrón de expresión de proteínas modificadas por 4-HNE en secciones de tejido hepático. (C) Expresión de proteínas modificadas por 4-HNE. (D) Contenido de especies reactivas del oxígeno (ROS) en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls. TH: Tejido húmedo.

6.2. Sistema de defensa antioxidante

La **Figura 22** muestra que la capacidad antioxidante sérica y hepática (FRAP) se redujo drásticamente en el grupo DRS. La administración de semillas de chia aumentó la capacidad antioxidante sérica y hepática, alcanzando valores similares a los del grupo DR (**Figuras A y B**). Además, se observó una disminución significativa del contenido de GSH y la actividad de las enzimas SOD, CAT, GPx y GR en el grupo DRS. La incorporación de semillas de chia en la dieta aumentó el contenido de GSH y las actividades de estas enzimas, alcanzando valores similares a los observados en los animales alimentados con DR (**Figuras C-G**).

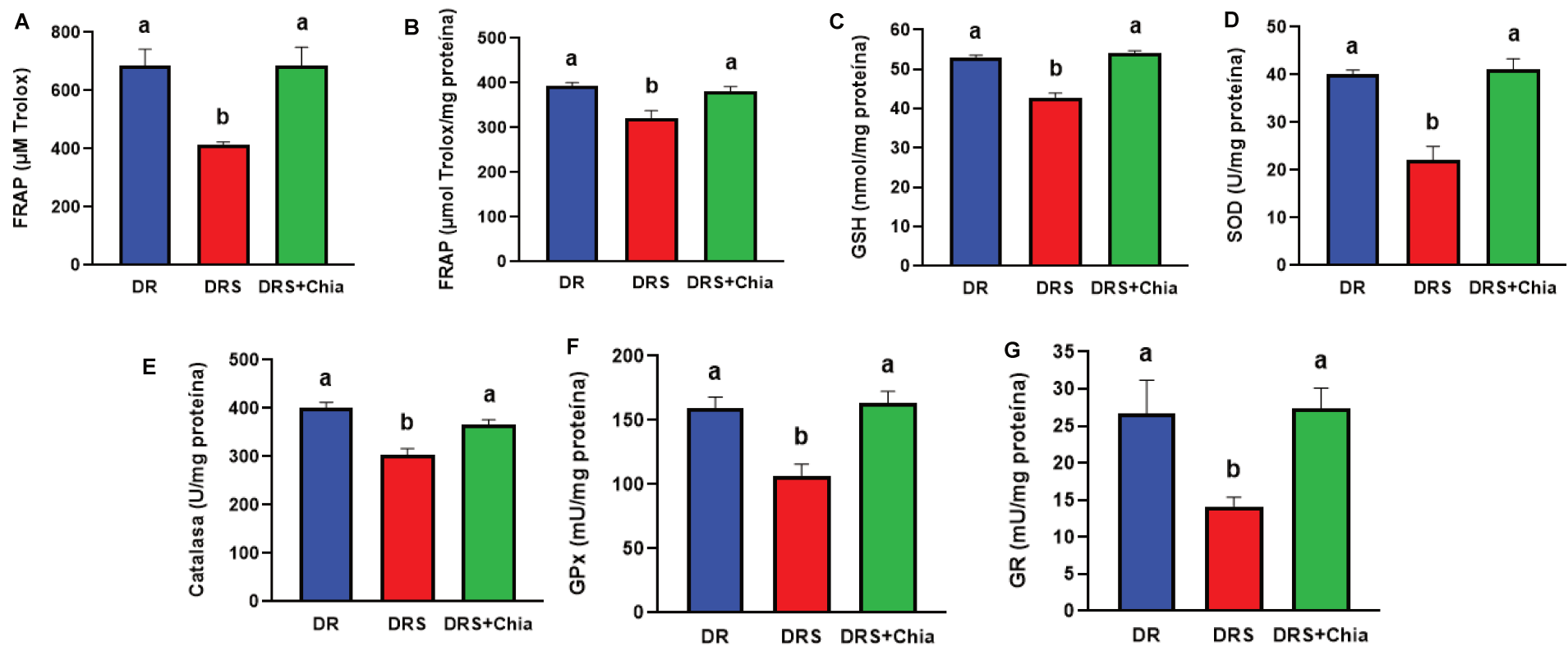


Figura 22: (A) Niveles de FRAP en suero. (B) Niveles de FRAP en tejido hepático. (C) Contenido de GSH en tejido hepático. (D) Actividad enzimática de SOD. (E) Actividad enzimática de catalasa. (F) Actividad enzimática de GPx. (G) Actividad enzimática de GR en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls. GSH: Glutati3n; SOD: Super3xido dismutasa; GPx: Glutati3n peroxidasa; GR: Glutati3n reductasa.

7. Marcadores asociados a inflamación

7.1. Citoquinas pro y anti-inflamatorias

En las **Figuras 23 A y B** se observan que los niveles elevados de IL-6 y TNF- α en plasma de ratas alimentadas con una DRS se revirtieron en el grupo DRS+Chia, alcanzando valores similares a los de las ratas alimentadas con DR.

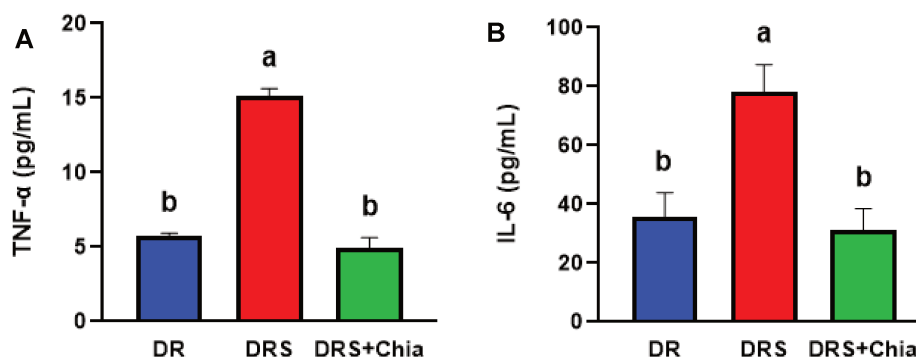


Figura 23: (A) Niveles plasmáticos de TNF- α . (B) Niveles plasmáticos de IL-6 en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

Las **Figuras 24 A y B** muestran microfotografías representativas y análisis cuantitativo de la expresión de IL-1 β en hígado. El grupo DRS presentó una incrementada ($p<0,05$) expresión de IL-1 β en comparación con el grupo DR. La expresión de IL-1 β mostró localización celular citoplasmática y se observó principalmente alrededor de los vasos sanguíneos. En el grupo DRS+Chia, la expresión proteica disminuyó ($p<0,05$) alcanzando valores de referencia. El análisis de Western blot reveló que los niveles de masa proteica de IL-1 β hepática aumentaron ($p<0,05$) en las ratas alimentadas con DRS en comparación con el grupo DR. En el grupo DRS+Chia, este valor disminuyó ($p<0,05$), alcanzando valores similares al grupo DR (**Figura C**).

Los niveles de masa proteica de PAI-1 se muestran en la **Figura D**. Un incremento en los niveles de PAI-1 fue evidenciado en el tejido hepático de los animales que consumieron DRS al compararlo con el grupo DR ($p<0,05$). Cuando se incorporó la semilla de chia como reemplazo de la fuente grasa en la DRS, este parámetro disminuyó ($p<0,05$), retornando a valores de referencia.

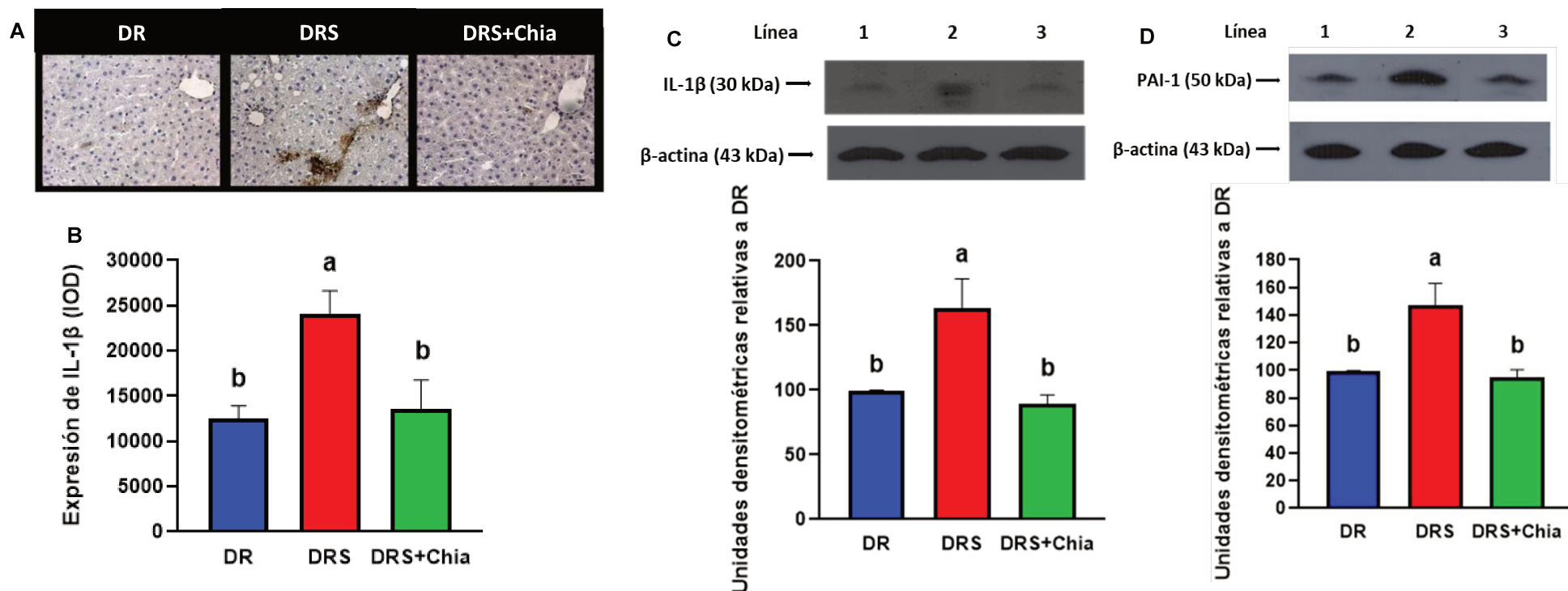


Figura 24: (A) Microfotografías representativas de cortes histológicos (x400) que muestran el patrón de expresión proteica de IL-1 β en secciones de tejido hepático. (B) Expresión proteica de IL-1 β en tejido hepático. (C) Niveles de masa proteica de IL-1 β en tejido hepático. (D) Niveles de masa proteica de PAI-1 en tejido hepático. *Panel superior:* inmunoblot representativo de PAI-1 y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda; *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de PAI-1 en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

La **Figura 25** muestra que la expresión del ARNm de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) disminuyó ($p<0,05$) en el tejido hepático de ratas alimentadas con DRS, en comparación con aquellas alimentadas con DR. En cuanto al grupo DRS+Chia, se observó un incremento ($p<0,05$), en la expresión de ARNm de IL-10 alcanzando valores similares a los observados en el grupo DR.

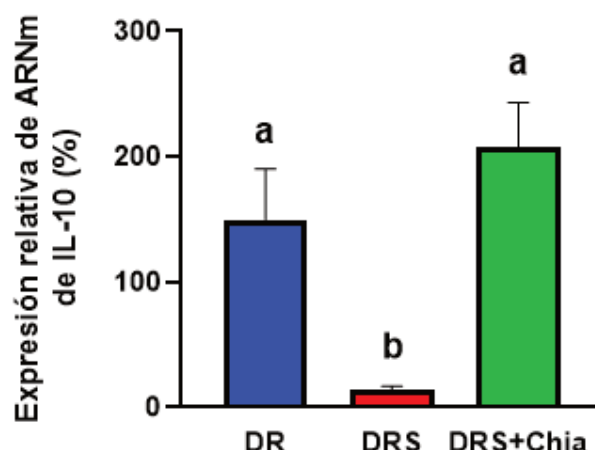


Figura 25. Expresión relativa del ARNm de IL-10 en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

7.2 Expresión y niveles de masa proteica de F4/80 y actividad de la enzima MPO

La **Figura 26** muestra microfotografías representativas (**A**) y análisis cuantitativo (**B**) de la expresión de F4/80 en el hígado. El grupo DRS presentó un mayor porcentaje de células positivas F4/80 ($p<0,05$) en comparación con el grupo DR. La expresión de F4/80 mostró localización citoplasmática. En el grupo DRS+Chia, las células positivas disminuyeron ($p<0,05$) en comparación con el grupo DRS alcanzando valores similares al grupo DR. El análisis de Western blot reveló que los niveles de masa proteica de F4/80 hepático aumentaron ($p<0,05$) en ratas alimentadas con DRS. En el grupo DRS+Chia se observó una disminución de los niveles de masa proteica F4/80 ($p<0,05$), alcanzando valores similares a los del grupo DR (**Figura C**).

La **Figura D** muestra un incremento ($p<0,05$) de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en el tejido hepático de los animales alimentados con DRS. En el grupo DRS+Chia, este parámetro disminuyó ($p<0,05$), alcanzando valores similares al grupo DR.

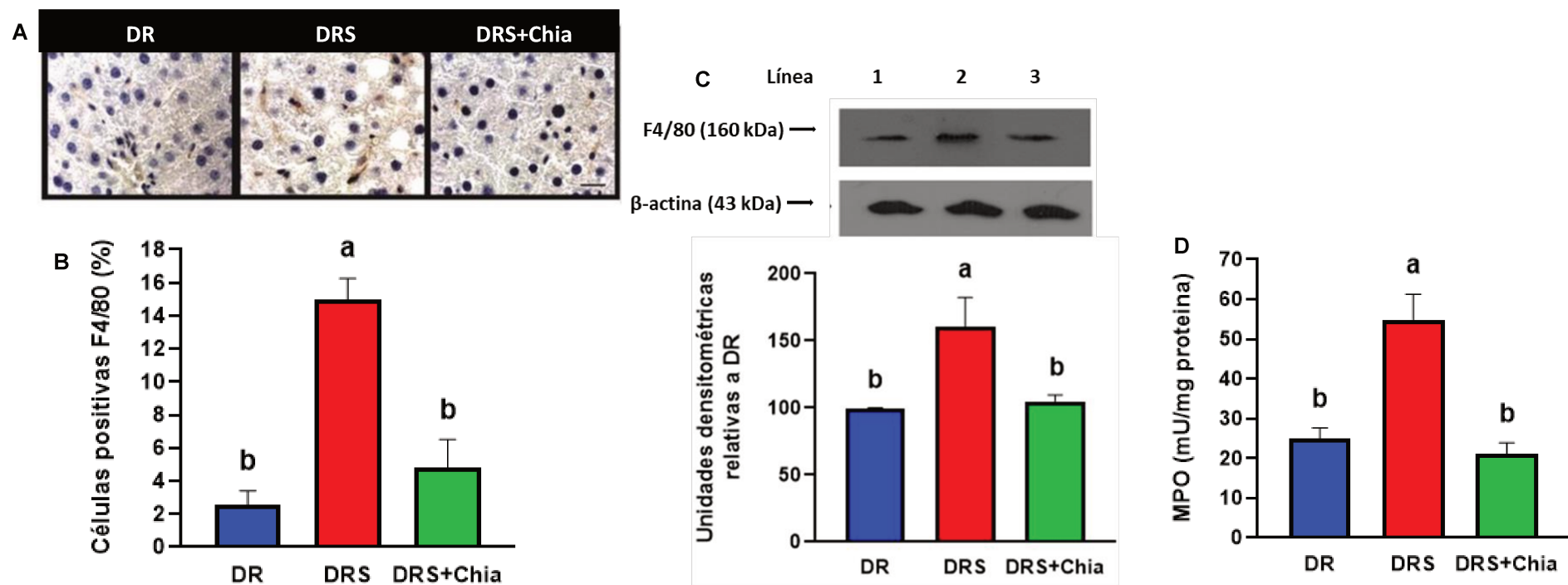


Figura 26: (A) Microfotografías representativas de cortes histológicos (x400) que muestran el patrón de expresión proteica de F4/80 en secciones de tejido hepático. (B) Expresión proteica de F4/80. (C) Niveles de masa proteica de F4/80 en tejido hepático. *Panel superior:* inmunoblot representativo de F4/80 y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda. *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de F4/80 (D) Actividad de la enzima mieloperoxidasa en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

7.3. Factores de transcripción asociados a estrés oxidativo e inflamación

La **Figura 27** muestra microfotografías representativas (**A y D**) y análisis cuantitativo (**B y E**) de la expresión de Nrf2 y NF- κ B en el hígado de los diferentes grupos experimentales. En el grupo DRS se observó una disminución ($p<0,05$) de la expresión proteica de Nrf2 acompañada de un aumento ($p<0,05$) de la expresión proteica de NF- κ B p65. Nrf2 mostró expresión nuclear predominante y en menor medida expresión citoplasmática. La expresión de NF- κ B p65 mostró localización tanto nuclear como citoplasmática. En el grupo DRS+Chia se observó un aumento ($p<0,05$) de la expresión proteica de Nrf2 y una disminución ($p<0,05$) de NF- κ B p65 en comparación con el grupo DRS. El análisis de Western blot reveló que la semilla de chia logró incrementar los niveles de masa proteica de Nrf2 y reducir los niveles de masa proteica de NF- κ B p65 hepático que se encontraban alterados en el grupo DRS (**Figuras C y F**).

