



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la Chía (*Salvia hispanica L.*)  
sobre las características estructurales y funcionales de las lipoproteínas (HDL y LDL)  
en sujetos con hígado graso no alcohólico y resistencia a la insulina

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QA. Angel René López Uribe

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Nimbe Torres y Torres

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
"Salvador Zubirán"

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química, UNAM

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñóz

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México, Octubre 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Jurado asignado**

**Presidente:** Dr. Jaime Mas Oliva  
**Secretario:** Dra. Verónica Guarner Lans  
**Vocal:** Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta  
**Vocal:** Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas  
**Vocal:** Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Sitio donde se desarrolló el tema:

Este trabajo fue realizado en colaboración y bajo el asesoramiento de la M. en C. Aída Xochitl Medina Urrutia en el departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y en el departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional en Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” bajo el asesoramiento de la Dra. Nimbe Torres y Torres

Dicho proyecto fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de propuesta SALUD-16-01-272502 de la convocatoria Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social así como también fondos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

ASESOR DEL TEMA:

\_\_\_\_\_  
Dra. Nimbe Torres y Torres

SUSTENTANTE:

\_\_\_\_\_  
QA. Angel René López Uribe

## INDICE GENERAL

	página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	4
RESUMEN .....	5
ABREVIATURAS .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
<b>1. Lipoproteínas</b> .....	<b>7</b>
✓ Definición, estructura y función.....	7
<b>2. Lipoproteínas de baja densidad</b> .....	<b>10</b>
✓ Estructura, característica y función.....	10
✓ Susceptibilidad a la oxidación de la LDL.....	11
✓ Protección a la oxidación de la LDL.....	12
<b>3. Lipoproteínas de alta densidad</b> .....	<b>13</b>
✓ Estructura y características.....	13
✓ Subpoblaciones de las HDL.....	13
✓ Funciones de las HDL.....	14
✓ Actividad antioxidante.....	14
✓ Transporte reverso del colesterol.....	15
✓ Eflujo de colesterol.....	16
<b>4. Obesidad y sus complicaciones metabólicas</b> .....	<b>18</b>
✓ Resistencia a la insulina.....	18
✓ Dislipidemia.....	19
<b>5. Hígado graso</b> .....	<b>19</b>
✓ Definición.....	19
✓ Diagnóstico.....	20
✓ Tratamiento.....	21
✓ Ácido graso $\alpha$ -linolénico.....	21
✓ Microbiota intestinal.....	22
<b>6. Semilla de chía</b> .....	<b>23</b>
JUSTIFICACIÓN .....	25
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	26
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVO GENERAL .....	27
Primarios .....	27
Secundarios .....	28
METODOLOGÍA .....	29
I. Intervención.....	29
II. Métodos clínicos.....	30
III. Análisis de laboratorio.....	31
IV. Estudio de tomografía computarizada.....	32
V. Caracterización de las lipoproteínas.....	33
VI. Perfil de ácidos grasos.....	36
VII. Microbiota intestinal.....	36
VIII. Análisis estadístico.....	37

**INDICE GENERAL**  
**(Continuación)**

	página
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
I. Consumo de nutrimentos de los participantes durante el protocolo y perfil de ácidos grasos mayoritarios contenidos en la semilla de chía.....	38
II. Características antropométricas, lipídicas y bioquímicas de los participantes incluidos en el estudio.....	40
III. Evolución y área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa oral.....	42
IV. Determinación de depósitos de grasa abdominal y hepática por medio de tomografía axial computada.....	44
V. Evaluación de la capacidad antioxidante total y algunos marcadores de estrés oxidante en suero en población general y estratificada por género.....	45
VI. Evaluación de la funcionalidad de las partículas de alta y baja densidad en población general y estratificada por género.....	46
VII. Perfil de los ácidos grasos en plasma y en las partículas HDL y LDL en población total y estratificado por género.....	48
VIII. Microbiota intestinal antes y después de la suplementación con semilla de chía molida estratificado por género.....	50
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>LIMITACIONES Y FORTALEZAS</b> .....	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>74</b>
✓ Consentimiento informado.....	74
✓ Hoja de asistencia.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Componentes estructurales de las lipoproteínas.....	7
Figura 2. Relación entre su tamaño relativo y densidad de las lipoproteínas.....	9
Figura 3. Distribución en porcentaje de la composición de los ácidos grasos mayoritarios en la semilla de chía empleada en el protocolo.....	39
Figura 4. Prueba de tolerancia a la glucosa oral antes y después de la suplementación con chía en población general.....	42
Figura 5. Prueba de tolerancia a la glucosa oral antes y después de la suplementación con chía estratificada por género.....	43
Figura 6. Análisis de la microbiota intestinal a nivel de especie antes y después de la suplementación con chía estratificado por género.....	51
Figura 7. Diez principales especies cambiantes en la microbiota antes y después de la suplementación con chía estratificado por género.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Clasificación de las lipoproteínas.....	8
Tabla 2. Distribución del consumo de nutrientes en los participantes.....	38
Tabla 3. Características antropométricas antes y después de la suplementación con chía en población general y estratificado por género.....	40
Tabla 4. Parámetros lipídicos antes y después de la suplementación con chía en población general y estratificado por género.....	41
Tabla 5. Parámetros bioquímicos de función renal y hepática antes y después de la suplementación con chía en población general y estratificado por género...	41
Tabla 6. Medidas de adiposidad abdominal y hepática antes y después de la suplementación con chía en la población estudiada y estratificada por género.....	44
Tabla 7. Marcadores de estrés oxidante e inflamación antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.....	45
Tabla 8. Caracterización estructural y funcional de las partículas de alta densidad antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.....	47
Tabla 9. Caracterización estructural y funcional de las partículas de baja densidad antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.....	47
Tabla 10. Perfil de ácidos grasos en plasma y en las partículas de alta y baja densidad antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.....	49