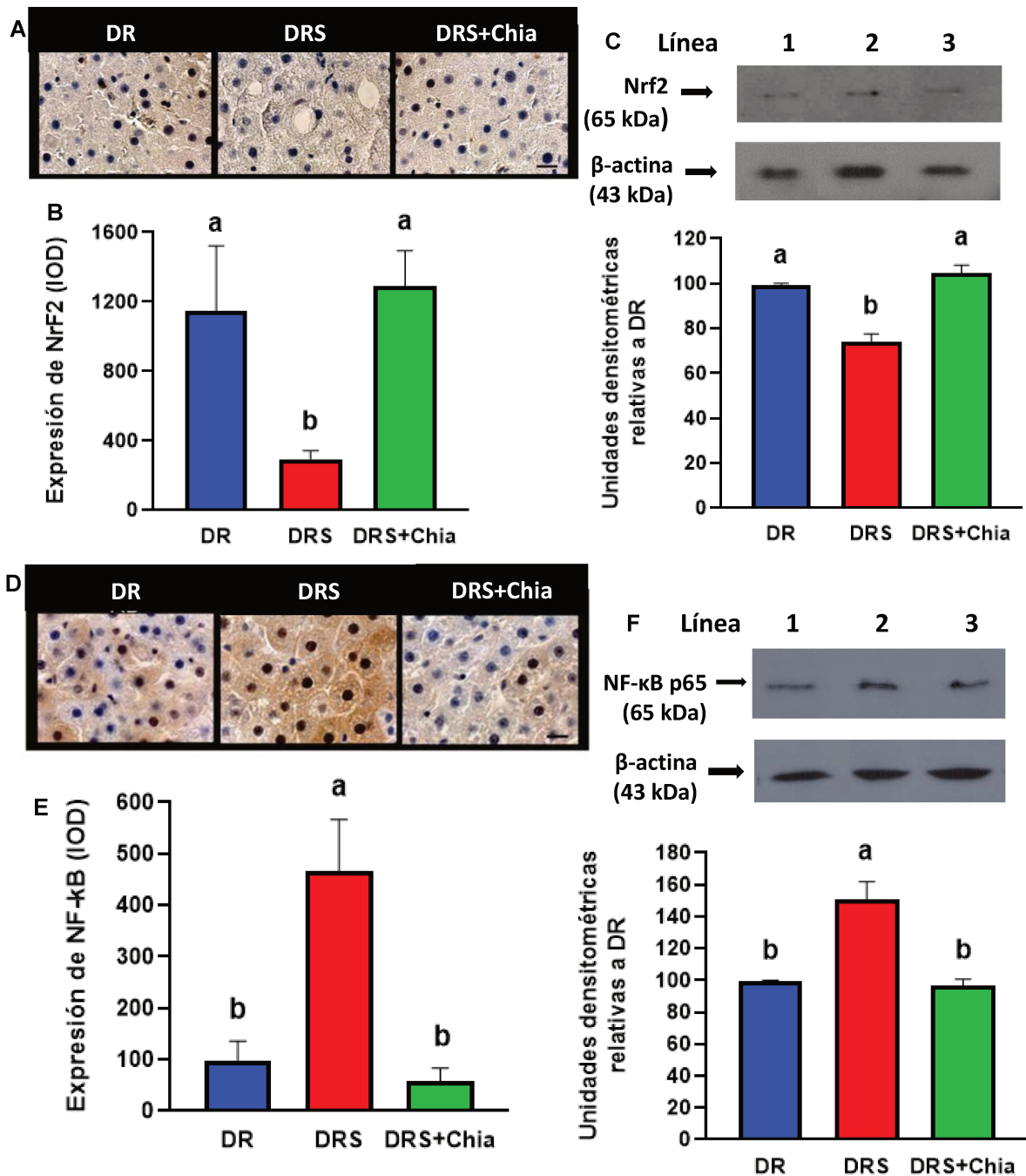


Figura 27: (A) Microfotografías representativas de cortes histológicos (x400) que muestran el patrón de expresión proteica de Nrf2 en secciones de tejido hepático. (B) Expresión proteica de Nrf2. (C) Niveles de masa proteica de Nrf2 en tejido hepático. *Panel superior:* inmunoblot representativo de Nrf2 y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda. *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de Nrf2. (D) Microfotografías representativas de cortes histológicos (x400) que muestran el patrón de expresión proteica de NF- κ B en secciones de tejido hepático. (E) Expresión proteica de NF- κ B. (F) Niveles de masa proteica de NF- κ B en tejido hepático. *Panel superior:* inmunoblot representativo de NF- κ B y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda. *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de NF- κ B en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no

comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

8. Prueba *in vivo*

8.1. Test de tolerancia endovenoso a la glucosa (TTEVG)

La **Figura 28A** muestra los niveles de glucosa en sangre durante el test de tolerancia endovenoso a la glucosa. La Tabla inserta en la **Figura 28A** muestra la constante de desaparición de la glucosa (Kg), observándose una reducción significativa ($p<0,05$) de la misma en los animales alimentados con DRS en comparación con el grupo DR. El grupo DRS+Chia mostró un incremento significativo ($p<0,05$) en la velocidad de desaparición de la glucosa, aunque no alcanzó valores de referencia. Estos resultados se acompañan con los valores obtenidos del área bajo la curva en los diferentes lotes experimentales (**Figura B**).

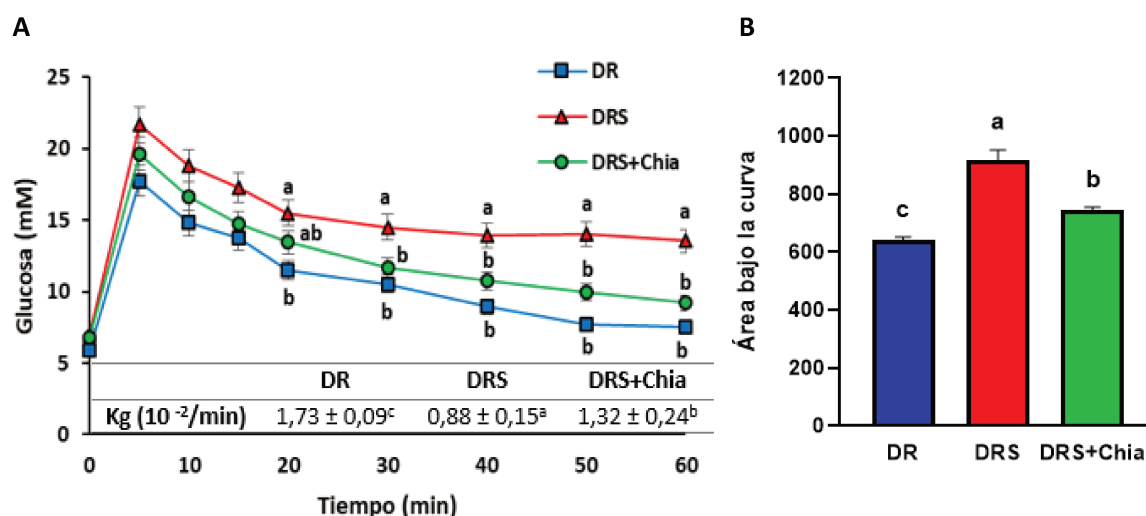


Figura 28: Prueba de tolerancia endovenoso a la glucosa en ratas alimentadas con la dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). (A) Niveles de glucosa en sangre durante del TTEVG. (B) Área de glucosa bajo la curva durante el TTEVG. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9. Transporte y fosforilación de glucosa, neoglucogénesis y vía de señalización de la insulina

9.1 Niveles de masa proteica del transportador hepático de glucosa GLUT-2

La **Figura 29** muestra un aumento ($p<0,05$) en los niveles de masa proteica del transportador de membrana GLUT-2 en el grupo DRS. En el grupo DRS+Chia los niveles de masa proteica de GLUT-2 mostraron valores similares a los observados en el grupo DR.

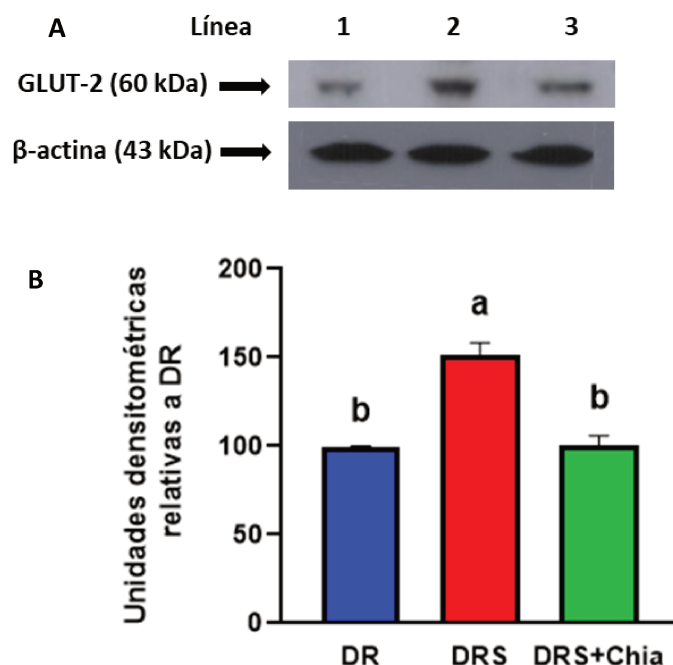


Figura 29: Niveles de masa proteica de GLUT-2 en tejido hepático. (A) *Panel superior:* inmunoblot representativo de GLUT-2 y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda. (B) *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de GLUT-2 en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.2 Actividad de enzimas involucradas en la fosforilación de la glucosa y neoglucogénesis

La **Figura 30 (A y B)** muestra las actividades de glucoquinasa (GK) y hexoquinasa (HK) (enzimas implicadas en la fosforilación de la glucosa), así como las actividades de Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), Fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa) y Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) (enzimas claves en la vía neoglucogénica) (**Figuras C, D, E**). Las ratas alimentadas con DRS mostraron una disminución significativa ($p<0,05$) en la actividad de GK en comparación con las ratas alimentadas con DR. La administración de semilla de chia a las ratas alimentadas con DRS produjo un aumento significativo de la actividad de GK, aunque no retornó a niveles de referencia.

No se observaron diferencias en la actividad de HK entre los tres grupos experimentales. Además, las **Figuras C, D y E** muestran un incremento ($p<0,05$) en la actividad de tres enzimas implicadas en la vía gluconeogénica (PEPCK, FBPasa y G6Pasa) en el grupo DRS. Los animales que consumieron semilla de chia, como reemplazo de la fuente grasa dietaria, mostraron una reducción en la actividad de las tres enzimas mencionadas, alcanzando valores similares al grupo DR en el caso de la FBPasa. Además, se observó un aumento significativo ($p<0,05$) en la relación G6Pasa/GK en las ratas alimentadas con DRS en comparación con el grupo DR. La incorporación de semilla de chia disminuyó significativamente la relación G6Pasa/GK (**Figura F**).

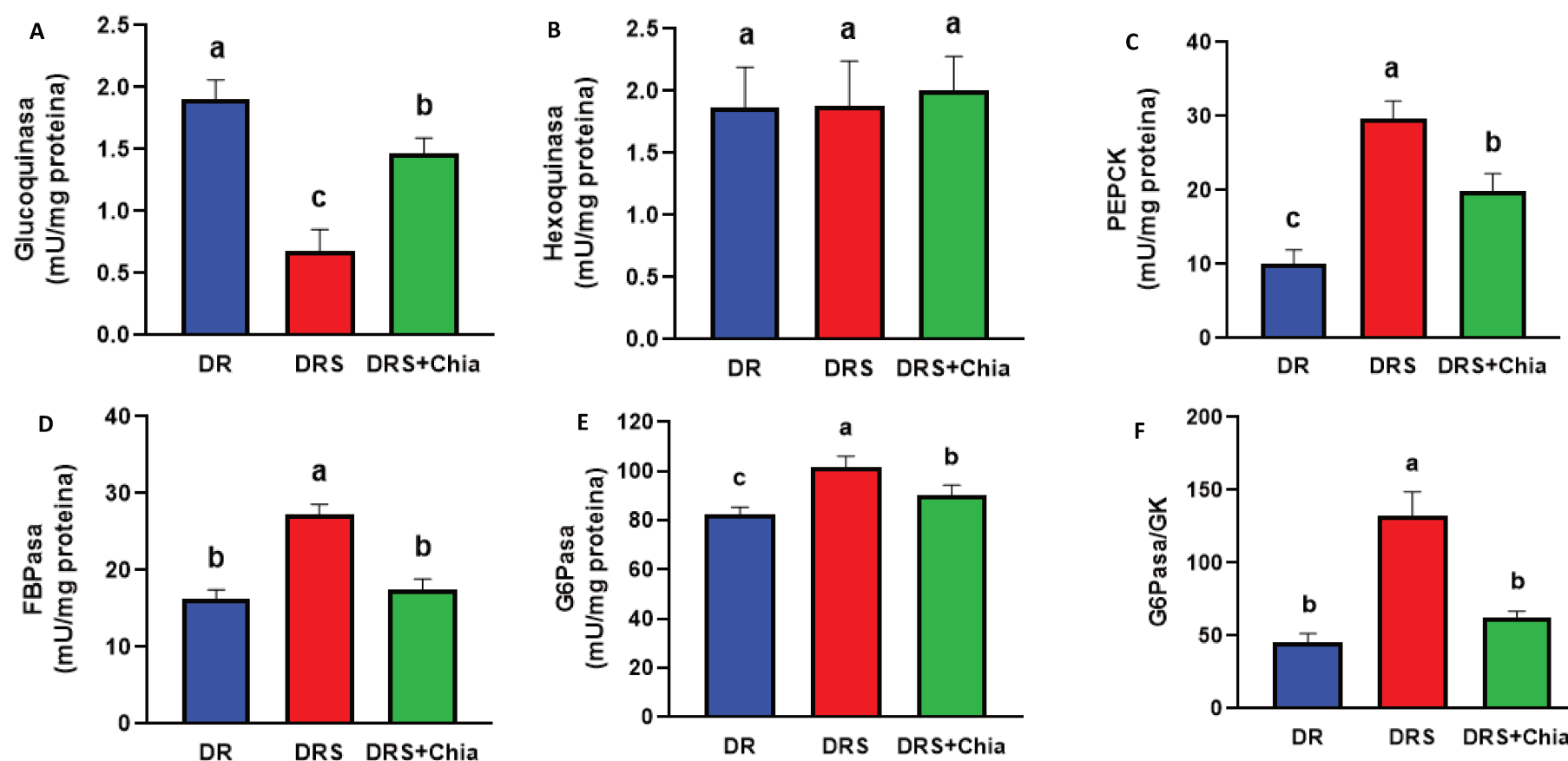


Figura 30: Actividad de enzimas involucradas en la fosforilación de la glucosa y neoglucogénesis (A) Glucoquinasa. (B) Hexoquinasa. (C) PEPCK. (D) FBPasa. (E) G6Pasa. (F) relación G6Pasa/GK en tejido hepático de ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.3 Expresión proteica de IRS-1

La **Figura 31** muestra microfotografías representativas (A) y análisis cuantitativos (B) de la expresión proteica del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) en tejido hepático. La expresión positiva de IRS-1 se localizó en el núcleo y en el citoplasma. Los niveles de expresión proteica fueron similares entre los tres grupos experimentales (DR, DRS y DRS+Chia).

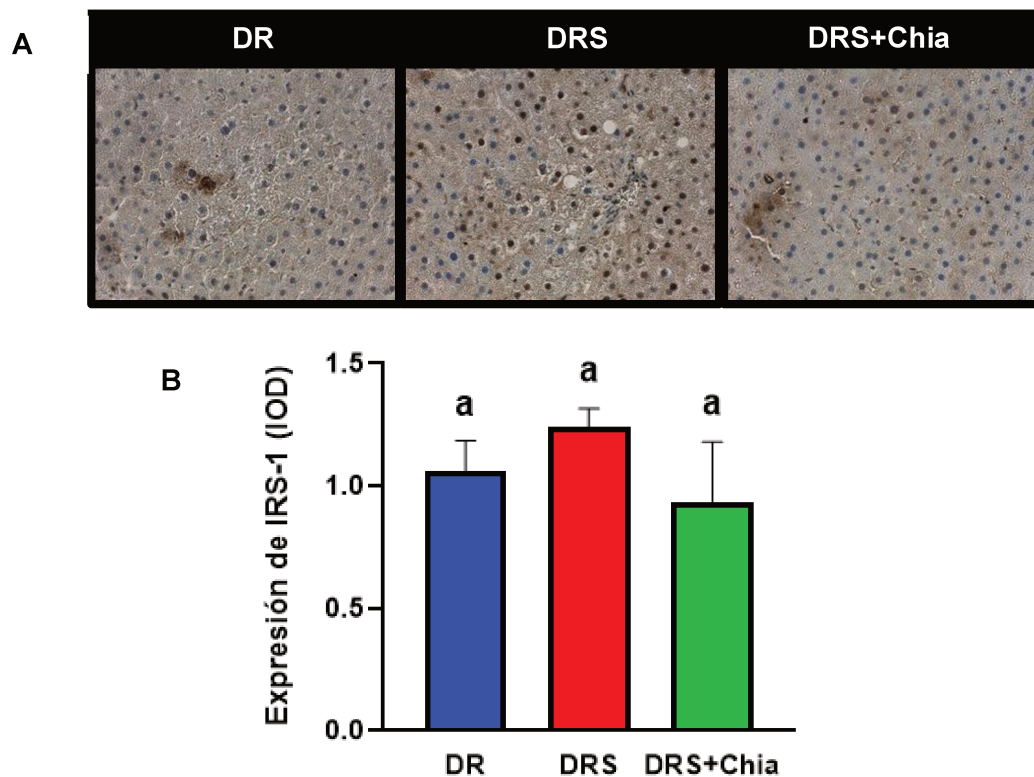


Figura 31: (A) Microfotografías representativas de cortes histológicos (x400) que muestran el patrón de expresión proteica de IRS-1 en secciones de tejido hepático. (B) Expresión proteica de IRS-1. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.4 Expresión relativa del ARNm de PI3K hepático

La **Figura 32** muestra la expresión del ARNm hepático de PI3K. Las ratas alimentadas con DRS presentaron una reducción ($p<0,05$) en la expresión de ARNm de PI3K en comparación con ratas alimentadas con DR. En cuanto al grupo DRS+Chia, se observó un incremento en la expresión de ARNm de PI3K alcanzando valores intermedios entre los grupos DRS y DR.

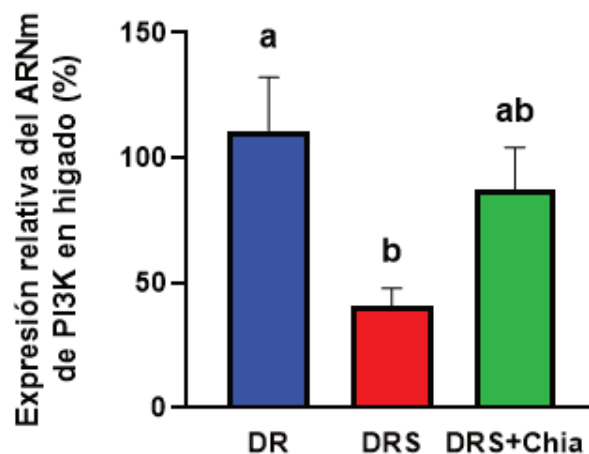


Figura 32: Expresión del ARNm de PI3K hepático en ratas alimentadas con la dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n = 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.5. Niveles de masa proteica de p-AKT (Ser473) hepática en condiciones no estimuladas y bajo estímulo con insulina.

La inmunotransferencia del tejido hepático reveló bandas de 60 kDa consistentes con p-AKT (**Figura 33**). No se observaron diferencias significativas en los niveles de masa proteica de p-AKT en condiciones basales (condiciones no estimuladas) en los diferentes grupos dietarios. Sin embargo, se evidenció una tendencia a valores mayores en el grupo DRS. Bajo estímulo de la insulina, los niveles de p-AKT fueron similares entre los tres grupos experimentales. Al comparar las condiciones estimuladas con la insulina de las no estimuladas, se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) en los grupos DRS+Chia (52%) y DR (35%). En contraste, el grupo DRS (11%) presentó respuesta menor comparado a los otros grupos mencionados.

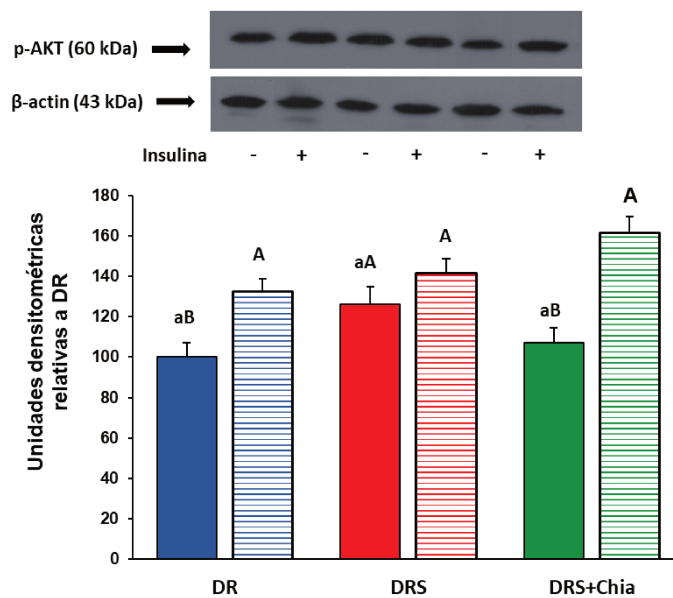


Figura 33: Niveles de masa proteica de p-AKT^{Ser473} en tejido hepático en condiciones no estimuladas y bajo estímulo con insulina en ratas alimentadas con una dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). *Panel superior:* inmunoblot representativo de p-AKT en el tejido hepático de ratas alimentadas con DR, DRS y DRS+Chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de p-AKT en el tejido hepático de ratas alimentadas con DR, DRS y DRS+Chia. Las comparaciones entre los grupos no estimulados se indican con letras minúsculas, y las comparaciones entre las condiciones no estimuladas y estimuladas con insulina se indican con letras mayúsculas. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n= 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.6 Niveles de masa proteica de AMPK y p-AMPK

La **Figura 34** muestra el análisis cualitativo y cuantitativo por Western blot de la AMPK y p-AMPK. El análisis demostró una reducción ($p<0,05$) en los niveles de masa proteica del sensor metabólico AMPK total y p-AMPK en los animales alimentados con DRS en comparación con el grupo DR. En el grupo DRS+Chia se observó un incremento significativo ($p<0,05$) en los niveles de estas proteínas, alcanzando valores similares al grupo DR.

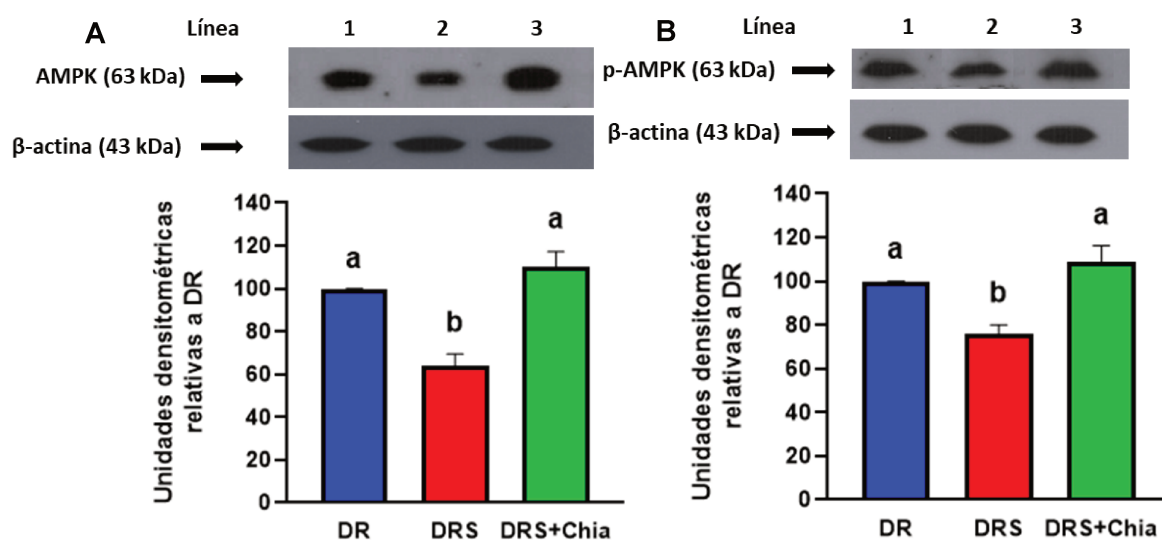


Figura 34: (A) Niveles de masa proteica de AMPK en tejido hepático. *Panel superior:* inmunoblot representativo de AMPK y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda; *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de AMPK. (B) Niveles de masa proteica de p-AMPK en tejido hepático. *Panel superior:* inmunoblot representativo de p-AMPK y β -actina. El peso molecular se muestra a la izquierda. *Panel inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de p-AMPK en tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p<0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.7 Expresión relativa del ARNm de FoxO1 hepático

La **Figura 35** muestra la expresión del ARNm hepático de FoxO1. Las ratas alimentadas con DRS presentaron un incremento ($p<0,05$) en la expresión de ARNm de FoxO1 en comparación con ratas alimentadas con DR. En cuanto al grupo DRS+Chia, se observó una reducción ($p<0,05$), en la expresión de ARNm de FoxO1 alcanzando valores similares a los observados en el grupo DR.

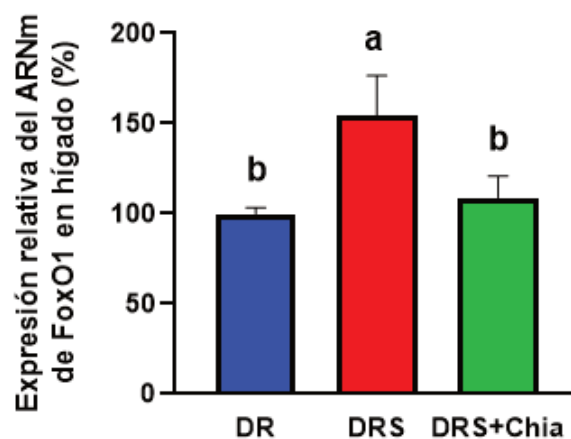


Figura 35: Expresión del ARNm de FoxO1 hepático en ratas alimentadas con la dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM ($n = 6$). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

9.8. Expresión proteica de PGC-1 α hepático

Las **Figuras 36 (A y B)** muestran microfotografías representativas y análisis cuantitativos de la expresión de la proteína PGC-1 α en el hígado. La expresión positiva de PGC-1 α se localizó en el núcleo y el citoplasma, y los niveles de expresión fueron similares entre los tres grupos experimentales (DR, DRS y DRS+Chia).

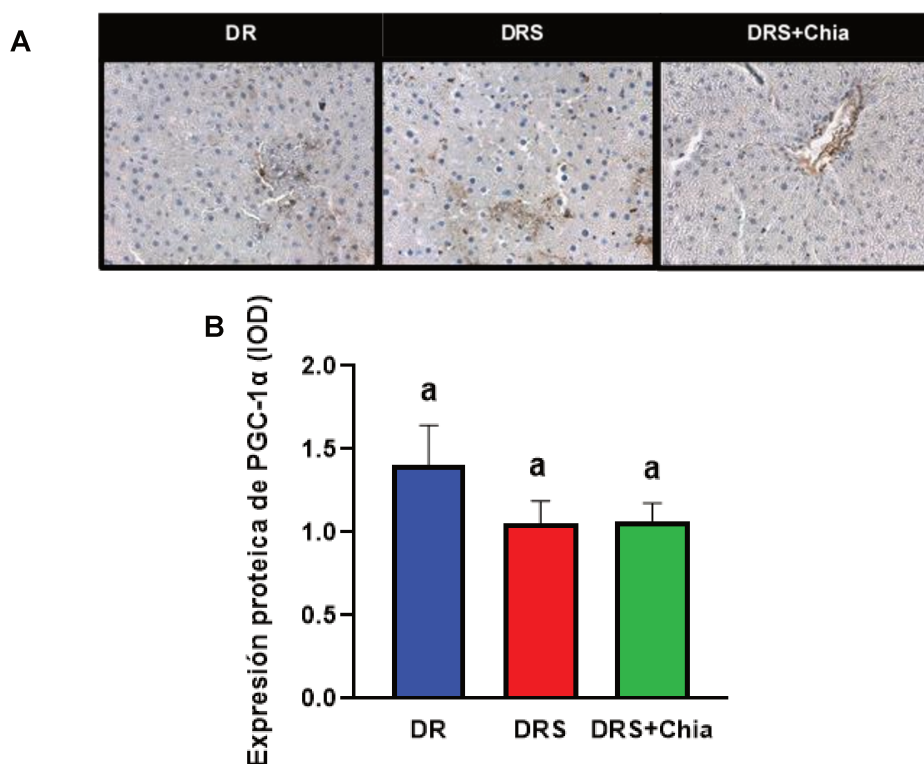


Figura 36: Expresión proteica PGC-1 α en tejido hepático en ratas alimentadas con la dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+Chia). **(A)** Microfotografías representativas de la expresión de PGC-1 α en secciones de hígado de ratas. Aumento 400X. **(B)** Análisis inmunohistoquímico cuantitativo de la expresión de PGC-1 α en el hígado. Los resultados se expresan como densidad óptica integrada (IOD). Los valores se expresan como media $\pm$ SEM (n = 6). Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es analizada por one-way ANOVA; post test Newman-Keuls.

10. Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana del tejido hepático

La **Tabla 11** muestra la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana en el tejido hepático de los diferentes grupos experimentales (DR, DRS y DRS+Chia). No se observaron diferencias significativas en el contenido total de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en los fosfolípidos de membrana de tejido hepático de los tres lotes experimentales. La incorporación de semilla de chia como reemplazo de la fuente grasa dietaria produjo cambios notables en la composición de PUFA n-3 y n-6 de los fosfolípidos hepáticos. La semilla de chia incrementó la proporción de los PUFA-n-3 (ALA, EPA, DPA y DHA). El ácido araquidónico (20:4 n-6), principal AG n-6 constituyente de los lípidos hepáticos, disminuyó en las ratas alimentadas con DRS+Chia. Por lo tanto, la incorporación de semilla de chia logró incrementar la relación n-3/n-6 presente en los fosfolípidos hepáticos de membrana.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana del tejido hepático en ratas alimentadas con dieta de referencia (DR), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con semilla de chia (DRS+chia).

	DR	DRS	DRS+CHIA
Ac. Mirístico (C14:0)	0,09 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,01 ^b
Ac. Palmítico (C16:0)	14,29 ± 0,75 ^a	12,35 ± 0,73 ^{ab}	11,42 ± 0,38 ^b
Ac. Esteárico (18:0)	21,22 ± 0,72 ^b	22,59 ± 0,09 ^b	23,77 ± 0,50 ^a
Ac. Nonadecanoico (19:0)	0,31 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,01 ^b
TOTAL AGS	35,91 ± 0,29^a	35,38 ± 0,76^a	35,46 ± 0,79^a
Ac. Hexadecanoico (7-C16:1)	0,09 ± 0,00 ^{ab}	0,1 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^b
Ac. Palmitoleico (9-C16:1)	0,77 ± 0,15 ^a	1,11 ± 0,19 ^a	0,79 ± 0,07 ^a
Ac. Oleico [9-C18:1 (n-9)]	4,17 ± 0,11 ^a	4,65 ± 0,30 ^a	3,81 ± 0,34 ^a
Ac. Vaccenico [11-C18:1 (n-7)]	4,24 ± 0,28 ^a	3,63 ± 0,13 ^a	2,78 ± 0,12 ^b
Ac. Octadecanoico [15-C18:1 (n-3)]	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,22 ± 0,04 ^a
TOTAL AGM	9,27 ± 0,32^a	9,49 ± 0,56^a	7,68 ± 0,46^a
9,15-octadecadienoico [9,15-C18:2 (n-3)]	0,01 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,00 ^b	0,32 ± 0,04^a
Ac. Linolénico (ALA) [9,12,15-C18:3 (n-3)]	0,14 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,00 ^b	1,92 ± 0,06^a
Ac. Eicosatrienoico [11,14,17-C20:3 (n-3)]	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,59 ± 0,03^a
Ac. Eicosatetraenoico [5,11,14,17-C20:4 (n-3)]	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,33 ± 0,02^a
Ac. Eicosapentaenoico (EPA) [5,8,11,14,17-C20:5 (n-3)]	0,39 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,03 ^b	7,83 ± 0,24^a
Ac. Docosapentaenoico (DPA) [7,10,13,16,19-C22:5 (n-3)]	1,53 ± 0,01 ^b	0,89 ± 0,14 ^b	4,68 ± 0,25^a
Ac. Docosahexaenoico (DHA) [4,7,10,13,16,19-C22:6 (n-3)]	10,33 ± 0,49 ^a	7,72 ± 0,55 ^b	9,40 ± 0,55 ^{ab}
TOTAL PUFA n-3	12,40 ± 0,45^b	8,80 ± 0,62^c	25,07 ± 0,95^a
Ac. Linoleico [9,12-C18:2 (n-6)]	11,99 ± 0,36 ^a	12,51 ± 0,49 ^a	11,7 ± 0,56 ^a
Ac. Eicosadienoico [11,14-C20:2 (n-6)]	0,60 ± 0,05 ^a	0,60 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,03^b
Ac. Eicosatrienoico [8,11,14-C20:3 (n-6)]	1,31 ± 0,09 ^b	1,01 ± 0,11 ^b	2,04 ± 0,11 ^a
Ac. Araquidónico [5,8,11,14-C20:4 (n-6)]	24,21 ± 0,07 ^a	24,56 ± 0,60 ^a	15,71 ± 0,37^b
Ac. Docosatetraenoico [7,10,13,16-C22:4 (n-6)]	0,35 ± 0,02 ^b	1,17 ± 0,14 ^a	0,14 ± 0,01^b
Ac. Docosapentaenoico [4,7,10,13,16-C22:5 (n-6)]	0,19 ± 0,02 ^b	3,83 ± 0,36 ^a	0,07 ± 0,01^b
TOTAL PUFA n-6	38,65 ± 0,33^b	43,68 ± 0,36^a	29,95 ± 0,55^c
TOTAL PUFA	51,05 ± 0,24^b	52,48 ± 0,44^b	55,02 ± 0,46^a
TOTAL n-3/n-6	0,32 ± 0,01^b	0,20 ± 0,01^a	0,84 ± 0,04^c

Los valores se expresan como g/ 100g de ácidos grasos totales, media ± SEM (n= 3-4). Los valores en una línea que no comparten la misma letra superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Se han excluido otros ácidos grasos minoritarios.