## RESUMEN

**Antecedentes:** El hígado graso no alcohólico es la enfermedad hepática más común en países del occidente y su prevalencia en nuestra población es del 30%. Sin embargo, no existe hasta la fecha un tratamiento definido para disminuir la acumulación de grasa hepática. Se han propuesto diferentes tipos de estrategias dietéticas para su control como es el consumo de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 (AGP  $\omega$ -3). La semilla de chía (*Salvia hispánica* L.) es rica en antioxidantes y AGP  $\omega$ -3, principalmente el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA).

**Objetivo:** Determinar en un ensayo clínico de un solo grupo si la suplementación con 25 gramos de chía molida por 8 semanas, modifica el perfil de los ácidos grasos (AG) en las partículas de baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL) y si el enriquecimiento se asocia con cambios en la estructura y función de las lipoproteínas.

**Resultados:** Se evaluó el perfil lipídico, bioquímico y funcional de las partículas LDL y HDL, mediante la actividad paraoxonasa, la susceptibilidad a la oxidación y el eflujo de colesterol, en 19 sujetos (8 mujeres y 11 hombres) con edad promedio de  $58 \pm 8$  años e índice de masa corporal (IMC) de  $30.7 \pm 3.8$  kg/m<sup>2</sup>. En comparación entre la visita antes y después de la suplementación, los participantes se caracterizaron por presentar reducción de peso, IMC, circunferencia de cintura, concentración de triglicéridos (TG) y malondialdehído, grasa abdominal total (GAT), visceral y hepática. En los hombres, la concentración de adiponectina incrementó 15.54%. Respecto a la caracterización de las partículas HDL, incrementó la subpoblación HDL<sub>2a</sub> y disminuyó el eflujo de colesterol en población total. En las mujeres se observó enriquecimiento de las subpoblaciones HDL<sub>2a-b</sub> y aumento en el tamaño promedio estimado de las partículas HDL. Además, el perfil de AG se observó incremento de la concentración de los AGP  $\omega$ -3 de 45.09% considerando la suma del ALA, el ácido eicosapentaenóico y el ácido docosahexanoico, del cual 86.45% fue del ALA en el plasma. En las partículas aisladas, las HDL fueron preferentemente más enriquecidas de ALA que las LDL, 147.54% y 125.81%, respectivamente. Por último, al caracterizar la microbiota intestinal, en los hombres se observó incremento de *Oxalobacter formigenes*, *Bacteroides coprophilus* y *Bifidobacterium bifidum* pero disminución de *Ruminococcus callidus*, *Bacteroides plebeius* y *Bifidobacterium longum*. Por otro lado, en las mujeres disminuyó *Oxalobacter formigenes*, *Ruminococcus callidus*, *Bacteroides eggerthii* y *Bifidobacterium longum* pero incremento de *Clostridium citroniae*, *Bacteroides plebeius* y *Bacteroides fragilis*.

**Conclusiones.** Los resultados del presente trabajo muestran que la incorporación de la semilla de chía molida a la dieta, disminuye la acumulación de grasa abdominal y hepática, mejora las anormalidades cardiometabólicas y cambia la composición de la microbiota intestinal.