DISCUSIÓN

La enfermedad hepática esteatósica asociada al SM se ha convertido en la patología hepática más prevalente a nivel mundial, en estrecha relación con el incremento de los trastornos asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 (Chan et al., 2023; Targher et al., 2024). Si bien recientemente se han aprobado terapias farmacológicas dirigidas a la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica, en la actualidad no existen fármacos clínicamente aprobados para el tratamiento de la enfermedad hepática esteatósica en su conjunto, por lo que las estrategias terapéuticas se basan principalmente en modificaciones del estilo de vida, incluyendo cambios dietarios y ejercicio físico (Guo et al., 2022). En este sentido, un reciente consenso internacional de expertos multidisciplinarios destacó el papel central de las intervenciones dietéticas tanto en la prevención como en el tratamiento de la disfunción hepática asociada al SM (Zeng et al., 2024). El consenso recomienda estrategias nutricionales personalizadas, incluyendo una dieta equilibrada con un aporte energético controlado, dietas altas en proteínas o bajas en carbohidratos, y hace hincapié en la adherencia a patrones alimentarios como la dieta mediterránea o la DASH (Enfoques Dietéticos para Detener la Hipertensión), junto con una reducción del consumo de carnes rojas y procesadas, grasas saturadas y trans, azúcares añadidos, alimentos ultraprocesados y alcohol. En este contexto, los alimentos funcionales han atraído una atención creciente en los últimos años debido a su potencial para favorecer la salud hepática (Nemer et al., 2024; Yuan et al., 2024). Las semillas de chia se distinguen por su excepcional perfil nutricional y sus importantes beneficios para la salud, incluida su posible función en la modulación de los trastornos metabólicos (Medina-Urrutia et al., 2020; Motyka et al., 2023).

En el presente trabajo observamos que el reemplazo de la fuente grasa, aceite de maíz por semilla de chia durante los últimos 3 meses de la administración de DRS no modificó el peso corporal ni la ingesta energética de los animales. En cuanto a la bioquímica del suero, esta incorporación normalizó la moderada hiperglucemia, hipertriacilgliceridemia, hipercolesterolemia e hiperuricemia inducidas por la DRS. Además, revirtió de manera significativa el aumento de las enzimas indicadoras de daño hepático GPT, GOT y FA. En línea con estos hallazgos, Poudyal et al. (2012a) observaron una reducción de la enzima hepática GOT sin cambios en el peso corporal final en ratas macho Wistar que recibieron una suplementación con semilla de chia al 5% (p/p), administrando la misma a partir de la semana 8, durante 24 semanas a una dieta alta en carbohidratos (52% p/p) y grasas (24% p/p) con un 25 % (p/v) de fructosa en el agua de bebida. De manera similar, da Silva Marineli et al. (2015b) mostraron menores niveles de los marcadores de daño hepático (GOT y GPT), sin modificaciones en la ganancia de peso y la ingesta energética, tras una sustitución parcial de la grasa dietaria por semilla de chia (13,3 % p/p) o aceite de chia (4% p/p) administradas durante 12 semanas en ratas macho Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa. Más aún, Fonte-Faria et al. (2019) demostraron una disminución de la masa grasa y un incremento de la masa magra sin cambios en la masa corporal total luego de la

suplementación con aceite de chia a partir del día 90 hasta el final del periodo experimental (135 días) en ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasa. Haque et al. (2024) evidenciaron una reducción en los lípidos plasmáticos (TG, colesterol y LDL-c) y un incremento en los niveles de HDL-c tras la suplementación con semilla de chia (1% y 2% p/p) durante 4 semanas en ratones albinos suizos alimentados con una dieta alta en grasa. En concordancia con el patrón observado en modelos animales, Nieman et al. (2009) no registraron modificaciones en el peso corporal en adultos con sobrepeso u obesidad que recibieron una suplementación con 50 g/día de semillas de chia durante 12 semanas. A su vez, una revisión sistemática y meta-análisis reciente mostró una reducción de la presión arterial, el colesterol total, el LDL-c y los TG plasmáticos en diferentes grupos de pacientes (obesos, diabéticos tipo 2, hipertensos o con SM), cuando recibieron productos de chia (harina, semilla o aceite) a diferentes dosis (4 g a 60 g) y en distintos tiempos de administración (8 a 24 semanas) (Nikpayam et al., 2023).

Es bien sabido que la enfermedad hepática asociada al SM se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado, que puede progresar desde una simple esteatosis hasta una esteatohepatitis, caracterizada por una lesión hepatocelular y diversos grados de fibrosis (Parola & Pinzani, 2019; Rossi et al., 2013). En estudios previos de nuestro grupo (Oliva et al., 2015; Rossi et al., 2013) hemos demostrado la presencia de esteatosis hepática en ratas alimentadas con una DRS, debido principalmente a un cambio en el destino metabólico de los lípidos (síntesis vs. oxidación), con un aumento de las actividades de las enzimas lipogénicas y los niveles de masa proteica de SREBP-1, y una disminución de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y los niveles de masa proteica de PPAR α . En el presente estudio hemos investigado la progresión de la esteatosis hepática a fibrosis en nuestro modelo experimental de SM, demostrando que el aumento significativo del contenido de triacilglicéridos en el hígado de ratas alimentadas con DRS se acompaña de un incremento en el depósito de gotas lipídicas, puntaje NAS, depósito de colágeno intersticial y contenido de hidroxiprolina.

Los PUFA n-3 han suscitado un mayor interés en los últimos años debido a su capacidad para reducir la esteatosis hepática y retrasar la progresión del daño hepático (Delarue & Lalles, 2016). Las semillas de chia son la fuente vegetal más rica en 18:3 n-3 y podrían utilizarse como alternativa para reducir el contenido de grasa intrahepática (Silva Figueiredo et al., 2018). Anteriormente demostramos una reducción de los niveles de proteína SREBP-1 madura y de las actividades de las enzimas lipogénicas (ACC, FAS y G6PDH) cuando se administró semilla de chia como fuente de grasa en la DRS. Esto se acompañó de una regulación al alza tanto de los niveles de proteína PPAR α como de las actividades de las enzimas oxidativas (CPT-1 y FAO) (Rossi et al., 2013). En el presente trabajo, la administración de semilla de chia disminuyó la esteatosis hepática, el puntaje NAS, el depósito de colágeno intersticial y el contenido de hidroxiprolina en ratas alimentadas con DRS. En esta línea, Dias Moreira et al. (2022) informaron

una mejora de la esteatosis hepática y puntaje NAS al sustituir la fuente grasa dietaria por harina de chia (14,2% p/p) o aceite de chia (4% p/p) durante 10 semanas, en ratas macho Wistar alimentadas previamente con una dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas. Poudyal et al. (2012b) demostraron una normalización de la esteatosis macrovesicular, la inflamación portal y la fibrosis hepática en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en carbohidratos y grasas durante 8 semanas, y posteriormente suplementada con semilla de chia (5 % p/p) durante 24 semanas. Por otro lado, Jeyapal et al. (2018) demostraron que la sustitución parcial del ácido linoleico por ALA protege frente al desarrollo de MASH. Esta intervención mejoró la histología hepática en ratas Sprague–Dawley macho alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa durante 24 semanas. El efecto beneficioso se observó cuando se ajustó la proporción de PUFA n-6/n-3 a 2 mediante la combinación de aceite de maní, palmoleína y aceite de linaza como fuente de ALA. Además, Medina-Urrutia et al. (2020) mostraron el efecto de la administración de 25 g/día de semilla de chia en 25 pacientes con MASLD y observaron que el 52 % de los pacientes mostraban regresión del mismo.

El TGF- β 1 desempeña un papel fundamental en la red de citoquinas implicadas en la fibrogénesis. Su unión a receptores específicos en la superficie de los hepatocitos incrementa la expresión del gen del colágeno y favorece su depósito en el tejido hepático. En pacientes con fibrosis hepática suelen observarse concentraciones elevadas de TGF- β 1, lo que respalda su papel como mediador clave del proceso fibrótico en diversas enfermedades hepáticas (Aihara et al., 2011; Heydarpour et al., 2020). A nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan evaluado el efecto de la semilla de chia sobre el TGF- β 1 en tejido hepático. En este contexto, este trabajo constituye el primer análisis que demuestra que la semilla de chia inhibió el aumento de TGF- β 1 inducido por la DRS, reduciendo su concentración hepática, y posiblemente contribuyendo a la atenuación de la fibrosis. En relación con otras fuentes de ácidos grasos n-3, Lytle et al. (2015) observaron una atenuación en la expresión de todos los subtipos de TGF- β tras la suplementación con DHA durante 16 semanas en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol. En cambio, no se detectaron modificaciones cuando los animales recibieron la dieta alta en grasa suplementada con EPA. De manera similar, Suzuki-Kemuriyama et al. (2016) mostraron una disminución significativa en la expresión hepática de TGF- β 1 en ratones macho C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa suplementada con un 5 % de DHA durante 4 semanas.

El estrés oxidativo desempeña un papel crucial en la enfermedad hepática asociada al SM, actuando como mediador clave del daño celular (Li et al., 2024). Este daño oxidativo amplifica la cascada inflamatoria y favorece la transición de la esteatosis simple a patologías hepáticas más graves, como la fibrosis y la cirrosis (Clare et al., 2022). Además, el estrés oxidativo está estrechamente relacionado con otras características del SM, lo que lo convierte en un factor fundamental en la aparición y progresión de MASLD. Por lo tanto, resulta relevante avanzar en

el estudio de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a su prevención/reversión. En este sentido, en el presente trabajo observamos que la administración de semilla de chia disminuyó los niveles hepáticos de TBARS, 4-HNE y ROS, reduciendo la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. Estos resultados fueron acompañados de un aumento en la capacidad antioxidante del suero y el hígado, el contenido de GSH y las actividades de SOD, CAT, GPx y GR. En línea con nuestros resultados, en el estudio de da Silva Marineli et al. (2015a) descripto anteriormente, se observó una capacidad antioxidante plasmática y hepática notablemente mayor en animales alimentados con semillas de chia o aceite de chia durante 12 semanas. Por su parte, Fernández-Martínez et al. (2019) demostraron una prevención parcial o total del estrés oxidativo luego de la ingesta dietética de chia (15 % de chia molida) durante 4 semanas en ratas macho Wistar dislipidémicas y con NASH. Además, Haque et al. (2024) observaron una disminución de los niveles de MDA en plasma y tejido hepático, junto con un incremento en los niveles plasmáticos y hepáticos de CAT y SOD, tras la suplementación con semilla de chia durante 4 semanas en ratones albinos suizos alimentados con una dieta alta en grasa. Similarmente, Han et al. (2020) evidenciaron una reducción de los niveles de MDA en suero e hígado, junto con un incremento de la actividad de GPx, tras la administración de aceite de chia (3,8 g/kg de peso corporal) durante las últimas 5 semanas de un protocolo experimental de 13 semanas, en ratones con hiperlipidemia inducida por una dieta alta en grasa. Además, se observó un aumento de la actividad sérica de SOD cuando el aceite de chia se administró a una dosis de 1,9 g/kg de peso corporal.

La inflamación es un factor clave en la enfermedad hepática asociada al SM, orquestada principalmente por el sistema inmunitario innato. Las células inmunitarias contribuyen de manera significativa a la patogénesis de la enfermedad hepática esteatósica al mediar la lesión hepatocelular, la inflamación y la fibrosis. La acumulación de lípidos en los hepatocitos induce estrés metabólico, lo que desencadena la activación de las células inmunitarias residentes, que posteriormente liberan citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Estos mediadores facilitan el reclutamiento de células inmunitarias circulantes, incluidos los macrófagos derivados de monocitos, los neutrófilos y los linfocitos, lo que amplifica la cascada inflamatoria. Por lo tanto, comprender los procesos inflamatorios implicados en la progresión del daño hepático es fundamental para identificar un objetivo terapéutico susceptible de intervención (Kim et al., 2025). En nuestro estudio observamos que la semilla de chia disminuyó la expresión de IL-1 β , PAI-1 y F4/80 en el hígado, junto con una reducción en la actividad de la MPO, mientras que incrementó la expresión de IL-10. A nivel sistémico, la administración de semilla de chia redujo los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF- α , lo que refleja una mejora del estado inflamatorio inducido por la DRS. En la actualidad son escasos los estudios que evalúan los efectos de la semilla de chia sobre marcadores inflamatorios hepáticos en modelos de alteraciones metabólicas inducidas por dieta. En este sentido un estudio de Pereira da Silva et al. (2019) demostró una

reducción en los niveles del ARNm de TNF- α hepático de ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa más harina de chia durante 35 días. Estudios con otras fuentes de ácidos grasos n-3 muestran que la sustitución de PUFA n-6 (18:2 n-6) por PUFA n-3 (18:3, n-3) normalizó los niveles de expresión hepática de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) en ratas Sprague-Dawley macho alimentadas con una dieta rica en grasa y fructosa durante 24 semanas (Jeyapal et al., 2018). Similarmente, Depner et al. (2013) demostraron una atenuación en la expresión hepática de F4/80, IL-1 β , TNF- α y PAI-1 tras la suplementación con ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) durante 16 semanas en un modelo experimental de MASH inducido por una dieta alta en grasa.

En el contexto del SM, los factores de transcripción Nrf2 y NF- κ B desempeñan un papel relevante a nivel hepático. Existen evidencias que señalan alteraciones relevantes en el estado funcional de Nrf2 y NF- κ B, dos factores de transcripción considerados elementos centrales en la patogénesis de dicha enfermedad (Liu et al., 2016). Se reconoce que las vías de señalización Nrf2 y NF- κ B cooperan en el mantenimiento de la homeostasis redox y en la regulación de la respuesta celular frente al estrés y la inflamación. A su vez, Nrf2 controla negativamente la vía de señalización NF- κ B mediante distintos mecanismos. NF- κ B, por su parte, induce la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias. Varios productos naturales activan la señalización Nrf2 con la represión concomitante de NF- κ B y sus genes dianas (Matzinger et al., 2018). En esta línea, observamos que la administración de semilla de chia (últimos 3 meses del protocolo experimental) indujo la expresión y los niveles de masa proteica de Nrf2, mientras que disminuyó los de NF- κ B p65 en el hígado de los animales alimentados crónicamente con DRS. En este sentido, Santos-López et al. (2018) demostraron que el aceite de chia (15,2% p/p) favorece la activación de Nrf2 y limita la respuesta prooxidativa en ratas Wistar macho alimentadas con una dieta rica en colesterol y grasas saturadas durante 8 semanas. El efecto de la semilla de chia sobre el factor de transcripción NF- κ B p65 hepático en modelos con alteración metabólica inducida por dieta ha sido poco investigado. Un estudio reportó una disminución en los niveles de ARNm de NF- κ B hepático cuando se administró semilla de chia (4% o 20%) en la dieta durante 21 días en ratones macho albinos con injuria hepática (inducida por una inyección de paracetamol) (Ahmed & Masoud, 2024). Algunos autores han estudiado los efectos de los n-3 PUFA (DHA y EPA), en esta línea. Hernández-Rodas et al. (2017) reportaron una normalización de las expresiones hepáticas de Nrf2 y NF- κ B en ratones C57BL/6J macho alimentados durante 12 semanas con una dieta rica en grasa suplementada con DHA y aceite de oliva extra virgen. Se ha demostrado que varios PUFA n-3 (ALA, EPA y DHA) son ligandos naturales de estos factores de transcripción. Los PUFA n-3 han sido implicados en la regulación negativa de la señalización NF- κ B. Esta vía de señalización es sensible al estrés redox, y una mayor expresión de los genes antioxidantes dependientes de Nrf2 que restauran el equilibrio redox celular, puede disminuir la señalización

NF- κ B. La asociación de la reducción del estrés oxidativo mediada por Nrf2 con la disminución de la señalización NF- κ B puede, por lo tanto, justificar las propiedades de los PUFA n-3 y ser uno de los mecanismos responsables de los resultados obtenidos en el presente trabajo (Abrescia et al., 2020; Hogenkamp et al., 2020).

Por otra parte, en trabajos previos del grupo la administración crónica de DRS induce intolerancia a la glucosa, IR (evaluada mediante la prueba de clamp euglucémico-hiperinsulinémico) e hiperglucemia moderada, lo que puede afectar la captación celular de glucosa (Aiassa et al., 2022; Chicco et al., 2003; Creus et al., 2017; D'Alessandro et al., 2006; Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Ferreira et al., 2020; Hein et al., 2010). Extendiendo los resultados obtenidos, en el presente estudio, la administración de semillas de chia durante 3 meses a ratas alimentadas crónicamente con DRS mejoró la tolerancia a la glucosa. En este sentido, Enes et al. (2020) demostraron que el aceite de chia restauraba la tolerancia a la glucosa en ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa durante 10 semanas. De manera similar, da Silva Marineli et al. (2015b) observaron que el consumo de semillas de chia en tratamientos a corto (6 semanas) y largo plazo (12 semanas) mejoró la tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa.

Los miembros de la familia de transportadores de glucosa desempeñan un papel crucial en las etapas iniciales del metabolismo de la glucosa. GLUT-2 es el principal transportador de glucosa en los hepatocitos. En condiciones fisiológicas, GLUT-2 facilita el transporte de glucosa al interior de las células, lo que permite equilibrar las concentraciones de glucosa a través de la membrana celular. El GLUT-2 se ve alterado en diversos trastornos endócrinos y metabólicos (Shen et al., 2024; Sun et al., 2023). En el presente estudio, la suplementación con semillas de chia atenuó el aumento inducido por la DRS en los niveles de proteína GLUT-2. Este mecanismo podría ser un factor clave que contribuye a los efectos beneficiosos de la semilla de chia sobre la homeostasis de la glucosa y la IR en el modelo experimental de SM inducido por la administración de DRS. Hasta el momento, no se han reportado estudios que evalúen específicamente el efecto de la semilla de chia en modelos experimentales de alteraciones hepáticas asociadas al SM, tales como esteatosis y fibrosis. Sin embargo, Tung et al. (2023) observaron una reducción en la expresión hepática del ARNm de GLUT-2 cuando se administró aceite de pescado (relación n-3/n-6 de 1:2 en la dieta) en ratones hembra C57BL/6J ovariectomizados con obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Se necesitan más investigaciones para dilucidar el impacto de los ácidos grasos n-3, en particular el ALA, sobre el transportador GLUT-2 en el tejido hepático, con el fin de comprender mejor sus posibles implicancias terapéuticas en el contexto del SM.

Las enzimas G6Pasa y GK actúan de forma opuesta para regular los niveles intracelulares de glucosa libre, por lo tanto, la regulación coordinada de estas dos enzimas determina, en última

instancia, el gradiente y el flujo de glucosa hacia dentro o fuera del hepatocito. En el presente trabajo los animales alimentados durante 6 meses con DRS presentan una disminución en la actividad de GK y un aumento de la actividad G6Pasa, lo que conduce a un incremento en la relación G6Pasa/GK. La administración de semilla de chia mejoró la capacidad de fosforilación de la glucosa, reflejada en el aumento de la actividad de la GK, y una reducción de las enzimas neoglucogénicas (PEPCK, FBPasa y G6Pasa) en tejido hepático de ratas alimentadas con DRS. Las semillas de chia redujeron significativamente la relación G6Pasa/GK. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que evalúa los efectos de la administración de semilla de chia entera sobre las actividades de las enzimas implicadas en la vía neoglucogénica en un modelo experimental con alteración hepática inducida por DRS. Enes et al. (2020) demostraron un incremento en el ARNm de GK hepática en ratas Wistar macho alimentadas con una dieta suplementada con aceite de chia durante 10 semanas. Además, resultados in vitro en células HepG2, evidenciaron una reducción del ARNm de enzimas neoglucogénicas (PEPCK y G6Pasa) expuestas a compuestos fenólicos hidrolizados obtenidos de harina de chia.

El IRS-1 desempeña un papel fundamental en la señalización de la insulina (Gual et al., 2005). En el presente estudio, se observaron niveles similares de expresión de la proteína IRS-1 entre los tres grupos experimentales. En consonancia con el presente estudio, Bezerra et al. (2000) no observaron diferencias en los niveles de proteína IRS-1 en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa durante un periodo breve (4 semanas) y alimentadas con una dieta control. Tung et al. (2023) encontraron niveles similares de ARNm de IRS-1 hepático en ratones hembra C57BL/6J ovariectomizadas alimentadas con una dieta alta en grasa suplementada con aceite de manteca, aceite de pescado o aceite de perilla.

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) ha recibido una atención considerable como posible diana para el tratamiento de enfermedades asociadas a trastornos metabólicos. Entre ellas se incluyen la diabetes, obesidad, enfermedades del hígado graso y cáncer, que a menudo se asocian a cambios en el metabolismo (Carling, 2017; Herzig & Shaw, 2018). En el presente estudio, la administración de semillas de chia entera durante los últimos 3 meses de un periodo de 6 meses aumentó los niveles de proteína tAMPK y p-AMPK en ratas alimentadas con DRS. En esta línea, Omran et al. (2023) demostraron un aumento de la expresión hepática de AMPK cuando se administró oralmente extracto de semillas de chia a la dieta (200 mg/kg de peso corporal/día) durante 6 semanas en ratas Wistar macho alimentadas con una dieta rica en grasa. Enes et al. (2020) observaron un aumento del ARNm de AMPK cuando se incorporó harina de chia (14,7 %) o aceite de chia (4 %) a una dieta alta en grasa y alta en calorías durante 10 semanas a ratas macho Wistar.

Una de las principales funciones fisiológicas de la insulina en el hígado es suprimir la gluconeogénesis. La activación de AKT inducida por la insulina puede modular el metabolismo de la glucosa a través de múltiples vías descendentes (Bo et al., 2024; Li et al., 2019). En el presente estudio, se observaron niveles comparables de proteína p-AKT en el hígado en condiciones basales (sin estimulación de insulina) en los diferentes grupos dietéticos. En condiciones estimuladas por insulina, no se observó aumento de p-AKT en el grupo DRS, lo que indica un defecto en la capacidad de la insulina para inducir la fosforilación de AKT en el hígado de estos animales. La semilla de chia restauró el patrón de expresión alterado de esta enzima clave en la vía de señalización de la insulina. En este sentido, Enes et al. (2020) informaron de un aumento tanto en los niveles de ARNm de AKT como de proteína p-AKT en el hígado cuando se administró aceite de chia ó harina de chia a ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa durante 10 semanas. Yu et al. (2018) observaron una mejora en la fosforilación hepática de AKT en condiciones estimuladas por insulina cuando ratones C57BL/6 macho fueron alimentados durante 16 semanas con una dieta alta en grasa suplementada con aceite de linaza rico en ALA (10, 20 y 30 % p/p).

Por otra parte, la IR promueve la activación de la vía FoxO1, lo que mejora la neoglucogénesis (Palihaderu et al., 2022). En el presente estudio, la incorporación de semillas de chia condujo a una reducción de los niveles elevados de ARNm de FoxO1 hepático observados en el grupo DRS. En consonancia con estos resultados, Yang et al. (2024) observaron que la expresión del ARNm del FoxO1 en hígado se regulaba al alza con una dieta rica en grasa, mientras que la ingesta crónica de una dieta enriquecida con DHA atenuaba este aumento en ratones hembra C57BL/6 J obesas.

La familia de coactivadores PGC-1 ha cobrado especial relevancia debido a su participación en la regulación del metabolismo energético, la biogénesis mitocondrial y la sensibilidad a la insulina (Qian et al., 2024). En el presente estudio, se observaron niveles similares de expresión de PGC-1 α hepático en los tres grupos experimentales. Al presente, no hay estudios que hayan evaluado el efecto de la semilla de chia sobre el PGC-1 α en el tejido hepático en un modelo de SM con alteración hepática asociada. Otros estudios han evaluado la expresión del mismo tras el tratamiento con semilla de chia, aceite de chia u otras fuentes de ácidos grasos n-3 (EPA y DHA) en otros tejidos como riñón y músculo esquelético, en modelos de lesión renal o animales alimentados con dieta alta en grasa. En este sentido, da Silva Marineli et al., (2015b) observaron un incremento en la expresión proteica de PGC-1 α en músculo esquelético cuando se administró semilla de chia (13,3% p/p) durante las últimas 12 semanas a ratas macho Wistar previamente alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa durante 4 semanas, ó cuando se suministró aceite de chia (4% p/p) durante las últimas 6 semanas en animales alimentados con la misma dieta durante las primeras 10 semanas del protocolo experimental (en ambos casos, la duración total

del estudio fue de 16 semanas). Similarmente, Liu et al., (2019) reportaron una mayor expresión proteica de PGC-1 α en el músculo esquelético de ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa y suplementada con aceite de pescado rico en EPA y DHA (5% p/p) durante 8 semanas. Por otra parte, Son et al. (2021) mostraron un aumento significativo de la expresión proteica de PGC-1 α en un modelo experimental de lesión renal tratados con PUFA n-3 (EPA y DHA) durante 15 semanas.

El tipo y la cantidad de ácidos grasos en la dieta influyen en la composición lipídica de las membranas celulares, alterando así su estructura y fluidez. En el presente estudio, cuando se administró semilla de chia como fuente de grasa en la DRS, el ALA (C18:3 n-3), el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA), el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3, DPA) y el ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA) aumentaron significativamente en los fosfolípidos de la membrana hepática. Además, este enriquecimiento de PUFA n-3 se acompañó de una reducción del ácido araquidónico (20:4 n-6, AA), lo que dio lugar a un aumento de la proporción n-3/n-6. De manera similar, Popović et al. (2024) informaron de una reducción en la proporción n-6/n-3 cuando se administró aceite de linaza, principal fuente de ALA, a ratones hembra alimentadas con una dieta alta en grasa durante 100 días. Rincón-Cervera et al. (2016) informaron de un aumento de los niveles de ALA, EPA y DHA, junto con una reducción de los niveles de ácido linoleico (C18:2 n-6, LA) y AA, en el hígado de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control que contenía un 10 % de aceite de chia (63% ALA) durante 3 semanas. Estos cambios pueden modular las interacciones con proteínas clave implicadas en la regulación de la sensibilidad a la insulina (Perona, 2017). En este sentido, Yu et al. (2018) informaron que la administración de aceite de linaza, rico en ácido α -linolénico, mejoraba la señalización hepática de la insulina (IRS-1 y p-AKT), al tiempo que remodelaba la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática en ratones alimentados con una dieta rica en grasa. En su estudio, observaron que la estimulación aguda con insulina no mostró un efecto significativo de los niveles de p-AKT en ratones macho C57BL/6 alimentados con una dieta rica en grasa, sugiriendo una alteración en la señalización de la insulina en el hígado de esos animales. El aceite de linaza indujo la fosforilación de AKT en el hígado de los ratones después de la estimulación con insulina. Este efecto se acompañó de una acumulación de ALA y sus derivados n-3 de cadena larga, EPA y DPA, en los fosfolípidos de la membrana hepática. Por el contrario, el aceite de linaza redujo la incorporación en la membrana hepática de AA, ácido docosatrienoico (C22:3 n-6) y ácido docosatetraenoico (C22:4 n-6) en comparación con los ratones alimentados con una dieta alta en grasa. En esta línea, estudios previos de nuestro grupo (Aiassa et al., 2022, 2025) demostraron que la ingesta de semillas de *Salvia hispanica* L. (chia) en el tejido adiposo epididimal (TAE) restauraba el patrón de expresión alterado de p-AKT y aumentaba los niveles de GLUT-4 en ratas alimentadas con DRS. Estos cambios se acompañaron de un aumento de la proporción de ácidos

grasos poliinsaturados n-3/n-6 en el TAE y retroperitoneal. Además, Guelzim et al. (2014) informaron de valores más bajos de HOMA-IR y una mayor activación de las primeras etapas de la señalización de la insulina (receptor de insulina y p-IRS-1) en el hígado de ratas Wistar macho que fueron alimentadas con una dieta alta en grasa y sacarosa durante 10 semanas, seguida de un periodo de 4 semanas de restricción energética con una dieta rica en PUFA n-3 de cadena larga (EPA y DHA). Esta mejora en la sensibilidad a la insulina se asoció con el enriquecimiento de las membranas celulares del hígado, músculo gastrocnemio y glóbulos rojos con PUFA n-3.

En el presente trabajo, el aumento de los PUFA n-3 hepáticos observado en el grupo DRS+Chia reflejó una mayor conversión de ALA en EPA y DHA. Estos cambios pueden representar un posible mecanismo de la mejora de la tolerancia a la glucosa, enzimas gluconeogénicas y factores de transcripción, y señalización de la insulina en ratas alimentadas con una DRS. Teniendo en cuenta que las semillas de chia contienen diversos compuestos bioactivos además del ALA, no se puede descartar que estos también contribuyan a los efectos beneficiosos observados. Varios autores describieron que los compuestos presentes en las semillas de chia, como proteínas, fibra, minerales, compuestos fenólicos (ácido rosmarínico, ácido cafeico, danshensu, ácido clorogénico, quercetina, miricetina y kaempferol) y los compuestos lipofílicos (carotenoides, tocoferoles, fosfolípidos y ALA), están asociados con efectos hipolipemiantes, hipoglucemiantes, hipotensivos, antioxidantes, antiinflamatorios, entre otros (Egea & Fernandes, 2025; Marcinek & Krejpcio, 2017; Motyka et al., 2023; Oliveiras-Alves et al., 2017; Silva et al., 2021; Ullah et al., 2016).

En resumen, este estudio aporta nuevos conocimientos sobre los efectos beneficiosos de la semilla de chia dietaria sobre los mecanismos hepáticos claves implicados en la homeostasis de la glucosa, inflamación, fibrosis y estrés oxidativo en un modelo experimental de SM. Estos hallazgos respaldan su potencial relevancia clínica como intervención nutricional para el tratamiento de alteraciones hepáticas asociadas al SM. En este contexto, nuestros hallazgos adquieren relevancia traslacional y refuerzan/sustentan el uso de las semillas de chia como estrategia prometedora para el abordaje de las enfermedades hepáticas metabólicas.

CONCLUSIÓN

En las últimas décadas, cambios en los hábitos dietarios se han asociado con un incremento en las alteraciones metabólicas que caracterizan al SM, así como una mayor prevalencia de la disfunción hepática asociada. Frente a este escenario, el estudio de estrategias nutricionales orientadas a prevenir, atenuar o revertir estas alteraciones metabólicas resulta de particular interés. En este sentido, cobra relevancia la evaluación de abordajes dietarios capaces de modular los mecanismos fisiopatológicos involucrados. En este escenario, la semilla de *Salvia hispanica* L. (chia), rica en ácido α -linolénico y otros compuestos bioactivos, ha demostrado efectos beneficiosos sobre un amplio espectro de alteraciones metabólicas, lo que la posiciona como una intervención nutricional de interés en el abordaje de enfermedades metabólicas.

El presente estudio demostró que la administración de semilla de chia a ratas dislipidémicas resistentes a la insulina, alimentadas de forma crónica con una DRS, ejerce efectos beneficiosos sobre el tejido hepático, evidenciados por la reducción del daño hepático, del contenido de gotas lipídicas y del puntaje NAS. Estos efectos se asociaron con una mejora del estrés oxidativo y de la peroxidación lipídica, vinculada a la restauración del sistema de defensas antioxidantes y a la activación del factor de transcripción Nrf2, concomitantemente con la inactivación de NF- κ B. Este trabajo proporciona información novedosa sobre los efectos beneficiosos de la semilla de chia rica en ALA en algunos mecanismos implicados en la progresión de la esteatosis hepática a la fibrosis. Además, las semillas de chia muestran nuevos mecanismos de acción al mitigar la inflamación inducida por una DRS. El consumo de semilla de chia moduló la expresión de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Más aún, el presente trabajo destaca los efectos beneficiosos de la semilla de chia sobre la tolerancia a la glucosa, las actividades enzimáticas y los factores de transcripción implicados en la neoglucogénesis, así como algunas moléculas clave de señalización de la insulina, el sensor metabólico AMPK y p-AMPK y el transporte de glucosa en el tejido hepático de ratas alimentadas con DRS, un modelo ampliamente reconocido de SM y trastornos relacionados. Cabe destacar que estos hallazgos se acompañaron de un enriquecimiento en PUFA n-3 en los fosfolípidos de la membrana plasmática del tejido hepático.

Si bien la semilla de chia es rica en ácido α -linolénico (PUFA 18:3, n-3), no podemos descartar la posibilidad de que otros componentes de la semilla de chia como proteínas, fibras, minerales y antioxidantes también puedan contribuir a los efectos beneficiosos encontrados en el presente trabajo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la semilla de chia podría considerarse un alimento funcional y una estrategia dietética prometedora para prevenir o atenuar trastornos metabólicos asociados al desarrollo de SM, incluyendo el daño hepático, el estrés oxidativo, la inflamación, la fibrosis, la alteración de la señalización insulínica y la homeostasis de la glucosa. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de la afección hepática asociada al SM y sus comorbilidades asociadas, las semillas de chia se perfilan como una intervención dietética eficaz para la salud hepática y el cuidado metabólico general.

Por último, si bien la extrapolación de estos resultados en animales de experimentación a humanos debe realizarse con cautela, el modelo animal empleado resulta útil para el estudio de los mecanismos mediante los cuales los nutrientes influyen en el desarrollo y el tratamiento de las enfermedades metabólicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrescia, P., Treppiccione, L., Rossi, M., & Bergamo, P. (2020). Modulatory role of dietary polyunsaturated fatty acids in Nrf2-mediated redox homeostasis. *Progress in Lipid Research*, 80, 101066. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101066>
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ahmed, M., Kumari, N., Mirgani, Z., Saeed, A., Ramadan, A., Ahmed, M. H. & Almobarak, A. O. (2022). Metabolic syndrome; Definition, Pathogenesis, Elements, and the Effects of medicinal plants on it's elements. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorder*, 21(1), 1011-1022. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00965-2>.
- Ahmed, S. M., & Masoud, M. A. (2024). *Salvia hispanica* L. (chia seeds) alleviates paracetamol-induced acute liver injury in mice by modulating oxidative stress and inflammation. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 23(4), 620–629. https://doi.org/10.4103/epj.epj_327_23
- Aiassa, V., Ferreira, M. R., Ingaramo, P., & D'Alessandro, M. E. (2025). *Salvia hispanica* L. (chia) seed have beneficial effects upon visceral adipose tissues extracellular matrix disorders and inflammation developed in a sucrose-rich diet-induced adiposity rodent model. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 597, 112438. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112438>
- Aiassa, V., Ferreira, M. R., Villafañe, N., & Eugenia D'Alessandro, M. E. (2022). α -Linolenic acid rich-chia seed modulates visceral adipose tissue collagen deposition, lipolytic enzymes expression, insulin signaling and GLUT-4 levels in a diet-induced adiposity rodent model. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 156, 111164. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111164>
- Aihara, K., Ikeda, Y., Yagi, S., Akaike, M., & Matsumoto, T. (2011). Transforming Growth Factor- β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2011, 175381. <https://doi.org/10.4061/2011/175381>
- Alabdul Razzak, I., Nouredin, M. & Trivedi, H. D. (2024). From Nonalcoholic Fatty Liver Disease to Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: Out with the Old,

- in with the New. *Journal of Clinical Medicine*. 13(3):880. <https://doi.org/10.3390/jcm13030880>.
- Altalhi, R., Pechlivani, N., & Ajjan, R. A. (2021). PAI-1 in Diabetes: Pathophysiology and Role as a Therapeutic Target. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3170. <https://doi.org/10.3390/ijms22063170>
- Altamirano, G. A., Delconte, M. B., Gomez, A. L., Ingaramo, P. I., Bosquiazazo, V. L., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2018). Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 118, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.011>
- Ambroselli, D., Masciulli, F., Romano, E., Catanzaro, G., Besharat, Z. M., Massari, M. C., Ferretti, E., Migliaccio, S., Izzo, L., Ritieni, A., Grosso, M., Formichi, C., Dotta, F., Frigerio, F., Barbiera, E., Giusti, A.M., Ingallina, C., & Mannina, L. (2023). New Advances in Metabolic Syndrome, from Prevention to Treatment: The Role of Diet and Food. *Nutrients*, 15(3), 640. <https://doi.org/10.3390/nu15030640>
- Andrikopoulos, S., Rosella, G., Kaczmarczyk, S. J., Zajac, J. D., & Proietto, J. (1996). Impaired regulation of hepatic fructose-1,6-biphosphatase in the New Zealand Obese mouse: an acquired defect. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 45(5), 622–626. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(96\)90034-7](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(96)90034-7)
- Arctos Specimen Database. (2018). MVZ bird collection dataset (version 43.16) [Base de datos]. https://ipt.vertnet.org/resource?r=mvz_bird
- Arriazu, E., Ruiz de Galarreta, M., Cubero, F. J., Varela-Rey, M., Pérez de Obanos, M. P., Leung, T. M., Lopategi, A., Benedicto, A., Abraham-Enachescu, I., & Nieto, N. (2014). Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(7), 1078–1097. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5697>
- Arroyave-Ospina, J. C., Wu, Z., Geng, Y., & Moshage, H. (2021). Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(2), 174. <https://doi.org/10.3390/antiox10020174>

- Arteel G.E. (2024). Hepatic Extracellular Matrix and Its Role in the Regulation of Liver Phenotype. *Seminars in Liver Disease*, 44(3), 343–355. <https://doi.org/10.1055/a-2404-7973>
- Aslam, M., & Ladilov, Y. (2022). Emerging Role of cAMP/AMPK Signaling. *Cells*, 11(2), 308. <https://doi.org/10.3390/cells11020308>
- Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., Cital, C. & Catak, Z. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*. 30(1),1-9. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.05.013>
- Ayerza, R. & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25(11), 995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.09.013>
- Ayerza, R., Jr., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(1), 27–34. <https://doi.org/10.1159/000100818>
- Balkau, B. & Charles, M. A. (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic Medicine*, 16(5), 442-443. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.1999.00059.x>
- Barzilai, N., & Rossetti, L. (1993). Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(33), 25019–25025.
- Belcastro, A. N., Arthur, G. D., Albisser, T. A., & Raj, D. A. (1996). Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 80(4), 1331–1335. <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.80.4.1331>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bergmeyer, H. U. (Ed.). (1963). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press.

- Berumen, J., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Mekeel, K. (2021). Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *WIREs Mechanisms of Disease*, 13(1), e1499. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1499>
- Bettaieb, A., Vazquez Prieto, M. A., Rodriguez Lanzi, C., Miatello, R. M., Haj, F. G., Fraga, C. G., et al., 2014. (-)-Epicatechin mitigates high-fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.011>
- Bezerra, R. M., Ueno, M., Silva, M. S., Tavares, D. Q., Carvalho, C. R., & Saad, M. J. (2000). A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *The Journal of Nutrition*, 130(6), 1531–1535. <https://doi.org/10.1093/jn/130.6.1531>
- Blakely, S. R., Hallfrisch, J., Reiser, S., & Prather, E. S. (1981). Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *The Journal of Nutrition*, 111(2), 307–314. <https://doi.org/10.1093/jn/111.2.307>
- Bo, T., Gao, L., Yao, Z., Shao, S., Wang, X., Proud, C. G., & Zhao, J. (2024). Hepatic selective insulin resistance at the intersection of insulin signaling and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Cell Metabolism*, 36(5), 947–968. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.04.006>
- Bovolini, A., Garcia, J., Andrade, M. A. & Duarte, J. A. (2021) Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *International Journal of Sports Medicine*. 42(3), 199-214. <https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burchfield, J. G., Diaz-Vegas, A., & James, D. E. (2025). The insulin signalling network. *Nature Metabolism*, 7(9), 1745–1764. <https://doi.org/10.1038/s42255-025-01349-z>
- Burger, K., Michael Trauner, M. & Bergheim, I. (2025). Pathogenic aspects of fructose consumption in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): A narrative review. *Cell Stress*. 9:49-64. <https://doi.org/10.15698/cst2025.06.305>

- Carling D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 45, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005>
- Chan, W. K., Chuah, K. H., Rajaram, R. B., Lim, L. L., Ratnasingam, J. & Vethakkan, S. R. (2023) Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A State-of-the-Art Review. *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*. 32(3):197-213. <https://doi.org/10.7570/jomes23052>
- Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K., Park, S. I., & Lee, S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discovery*, 11(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02278-8>
- Chicco, A., D'Alessandro, M. E., Karabatas, L., Pastorale, C., Basabe, J. C., & Lombardo, Y. B. (2003). Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *The Journal of Nutrition*, 133(1), 127–133. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.127>
- Chicco, A. G., D'Alessandro, M. E., Hein, G. J., Oliva, M. E., & Lombardo, Y. B. (2009). Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *The British Journal of Nutrition*, 101(1), 41–50. <https://doi.org/10.1017/S000711450899053X>
- Clare, K., Dillon, J. F., & Brennan, P. N. (2022). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis of MAFLD. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 10(5), 939–946. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2022.00067>
- Coates, W. (2011). Whole and ground chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, chia oil, and effects on plasma lipids and fatty acids. In V.R. Preedy, R.R. Watson, & V.P. Patel (Eds.), *Nuts and seeds in health and disease prevention* (pp. 309–315). Academic Press.
- Creus, A., Benmelej, A., Villafañe, N., & Lombardo, Y. B. (2017). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) improves the altered metabolic fate of glucose and reduces increased collagen deposition in the heart of insulin-resistant rats. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 121, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.06.002>

- Creus, A., Chicco, A., Álvarez, S. M., Giménez, M. S., & de Lombardo, Y. B. (2020). Dietary *Salvia hispanica* L. reduces cardiac oxidative stress of dyslipidemic insulin-resistant rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(7), 761–768. <https://doi.org/10.1139/apnm-2019-0769>
- Creus, A., Ferreira, M. R., Oliva, M. E., & Lombardo, Y. B. (2016). Mechanisms Involved in the Improvement of Lipotoxicity and Impaired Lipid Metabolism by Dietary α -Linolenic Acid Rich *Salvia hispanica* L (Salba) Seed in the Heart of Dyslipemic Insulin-Resistant Rats. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 18. <https://doi.org/10.3390/jcm5020018>
- Creus, A., Ingaramo, P., Oliva, M. E. & D'Alessandro, M. E. (2022). Dietary *Salvia hispanica* L. Seed Counteracted Kidney Failure in Experimental Metabolic Syndrome. *Journal of Food Nutrition and Metabolism*, 5(1), 1-11. <https://doi.org/10.31487/j.JFNM.2022.01.03>
- D'Alessandro, M. E., Oliva, M. E., Fortino, M. A. & Chicco, A. (2014). Maternal sucrose-rich diet and fetal programming: changes in hepatic lipogenic and oxidative enzymes and glucose homeostasis in adult offspring. *Food & Function*, 5(3), 446–453. <https://doi.org/10.1039/c3fo60436e>
- D'Alessandro, M. E. G., Chicco, A. G., & Lombardo, Y. B. (2006). A long-term sucrose-rich diet increases diacylglycerol content and membrane nPKC θ expression and alters glucose metabolism in skeletal muscle of rats. *Nutrition Research*, 26(6), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.07.005>
- Da Silva Marineli, R., Lenquiste, S. A., Moraes, É. A., & Maróstica, M. R., Jr (2015a). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 76(Pt 3), 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.039>
- Da Silva Marineli, R., Moura, C. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Lollo, P. C., Morato, P. N., Amaya-Farfan, J., & Maróstica, M. R., Jr (2015b). Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 31(5), 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.11.009>
- D'Alessandro, M. E., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2008). Dietary fish oil reverses lipotoxicity, altered glucose metabolism, and nPKC ϵ translocation in the heart of dyslipemic

- insulin-resistant rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57(7), 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.02.005>
- D'Alessandro, M. E., Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Selenscig, D., Lombardo, Y. B., & Chicco, A. (2012). Sucrose-rich feeding during rat pregnancy-lactation and/or after weaning alters glucose and lipid metabolism in adult offspring. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 39(7), 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2012.05720.x>
- D'Alessandro, M. E., Selenscig, D., Illesca, P., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2015). Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. *Food & Function*, 6(4), 1299–1309. <https://doi.org/10.1039/c4fo00903g>
- Dawood, R. M., El-Meguid, M. A., Salum, G. M., & El Awady, M. K. (2020). Key Players of Hepatic Fibrosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 40(10), 472–489. <https://doi.org/10.1089/jir.2020.0059>
- de Cássia Lovato, A., Lamounier Moura Vargas Corgozinho, M., Vieira Alves, L., Rodrigues Martins, S., Figueiredo Duarte, R. C., Neris Cardoso, C., Paolucci de Paiva Silvino, J., Ferreira, C. N., Oliveira Silva, I. F. & Lucas Mota, A. P. (2022). Effect of the use of Chia (*Salvia Hispanica* L.) seeds on antioxidant status and anthropometric parameters in obese, type 2 diabetics and/or hypertensive patients. *Research, Society and Development*, 11(4), e46511427432. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27432>
- Delarue, J., & Lallès, J. P. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease: Roles of the gut and the liver and metabolic modulation by some dietary factors and especially long-chain n-3 PUFA. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(1), 147–159. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500346>
- Depner, C. M., Philbrick, K. A., & Jump, D. B. (2013). Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr (-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutrition*, 143(3), 315–323. <https://doi.org/10.3945/jn.112.171322>

- Dias Moreira, P. L., Enes, B. N., de São José, V. P. B., Toledo, R. C. L., Ladeira, L. C. M., Cardoso, R. R., da Silva Duarte, V., Hermsdorff, H. H. M., de Barros, F. A. R., & Martino, H. S. D. (2022). Chia (*Salvia hispanica* L.) Flour and Oil Ameliorate Metabolic Disorders in the Liver of Rats Fed a High-Fat and High Fructose Diet. *Foods* (Basel, Switzerland), *11*(3), 285. <https://doi.org/10.3390/foods11030285>
- Diaz, A., Espeche, W., March, C., Flores, R., Parodi, R., Genesio, M. A., Sabio, R. & Poppe, S. (2018). Prevalencia del síndrome metabólico en Argentina en los últimos 25 años: revisión sistemática de estudios observacionales poblacionales. *Hipertension y Riesgo Vascular*. *35*(2), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2017.08.003>
- Diaz, L. A., Arab, J. P., Idalsoaga, F., Perelli, J., Vega, J., Dirchwolf, M., Carreño, J., Samith, B., Valério, C., Moreira, R. O., Acevedo, M., Brahm, J., Hernández, N., Gadano, A., Oliveira, C. P., Arrese, M., Castro-Narro, G. & Pessoa, M. G. (2025). Updated recommendations for the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) by the Latin American working group. *Annals of Hepatology*. *30*(2):101903. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2025.101903>
- Diesselhoff-den Dulk, M. M., Crofton, R. W., & van Furth, R. (1979). Origin and kinetics of Kupffer cells during an acute inflammatory response. *Immunology*, *37*(1), 7–14.
- Dimova, E. Y., & Kietzmann, T. (2008). Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver. *Thrombosis and Haemostasis*, *100*(6), 992–1006.
- Dooley, S., & ten Dijke, P. (2012). TGF- β in progression of liver disease. *Cell and tissue research*, *347*(1), 245–256. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1246-y>
- Egea, M. B., & Fernandes, S. S. (2025). Unlocking the Potential of Chia Intake in the Management of Metabolic Syndrome and its Risk Conditions: A Narrative Review. *Plant Foods for Human Nutrition* (Dordrecht, Netherlands), *80*(2), 90. <https://doi.org/10.1007/s11130-025-01331-w>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *82*(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

- Elshaer, A., Chascas, D. M. H. & Lizaola-Mayo, B.C. (2024). Exploring Varied Treatment Strategies for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Life* (Basel). 14(7):844. <https://doi.org/10.3390/life14070844>
- Enes, B. N., Moreira, L. P. D., Toledo, R. C. L., Moraes, É. A., Moreira, M. E. C., Hermsdorff, H. H. M., Noratto, G., Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S., & Martino, H. S. D. (2020). Effect of different fractions of chia (*Salvia hispanica* L.) on glucose metabolism, in vivo and in vitro. *Food Research International*, 133, 109187. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109187>
- Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 960, 1-17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1
- Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y. & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(2):786. <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>
- Fernández-Martínez, E., Lira-Islas, I. G., Cariño-Cortés, R., Soria-Jasso, L. E., Pérez-Hernández, E., & Pérez-Hernández, N. (2019). Dietary chia seeds (*Salvia hispanica*) improve acute dyslipidemia and steatohepatitis in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 43(9), e12986. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12986>
- Ferreira, M. R., Alvarez, S. M., Illesca, P., Giménez, M. S., & Lombardo, Y. B. (2018). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *European Journal of Nutrition*, 57(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1299-5>
- Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary fish oil normalized glucose-stimulated insulin secretion in isolated pancreatic islets of dyslipemic rats through mechanisms involving glucose phosphorylation, peroxisome proliferator-activated receptor γ and uncoupling protein 2. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 89(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.04.006>

- Ferreira, M. R., Lombardo, Y. B., & Chicco, A. (2010). β -Cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet. *Islets*, 2(6), 367–373. <https://doi.org/10.4161/isl.2.6.13869>
- Ferreira, M. R., Oliva, M. E., Aiassa, V. & D'Alessandro, M. E. (2020). Salvia hispanica L. (chia) seed improves skeletal muscle lipotoxicity and insulin sensitivity in rats fed a sucrose rich diet by modulating intramuscular lipid metabolism. *Journal of Functional Foods*, 66, 103775. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103775>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66, 375–400.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Fonte-Faria, T., Citelli, M., Atella, G. C., Raposo, H. F., Zago, L., de Souza, T., da Silva, S. V., & Barja-Fidalgo, C. (2019). Chia oil supplementation changes body composition and activates insulin signaling cascade in skeletal muscle tissue of obese animals. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 58, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.08.011>
- Giani, J. F., Mayer, M. A., Muñoz, M. C., Silberman, E. A., H'ocht, C., Taira, C. A., Gironacci, M. M., Turyn, D., Dominici, F. P. (2009). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 296 (2), E262–E271. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90678.2008>
- Gil, Á. (2017). Tratado de nutrición (Vols. 1–4, 3.^a ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F. & Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540):547–51. <https://doi.org/10.1038/nature13989>

- Gonzalez-Becerra, K., Barron-Cabrera, E., Muñoz-Valle, J. F., Torres-Castillo, N., Rivera-Valdes, J. J., Rodriguez-Echevarria, R., & Martinez-Lopez, E. (2023). A Balanced Dietary Ratio of n-6:n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Exerts an Effect on Total Fatty Acid Profile in RBCs and Inflammatory Markers in Subjects with Obesity. *Healthcare* (Basel, Switzerland), *11*(16), 2333. <https://doi.org/10.3390/healthcare11162333>
- Grancieri, M., Martino, H. S. D., & Gonzalez de Mejia, E. (2019). Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(2), 480–499. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12423>
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C. Jr, Spertus, J. A. & Costa, F. (2005). American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, *112*(17):2735-52. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404>
- Grundy, S. M. (2008). Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *28*(4), 629-36. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151092>
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, *87*(1), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.019>
- Guelzim, N., Huneau, J. F., Mathé, V., Tesseraud, S., Mourot, J., Simon, N., & Hermier, D. (2014). N-3 fatty acids improve body composition and insulin sensitivity during energy restriction in the rat. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, *91*(5), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.07.007>
- Guo, X., Yin, X., Liu, Z., & Wang, J. (2022). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 15489. <https://doi.org/10.3390/ijms232415489>
- Hales, E. C., Taub, J. W., & Matherly, L. H. (2014). New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of γ -secretase inhibitor resistant T-

- cell acute lymphoblastic leukemia. *Cellular Signalling*, 26(1), 149–161.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.021>
- Han, K., Li, X.-Y., Zhang, Y.-Q., He, Y.-L., Hu, R., Lu, X.-L., Li, Q.-J., & Hui, J. (2020). Chia seed oil prevents high-fat diet-induced hyperlipidemia and oxidative stress in mice. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(4), 1900443.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201900443>
- Handelsman, Y., Mechanick, J. I., Blonde, L., Grunberger, G., Bloomgarden, Z. T., Bray, G. A., Dagogo-Jack, S., Davidson, J. A., Einhorn, D., Ganda, O., Garber, A. J., Hirsch, I. B., Horton, E. S., Ismail-Beigi, F., Jellinger, P. S., Jones, K. L., Jovanović, L., Lebovitz, H., Levy, P., ... Wyne, K. L. (2011). AACE Task Force for Developing Diabetes Comprehensive Care Plan. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. *Endocrine Practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 17 Suppl 2, 1–53.
<https://doi.org/10.4158/ep.17.s2.1.17>
- Haque, R., Islam, K., Paul, S., Chowdhury, F. I., Bary, M. A., Nayan, S. I., Rafia, S., Islam, M. D., Hassan, S. M. H., Chowdhury, A. K., Sharmin, N., Dina, S. S., & Raihan, S. Z. (2024). Supplementation of *Salvia hispanica* L. seed ameliorated liver function enzymes, hyperlipidemia, and oxidative stress in high fat diet fed Swiss albino mice. *Phytomedicine Plus*, 4(3), 100576. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100576>
- Hein, G. J., Bernasconi, A. M., Montanaro, M. A., Pellon-Maison, M., Finarelli, G., Chicco, A., Lombardo, Y. B., & Brenner, R. R. (2010). Nuclear receptors and hepatic lipogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(3), E429–E439. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00513.2009>
- Hein, G. J., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2012). Fish oil normalizes plasma glucose levels and improves liver carbohydrate metabolism in rats fed a sucrose-rich diet. *Lipids*, 47(2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3623-4>
- Herbert, V., Lau, K. S., Gottlieb, C. W. & Bleicher, S. J. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(10), 1375–1384.
<https://doi.org/10.1210/jcem-25-10-1375>

- Hernández-Rodas, M. C., Valenzuela, R., Echeverría, F., Rincón-Cervera, M. Á., Espinosa, A., Illesca, P., Muñoz, P., Corbari, A., Romero, N., Gonzalez-Mañan, D., & Videla, L. A. (2017). Supplementation with Docosahexaenoic Acid and Extra Virgin Olive Oil Prevents Liver Steatosis Induced by a High-Fat Diet in Mice through PPAR- α and Nrf2 Upregulation with Concomitant SREBP-1c and NF-kB Downregulation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(12), 10.1002/mnfr.201700479. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700479>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 19(2), 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Heydarpour, F., Sajadimajd, S., Mirzarazi, E., Haratipour, P., Joshi, T., Farzaei, M. H., Khan, H., & Echeverría, J. (2020). Involvement of TGF- β and Autophagy Pathways in Pathogenesis of Diabetes: A Comprehensive Review on Biological and Pharmacological Insights. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 498758. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.498758>
- Ho, H., Lee, A. S., Jovanovski, E., Jenkins, A. L., Desouza, R. & Vuksan, V. (2013). Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia Hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67(7), 786–788. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.103>
- Hogenkamp, A., Ehlers, A., Garssen, J., & Willemsen, L. E. M. (2020). Allergy Modulation by N-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Fat Soluble Nutrients of the Mediterranean Diet. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1244. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01244>
- Horn, H. D. (1974). Glutathione Reductase. In *methods of enzymatic analysis*. (2nd ed.), (editado por Bergmeyer, HU). Academic Press. New York, 875-879.
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), 1483–1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>

- Ichihara, K., Yamaguchi, C., Araya, Y., Sakamoto, A., & Yoneda, K. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters by selective methanolysis of polar glycerolipids. *Lipids*, 45(4), 367–374. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3404-5>
- IDF Diabetes Atlas (2019) (9th ed.).
- Illesca, P. G., Ferreira, M. R., Benmelej, A., & D'Alessandro, M. E. (2025). Salvia hispanica L. (chia) seed improves redox state and reverts extracellular matrix collagen deposition in skeletal muscle of sucrose-rich diet-fed rats. *BioFactors* (Oxford, England), 51(1), e2087. <https://doi.org/10.1002/biof.2087>
- Ingaramo, P. I., Guerrero Schimpf, M., Milesi, M. M., Luque, E. H., & Varayoud, J. (2019). Acute uterine effects and long-term reproductive alterations in postnatally exposed female rats to a mixture of commercial formulations of endosulfan and glyphosate. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110832. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110832>
- Jeffery, N. M., Sanderson, P., Sherrington, E. J., Newsholme, E. A., & Calder, P. C. (1996). The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids*, 31(7), 737–745. <https://doi.org/10.1007/BF02522890>
- Jeyapal, S., Kona, S. R., Mullapudi, S. V., Putcha, U. K., Gurumurthy, P., & Ibrahim, A. (2018). Substitution of linoleic acid with α -linolenic acid or long chain n-3 polyunsaturated fatty acid prevents Western diet induced nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports*, 8(1), 10953. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29222-y>
- Jin, F., Nieman, D. C., Sha, W., Xie, G., Qiu, Y. & Jia, W. (2012). Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods for Human Nutrition* (Dordrecht, Netherlands), 67(2), 105–110. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0286-0>
- Kakkar, P., Das, B., & Viswanathan, P. N. (1984). A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 21(2), 130–132.
- Khalid, W., Arshad, M. S., Aziz, A., Rahim, M. A., Qaisrani, T. B., Afzal, F., Ali, A., Ranjha, M. M. A. N., Khalid, M. Z., & Anjum, F. M. (2022). Chia seeds (*Salvia hispanica* L.): A

- therapeutic weapon in metabolic disorders. *Food Science & Nutrition*, 11(1), 3–16.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.3035>
- Kim, Y., Park, Y., Rho, H., Yao, T., Gao, B., & Hwang, S. (2025). Inflammation in MASLD progression and cancer. *JHEP reports: Innovation in Hepatology*, 7(8), 101414.
<https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2025.101414>
- Knez Hrnčič, M., Ivanovski, M., Cör, D., & Knez, Ž. (2019). Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.): An Overview-Phytochemical Profile, Isolation Methods, and Application. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(1), 11. <https://doi.org/10.3390/molecules25010011>
- Koh, J., Mohamed, A., Kong, G., Wong, E., Chen, Y., Anand, V. V., Chong, B., Chin, Y. H., Wang, J. W., Khoo, C. M., Chan, S. P., Muthiah, M., Dimitriadis, G. K., Chan, M. Y., Loh, P. H., & Chew, N. W. S. (2025). Long-term all-cause mortality of metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease based on body weight phenotypes following acute myocardial infarction: A retrospective cohort study. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 27(2), 683–696. <https://doi.org/10.1111/dom.16062>
- Koyama, Y., & Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 55–64. <https://doi.org/10.1172/JCI88881>
- Kubota, N., Kubota, T., & Kadowaki, T. (2025). Physiological and pathophysiological actions of insulin in the liver. *Endocrine Journal*, 72(2), 149–159.
<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ24-0192>
- Kulczyński, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., & Gramza-Michałowska, A. (2019). The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds-Current State of Knowledge. *Nutrients*, 11(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/nu11061242>
- Lackner, C. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease. In *Practical hepatic pathology: A diagnostic approach* (pp. 167–187).
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Le, M. H., Yeo, Y. H., Zou, B., Barnet, S., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2022). Forecasted 2040 global prevalence of nonalcoholic fatty liver disease using hierarchical

- bayesian approach. *Clinical and Molecular Hepatology*. 28(4):841-850. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0239>
- Leach A. A. (1960). Notes on a modification of the Neuman and Logan method for the determination of the hydroxyproline. *The Biochemical Journal*, 74(1), 70–71. <https://doi.org/10.1042/bj0740070>
- Lee, H. S., & Csallany, A. S. (1987). Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E-deficient and -supplemented rat liver tissues. *Lipids*, 22(2), 104–107. <https://doi.org/10.1007/BF02534861>
- Lee, Y. A., Wallace, M. C., & Friedman, S. L. (2015). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*, 64(5), 830–841. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306842>
- Lee; H. H., Lee, H. A., Kim, E. J., Kim, H. Y., Kim, H. C., Ahn, S. H., Lee, H. & Kim, S. U. (2024). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and risk of cardiovascular disease. *Gut*. 73(3):533-540. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-331003>
- Li, Q., Zhao, Q., Zhang, J., Zhou, L., Zhang, W., Chua, B., Chen, Y., Xu, L., & Li, P. (2019). The Protein Phosphatase 1 Complex Is a Direct Target of AKT that Links Insulin Signaling to Hepatic Glycogen Deposition. *Cell Reports*, 28(13), 3406–3422.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.066>
- Li, Y., Yang, P., Ye, J., Xu, Q., Wu, J. & Wang, Y. (2024). Updated mechanisms of MASLD pathogenesis. *Lipids in Health and Disease*. 23(1):117. <https://doi.org/10.1186/s12944-024-02108-x>
- Liu, S. H., Chiu, C. Y., Wang, L. P., & Chiang, M. T. (2019). Omega-3 Fatty Acids-Enriched Fish Oil Activates AMPK/PGC-1 α Signaling and Prevents Obesity-Related Skeletal Muscle Wasting. *Marine Drugs*, 17(6), 380. <https://doi.org/10.3390/md17060380>
- Liu, Z., Dou, W., Ni, Z., Wen, Q., Zhang, R., Qin, M., Wang, X., Tang, H., Cao, Y., Wang, J., & Zhao, S. (2016). Deletion of Nrf2 leads to hepatic insulin resistance via the activation of NF- κ B in mice fed a high-fat diet. *Molecular Medicine Reports*, 14(2), 1323–1331. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5393>

- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. & Oh, B. J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinical Proceeding*, 55(7):434-8.
- Lytle, K. A., Depner, C. M., Wong, C. P., & Jump, D. B. (2015). Docosahexaenoic acid attenuates Western diet-induced hepatic fibrosis in Ldlr^{-/-} mice by targeting the TGF β -Smad3 pathway. *Journal of Lipid Research*, 56(10), 1936–1946. <https://doi.org/10.1194/jlr.M061275>
- Manful, C. F., Fordjour, E., Subramaniam, D., Sey, A. A., Abbey, L., & Thomas, R. (2025). Antioxidants and Reactive Oxygen Species: Shaping Human Health and Disease Outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(15), 7520. <https://doi.org/10.3390/ijms26157520>
- Marcinek, K., & Krejpcio, Z. (2017). Chia seeds (*Salvia hispanica*): health promoting properties and therapeutic applications – a review. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 68(2), 123–129.
- Maroto-García, J., Moreno-Álvarez, A., Sanz de Pedro, M. P., Buño-Soto, A., & González, Á. (2024). Biomarcadores séricos para la evaluación de la fibrosis hepática. *Advances in Laboratory Medicine*, 5(2), 131–147. <https://doi.org/10.1515/almed-2023-0172>
- Matsumoto, M., Pocai, A., Rossetti, L., Depinho, R. A., & Accili, D. (2007). Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metabolism*, 6(3), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.006>
- Matzinger, M., Fischhuber, K., & Heiss, E. H. (2018). Activation of Nrf2 signaling by natural products-can it alleviate diabetes?. *Biotechnology Advances*, 36(6), 1738–1767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.015>
- Medina-Urrutia, A., Lopez-Urbe, A. R., El Hafidi, M., González-Salazar, M. D. C., Posadas-Sánchez, R., Jorge-Galarza, E., Del Valle-Mondragón, L., & Juárez-Rojas, J. G. (2020). Chia (*Salvia hispanica*)-supplemented diet ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and its metabolic abnormalities in humans. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01283-x>

- Melo, D., Machado, T. B., & Oliveira, M. B. P. P., (2019). Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. *Food & Function*, 10(6), 3068–3089. <https://doi.org/10.1039/c9fo00239a>
- Miao, L., Targher, G., Byrne, C. D., Cao, Y.Y. & Zheng, M. H. (2024). Current status and future trends of the global burden of MASLD. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 35(8):697-707. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.02.007>
- Montes G. S. (1996). Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International*, 20(1), 15–27. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0004>
- Motyka, S., Koc, K., Ekiert, H., Blicharska, E., Czarnek, K., & Szopa, A. (2022). The Current State of Knowledge on *Salvia hispanica* and *Salviae hispanicae* semen (Chia Seeds). *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(4), 1207. <https://doi.org/10.3390/molecules27041207>
- Motyka, S., Kuszniereicz, B., Ekiert, H., Korona-Główniak, I., & Szopa, A. (2023). Comparative Analysis of Metabolic Variations, Antioxidant Profiles and Antimicrobial Activity of *Salvia hispanica* (Chia) Seed, Sprout, Leaf, Flower, Root and Herb Extracts. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(6), 2728. <https://doi.org/10.3390/molecules28062728>
- Mubarak, M. (2024). Changes in the terminology and diagnostic criteria of non-alcoholic fatty liver disease: Implications and opportunities. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 15(1):92864. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v15.i1.92864>
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. (2020). Harper's illustrated biochemistry (31st ed.). McGraw-Hill Education.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). Lehninger principles of biochemistry (5th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). Lehninger principles of biochemistry (7th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Nemer, M., Osman, F., & Said, A. (2024). Dietary macro and micronutrients associated with MASLD: Analysis of a national US cohort database. *Annals of Hepatology*, 29(3), 101491. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2024.101491>

- Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). Nontriglyceride hepatic lipotoxicity: the new paradigm for the pathogenesis of NASH. *Current Gastroenterology Reports*, 12(1):49-56. <https://doi.org/10.1007/s11894-009-0083-6>.
- Nieman, D. C., Cayea, E. J., Austin, M. D., Henson, D. A., McAnulty, S. R., & Jin, F. (2009). Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutrition Research* (New York, N.Y.), 29(6), 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.05.011>
- Nieman, D. C., Gillitt, N., Jin, F., Henson, D. A., Kennerly, K., Shanely, R. A., Ore, B., Su, M. & Schwartz, S. (2012). Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: a metabolomics investigation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (New York, N.Y.), 18(7), 700–708. <https://doi.org/10.1089/acm.2011.0443>
- Nikpayam, O., Jafari, A., Safaei, E., Naghshi, N., Najaf, M. y Sohrab, G. (2023). Effect of chia product supplement on anthropometric measures, blood pressure, glycemic-related parameters, lipid profile and inflammatory indicators: A systematic and meta-analysis. *Journal of Functional Foods*, 110, 105867. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105867>
- Oliva, M. E., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2015). Mechanisms underlying the beneficial effect of soy protein in improving the metabolic abnormalities in the liver and skeletal muscle of dyslipemic insulin resistant rats. *European Journal of Nutrition*, 54(3), 407–419. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0721-0>
- Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 89(5), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.09.010>
- Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Vega Joubert, M. B., & D'Alessandro, M. E. (2021a). *Salvia hispanica* L. (chia) seed promotes body fat depletion and modulates adipocyte lipid handling in sucrose-rich diet-fed rats. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 139, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109842>
- Oliva, M. E., Ingaramo, P., Vega Joubert, M. B., Ferreira, M. D. R., & D'Alessandro, M. E. (2021b). Effects of *Salvia hispanica* L. (chia) seed on blood coagulation, endothelial

dysfunction and liver fibrosis in an experimental model of Metabolic Syndrome. *Food & Function*, 12(24), 12407–12420. <https://doi.org/10.1039/d1fo02274a>

- Oliveira-Alves, S. C., Vendramini-Costa, D. B., Betim Cazarin, C. B., Maróstica Júnior, M. R., Borges Ferreira, J. P., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*, 232, 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.002>
- Omran, N. H., El-Bahy, A. A. Z., Hosny, H. T. A. & Handoussa H. (2023). Quinoa and chia modulate AMPK/PPAR- γ signaling in high-fat diet-induced obesity rat model. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(3), 583–594. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00388-5>
- Orliacq, J., Pérez-Cornago, A., Parry, S. A., Kelly, R. K., Koutoukidis, D. A., & Carter, J. L. (2023). Associations between types and sources of dietary carbohydrates and liver fat: a UK Biobank study. *BMC Medicine*, 21(1), 444. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03135-8>
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–169.
- Palihaderu, P. A. D. S., Mendis, B. I. L. M., Premarathne, J. M. K. J. K., Dias, W. K. R. R., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Dissanayake, A. S., Rajapakse, I. H., Karunanayake, P., Senarath, U., & Satharasinghe, D. A. (2022). Potential role of microRNAs in selective hepatic insulin resistance: From paradox to the paradigm. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1028846. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1028846>
- Parola, M., & Pinzani, M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Molecular Aspects of Medicine*, 65, 37–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>
- Patted, P. G., Masareddy, R. S., Patil, A. S., Kanabargi, R. R., & Bhat, C. T. (2024). Omega-3 fatty acids: A comprehensive scientific review of their sources, functions and health benefits. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, Article 94. <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00667-5>

- Peláez, P., Orona-Tamayo, D., Montes-Hernández, S., Valverde, M. E., Paredes-López, O., & Cibrián-Jaramillo, A. (2019). Comparative transcriptome analysis of cultivated and wild seeds of *Salvia hispanica* (chia). *Scientific Reports*, 9(1), 9761. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45895-5>
- Pereira da Silva, B., Toledo, R. C. L., Grancieri, M., Moreira, M. E. C., Medina, N. R., Silva, R. R., Costa, N. M. B., & Martino, H. S. D. (2019). Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 116, 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.078>
- Perona J. S. (2017). Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochimica et biophysica acta-Biomembranes*, 1859(9 Pt B), 1690–1703. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.015>
- Petrescu, I., Bojan, O., Saied, M., Bârză, O., Schmidt, F., & Kühnle, H. F. (1979). Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Analytical Biochemistry*, 96(2), 279–281. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90582-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90582-7)
- Phoolchund, A. G. S. & Khakoo, S. I. (2024). MASLD and the Development of HCC: Pathogenesis and Therapeutic Challenges. *Cancers* (Basel). 16(2):259. <https://doi.org/10.3390/cancers16020259>
- Pighin, D., Karabatas, L., Rossi, A., Chicco, A., Basabe, J. C., & Lombardo, Y. B. (2003). Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. *The Journal of Nutrition*, 133(12), 4095–4101. <https://doi.org/10.1093/jn/133.12.4095>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pontremoli, S., Traniello, S., Luppis, B., & Wood, W. A. (1965). Fructose diphosphatase from rabbit liver. I. Purification and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(9), 3459–3463.

- Popović, T., Nenadović, A., Stanković, A., Debeljak-Martačić, J., Rancović, S., Kovacevic, S., Nesovic-Ostojic, J., Illić, A., Milasin, J. & de Luka, S. (2024). Trbovich. Liver phospholipid fatty acid composition in response to chronic high-fat diets. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1869 (7), 159526. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2024.159526>
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Ward, L.C., Waanders, J., & Brown, L. (2012a). Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302(12), E1472–E1482. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00102.2012>
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012b). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.11.011>
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., & Spiegelman, B. M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*, 423(6939), 550–555. <https://doi.org/10.1038/nature01667>
- Qian, L., Zhu, Y., Deng, C., Liang, Z., Chen, J., Chen, Y., Wang, X., Liu, Y., Tian, Y., & Yang, Y. (2024). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 50. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01756-w>
- Ramírez-Jaramillo, G., & Lozano-Contreras, M. G. (2015). Potential for growing *Salvia hispanica* L., areas under rainfed conditions in Mexico. *Agricultural Sciences*, 6(9), 1048–1057. <https://doi.org/10.4236/as.2015.69100>
- Rao, G., Peng, X., Li, X., An, K., He, H., Fu, X., Li, S. & An Z. (2023). Unmasking the enigma of lipid metabolism in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: from mechanism to the clinic. *Frontiers in Medicine* (Lausanne). 10:1294267. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1294267>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., Jr (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on

- the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939-1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Rincón-Cervera, M. Á., Valenzuela, R., Hernandez-Rodas, M. C., Barrera, C., Espinosa, A., Marambio, M., & Valenzuela, A. (2016). Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 111, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.02.002>
- Rinella, M. E., Lazarus, J. V., Ratziu, V., Francque, S. M., Sanyal, A. J., Kanwal, F., Romero, D., Abdelmalek, M. F., Anstee, Q. M., Arab, J. P., Arrese, M., Bataller, R., Beuers, U., Boursier, J., Bugianesi, E., Byrne, C. D., Castro Narro, G. E., Chowdhury, A., Cortez-Pinto, H... Newsome, P. N. (2023). NAFLD Nomenclature consensus group. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology*, 78(6):1966-1986. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000520>
- Rosales Ricardo, Y. (2012). Anthropometry in the diagnosis of obese patients; a review. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1803-1809. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6044>
- Rosas Guzmán, J., González Chávez, A., Aschner, P., Bastarrachea, R. (2010). Epidemiología, diagnóstico, control, prevención y tratamiento del síndrome metabólico en Adultos. *Asociación Latinoamericana de Diabetes*, 18(1), 25-44. Disponible en: <http://www.revistaalad.com/pdfs/100125-44.pdf>
- Rossi, A. S., Lombardo, Y. B., & Chicco, A. G. (2010). Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: effects of fish oil. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 26(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.006>
- Rossi, A. S., Lombardo, Y. B., Lacorte, J. M., Chicco, A. G., Rouault, C., Slama, G. & Rizkalla, S. W. (2005). Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(2), R486–R494. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00846.2004>
- Rossi, A. S., Oliva, M. E., Ferreira, M. R., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2013). Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and

- oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats. *The British Journal of Nutrition*, 109(9), 1617–1627. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003558>
- Rubio, M. A., Moreno, C. & Cabrerizo, L. (2004). Guías para el tratamiento de las dislipemias en el adulto: Adult Treatment Panel III (ATP-III). *Endocrinología y Nutrición*, 51(5), 254-265.
- Saklayen M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Samuel, V. T. & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of Clinical Investigation*. 126(1):12-22. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>
- Santos-López, J. A., Garcimartín, A., Bastida, S., Bautista-Ávila, M., González-Muñoz, M. J., Benedí, J., & Sánchez-Muniz, F.J. (2018). Lipoprotein Profile in Aged Rats Fed Chia Oil- or Hydroxytyrosol-Enriched Pork in High Cholesterol/High Saturated Fat Diets. *Nutrients*, 10(12), 1830. <https://doi.org/10.3390/nu10121830>
- Savage, D. B., Petersen, K. F. & Shulman, G. I. (2005). Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension*. 45(5):828-33. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000163475.04421.e4>
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* (New York, N.Y.), 336(6077), 86–90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- Scott, C. L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., Devoogdt, N., Lambrecht, B. N., Beschinn, A., & Guillems, M. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature communications*, 7, 10321. <https://doi.org/10.1038/ncomms10321>
- Selensci, D., Rossi, A., Chicco, A., & Lombardo, Y. B. (2010). Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and

- insulin resistance: effect of dietary fish oil. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(6), 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.09.025>
- Shen, Z., Hou, Y., Zhao, G., Tan, L., Chen, J., Dong, Z., Ni, C., & Pei, L. (2024). Physiological functions of glucose transporter-2: From cell physiology to links with diabetes mellitus. *Heliyon*, 10(3), e25459. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25459>
- Silva Figueiredo, P., Inada, A. C., Ribeiro Fernandes, M., Granja Arakaki, D., Freitas, K. C., Avellaneda Guimarães, R. C., Aragão do Nascimento, V., & Aiko Hiane, P. (2018). An Overview of Novel Dietary Supplements and Food Ingredients in Patients with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(4), 877. <https://doi.org/10.3390/molecules23040877>
- Silva, L. A., Verneque, B. J. F., Mota, A. P. L., & Duarte, C. K. (2021). Chia seed (*Salvia hispanica* L.) consumption and lipid profile: a systematic review and meta-analysis. *Food & Function*, 12(19), 8835–8849. <https://doi.org/10.1039/d1fo01287h>
- Silveira Rossi, J. L., Barbalho, S. M., Reverete de Araujo, R., Bechara, M. D., Sloan, K. P. & Sloan, L. A. (2022). Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes/ Metabolism Research and Reviews*. 38(3), e3502. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3502>
- Son, S. H., Lee, S. M., Lee, M. H., Son, Y. K., Kim, S. E., & An, W. S. (2021). Omega-3 Fatty Acids Upregulate SIRT1/3, Activate PGC-1 α via Deacetylation, and Induce Nrf1 Production in 5/6 Nephrectomy Rat Model. *Marine Drugs*, 19(4), 182. <https://doi.org/10.3390/md19040182>
- Soria, A., Chicco, A., D'Alessandro, M. E, Rossi, A. & Lombardo, Y. B. (2002). Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model small star, filled. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(4), 209–218. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(01\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(01)00214-5)
- Stefan, N., Yki-Järvinen, H., & Neuschwander-Tetri, B. A. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: heterogeneous pathomechanisms and effectiveness of metabolism-based treatment. *The lancet. Diabetes & Endocrinology*, 13(2), 134–148. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00318-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00318-8)

- Sun, B., Chen, H., Xue, J., Li, P., & Fu, X. (2023). The role of GLUT2 in glucose metabolism in multiple organs and tissues. *Molecular Biology Reports*, 50(8), 6963–6974. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08535-w>
- Suzuki-Kemuriyama, N., Matsuzaka, T., Kuba, M., Ohno, H., Han, S. I., Takeuchi, Y., Isaka, M., Kobayashi, K., Iwasaki, H., Yatoh, S., Suzuki, H., Miyajima, K., Nakae, D., Yahagi, N., Nakagawa, Y., Sone, H., Yamada, N., & Shimano, H. (2016). Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PloS One*, 11(6), e0157580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157580>
- Svobodová, G., Horní, M., Velecká, E., & Boušová, I. (2025). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease-induced changes in the antioxidant system: a review. *Archives of Toxicology*, 99(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03889-x>
- Swarup, S., Ahmed, I., Grigorova, Y., Zeltser, R. (2024) Metabolic Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. PMID: 29083742.
- Syed-Abdul M. M. (2023). Lipid Metabolism in Metabolic-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Metabolites*, 14(1), 12. <https://doi.org/10.3390/metabo14010012>
- Takano A. (2017). Taxonomic study on Japanese Salvia (Lamiaceae): Phylogenetic position of *S. akiensis*, and polyphyletic nature of *S. lutescens* var. *intermedia*. *PhytoKeys*, 80, 87–104. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.80.11611>
- Targher, G., Byrne, C. D., & Tilg, H. (2024). MASLD: a systemic metabolic disorder with cardiovascular and malignant complications. *Gut*, 73(4), 691–702. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330595>
- Tavares Toscano, L., Tavares Toscano, L., Leite Tavares, R., da Oliveira Silva, C. S., & Silva, A. S. (2014). Chia induces clinically discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1176–1182. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8242>
- Teaney, N. A., & Cyr, N. E. (2023). FoxO1 as a tissue-specific therapeutic target for type 2 diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1286838. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1286838>

- Thorens B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
- Tilg, H. & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 52(5):1836-46. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2013). Principles of anatomy and physiology (13th ed.). John Wiley & Sons.
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology: CB*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Truong, X. T., & Lee, D. H. (2025). Hepatic Insulin Resistance and Steatosis in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: New Insights into Mechanisms and Clinical Implications. *Diabetes & Metabolism Journal*, 49(5), 964–986. <https://doi.org/10.4093/dmj.2025.0644>
- Tumilaar, S. G., Hardianto, A., Dohi, H., & Kurnia, D. (2024). A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: Overview, clinical applications, global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of Chemistry*, 2024, Article 5594386. <https://doi.org/10.1155/2024/5594386>
- Tung, Y. T., Chen, Y. L., Fan, T. Y., Fong, T. H., & Chiu, W. C. (2023). Effects of dietary adjustment of n-3:n-6 fatty-acid ratio to 1:2 on anti-inflammatory and insulin-signaling pathways in ovariectomized mice with high fat diet-induced obesity. *Heliyon*, 9(10), e20451. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20451>
- Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., ... & EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA). (2023). Safety of the extension of use of partially defatted chia seed (*Salvia hispanica* L.) powder with a high fibre content as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 21(4), e07904. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7904>

- Ullah, R., Nadeem, M., Khalique, A., Imran, M., Mehmood, S., Javid, A., & Hussain, J. (2016). Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 1750–1758. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1967-0>
- Vega Joubert, M. B., Degrave, V., Ingaramo, P., Oliva, M.E., & D'Alessandro, M. E. (2022b). *Salvia hispanica* L. (chia) seed improves liver inflammation and endothelial dysfunction in an experimental model of metabolic syndrome. *Food & Function*, 13(21), 11249–11261. <https://doi.org/10.1039/d2fo02216h>
- Vega Joubert, M. B., Ingaramo, P., Oliva, M. E., & D'Alessandro, M. E. (2022a). *Salvia hispanica* L. (chia) seed ameliorates liver injury and oxidative stress by modulating Nrf2 and NFκB expression in sucrose-rich diet-fed rats. *Food & Function*, 13(13), 7333–7345. <https://doi.org/10.1039/d2fo00642a>
- Vega Joubert, M. B., Ingaramo, P. I., Collins, P., & D'Alessandro, M. E. (2025b). Astaxanthin improves lipotoxicity, lipid peroxidation and oxidative stress in kidney of sucrose-rich diet-fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 135, 109779. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109779>
- Vega Joubert, M. B., Oliva, M. E., Ingaramo, P., & D'Alessandro, M. E. (2025a). α-Linolenic acid rich-chia seed improves glucose tolerance, modulates gluconeogenic pathway and hepatic insulin signaling in an experimental model of metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 609, 112643. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2025.112643>
- Villamil, F. G., Barbero, M., Massenzio, N. E., Giani, S. M. Kozima, S., Cairo, F. M., Belloni, R. A., Mariani, J., Gazari, M. R., Coisson, P. E., Gallardo, S. C., Cocco, P. A., Riboldi, C. M. & Gallardo, P. E. (2023). Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis in a general population cohort from Argentina. *Annals of Hepatology*. 28(4):101111. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2023.101111>
- Vuksan, V., Jenkins, A. L., Brissette, C., Choleva, L., Jovanovski, E., Gibbs, A. L., Bazinet, R. P., Au-Yeung, F., Zurbau, A., Ho, H.V., Duvnjak, L., Sievenpiper, J. L., Josse, R. G., & Hanna, A. (2017). Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 27(2), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.11.124>

- Vuksan, V., Jenkins, A. L., Dias, A. G., Lee, A. S., Jovanovski, E., Rogovik, A. L., & Hanna, A. (2010). Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(4), 436–438. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.159>
- Vuksan, V., Whitham, D., Sievenpiper, J. L., Jenkins, A. L., Rogovik, A. L., Bazinet, R. P., Vidgen, E., & Hanna, A. (2007). Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care*, 30(11), 2804–2810. <https://doi.org/10.2337/dc07-1144>
- Wan, J., Benkdane, M., Teixeira-Clerc, F., Bonnafous, S., Louvet, A., Lafdil, F., Pecker, F., Tran, A., Gual, P., Mallat, A., Lotersztajn, S., & Pavoine, C. (2014). M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 59(1), 130–142. <https://doi.org/10.1002/hep.26607>
- Wang, X., Che, H., Zhang, W., Wang, J., Ke, T., Cao, R., Meng, S., Li, D., Weiming, O., Chen, J., & Luo, W. (2015). Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *International Journal of Biological Sciences*, 11(10), 1171–1180. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12161>
- Wang, Y., Fleishman, J. S., Li, T., Li, Y., Ren, Z., Chen, J. & Ding, M. (2024). Pharmacological therapy of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease-driven hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Pharmacology*. 14:1336216. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1336216>
- Xu, G. X., Wei, S., Yu, C., Zhao, S. Q., Yang, W. J., Feng, Y. H., Pan, C., Yang, K. X., & Ma, Y. (2023). Activation of Kupffer cells in NAFLD and NASH: mechanisms and therapeutic interventions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1199519. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1199519>
- Yang, J., Félix-Soriano, E., Martínez-Gayo, A., Ibañez-Santos, J., Sáinz, N., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2024). SIRT1 and FOXO1 role on MASLD risk: effects of DHA-rich n-3 PUFA supplementation and exercise in aged obese female mice and in post-

- menopausal overweight/obese women. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 80(3), 697–712. <https://doi.org/10.1007/s13105-024-01044-9>
- Younossi, Z. M., Golabi, P., Paik, J. M., Henry, A., Van Dongen, C. & Henry, L. (2023). The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. 77(4):1335-1347. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000004>
- Younossi, Z. M., Kalligeros, M. & Henry, L. (2025). Epidemiology of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*. 31(Suppl):S32-S50. <https://doi.org/10.3350/cmh.2024.0431>
- Yu, X., Deng, Q., Tang, Y., Xiao, L., Liu, L., Yao, P., Tang, H., & Dong, X. (2018). Flaxseed Oil Attenuates Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice by Rescuing the Adaption to ER Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10729–10740. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03906>
- Yuan, H., Jung, E. S., Chae, S. W., Jung, S. J., Daily, J. W., & Park, S. (2024). Biomarkers for Health Functional Foods in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disorder (MASLD) Prevention: An Integrative Analysis of Network Pharmacology, Gut Microbiota, and Multi-Omics. *Nutrients*, 16(18), 3061. <https://doi.org/10.3390/nu16183061>
- Zare, T., Fournier-Level, A., Ebert, B., & Roessner, U. (2024). Chia (*Salvia hispanica* L.), a functional 'superfood': new insights into its botanical, genetic and nutraceutical characteristics. *Annals of Botany*, 134(5), 725–746. <https://doi.org/10.1093/aob/mcae123>
- Zhang, W., Patil, S., Chauhan, B., Guo, S., Powell, D. R., Le, J., Klotsas, A., Matika, R., Xiao, X., Franks, R., Heidenreich, K. A., Sajan, M. P., Farese, R. V., Stolz, D. B., Tso, P., Koo, S. H., Montminy, M., & Unterman, T. G. (2006). FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 10105–10117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600272200>
- Zheng, H., Sechi, L. A., Navarese, E. P., Casu, G. & Vidili, G. (2024). Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and cardiovascular risk: a comprehensive review. *Cardiovascular Diabetology*. 23(1):346. <https://doi.org/10.1186/s12933-024-02434-5>

- Zheng, L., Zeng, A., Liu, L., Tian, W., Wang, R., Zhang, L., Hua, H. & Zhao, J. (2025). Metabolic syndrome: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Molecular Biomedicine*. 6(1):59. <https://doi.org/10.1186/s43556-025-00303-5>
- Zhou, J., Zheng, Q., & Chen, Z. (2022). The Nrf2 Pathway in Liver Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 826204. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826204>
- Zhou, X. D., Targher, G., Byrne, C. D., Somers, V., Kim, S. U., Chahal, C. A. A., Wong, V. W., Cai, J., Shapiro, M. D., Eslam, M., Steg, P. G., Sung, K. C., Misra, A., Li, J. J., Brotons, C., Huang, Y., Papatheodoridis, G. V., Sun, A., Yilmaz, Y... Zheng, M.H. (2023). An international multidisciplinary consensus statement on MAFLD and the risk of CVD. *Hepatology International*. 17(4):773-791. <https://doi.org/10.1007/s12072-023-10543-8>.