## ABREVIATURAS

<sup>3</sup> H-Colesterol	Colesterol tritiado
ABCA1	Cassette de unión a adenosin trinucleótido fosfato 1
AG	Ácidos grasos
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AL	Ácido graso linoléico
ALA	Ácido graso $\alpha$ -Linolénico
ALT	Alanino aminotransferasa
Apo A1	Apolipoproteína A1
Apo B	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferasa
C-HDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
C-LDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
DHA	Ácido graso docosahexaenoico
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPA	Ácido graso docosapentaenoico
EDTA	Ácido dietien-diamino tetraacético
EPA	Ácido graso eicosapentaenoico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FA	Fosfatasa alcalina
GAS	Grasa abdominal subcutánea
GAT	Grasa abdominal total
GAV	Grasa abdominal visceral
GGT	Gamma-glutamyl-transpeptidasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HOMA-RI	Modelo homeostático para estimar resistencia a la insulina
IAH:B	Índice de atenuación hígado/bazo
IDL	Lipoproteínas de intermedia densidad
IMC	Índice de masa corporal
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MDM	Medio mínimo esencial
mg/dL	Miligramos por decilitro
PON1	Paraoxonasa 1
QM	Quilomacrón
RI	Resistencia a la insulina
SRB1	Receptor basurero tipo B1
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

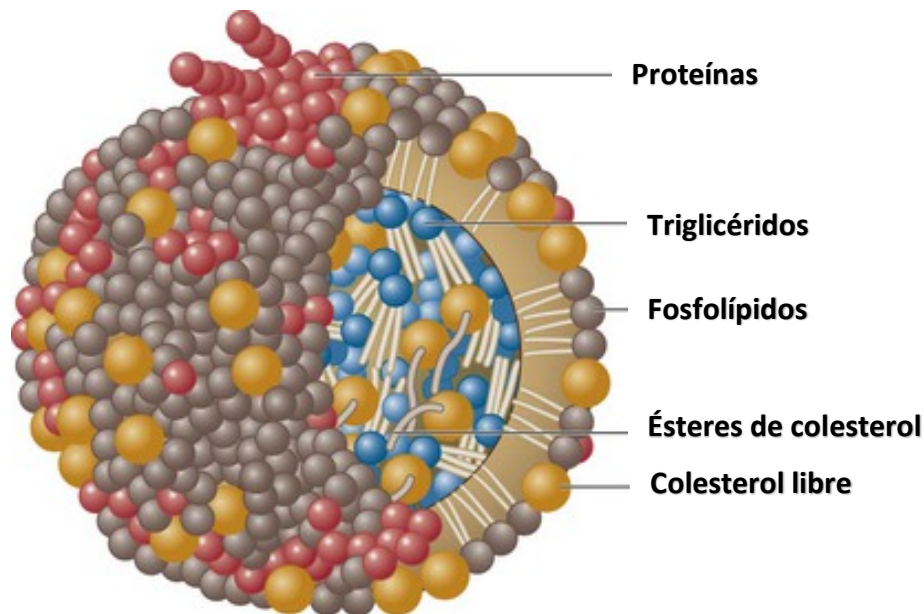


## INTRODUCCIÓN

### 1. Lipoproteínas

#### Definición, estructura y función

Las lipoproteínas son complejos de lípidos y proteínas específicas, que se denominan apolipoproteínas (Apo), que tienen como función el transporte de lípidos en un medio acuoso como es la sangre. Las Apo son proteínas anfipáticas que se encuentran sobre la superficie de las partículas de las lipoproteínas que ayudan a estabilizar la estructura lipoproteica. Estas desempeñan participación en el metabolismo de las lipoproteínas como ligandos a receptores, cofactores enzimáticos y acarreadores en el transporte de lípidos. La apolipoproteína B (Apo B) es una proteína asociada con partículas LDL, y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), mientras que la apolipoproteína AI (Apo AI) es el mayor componente proteico de las HDL (Yokoyama *et al.*, 2006).



**Figura 1. Componentes estructurales de las lipoproteínas.** Tomado y modificado de Ridker (2014).

Los principales lípidos transportados por las lipoproteínas incluyen como elementos mayoritarios: colesterol libre, colesterol esterificado, TG y fosfolípidos. En el estudio de la estructura de las lipoproteínas se suelen distinguir dos partes: núcleo y superficie. En el núcleo se encuentran los lípidos más hidrófobos (ésteres de colesterol y TG), mientras que en la superficie, el colesterol libre y los dominios más polares de los fosfolípidos y de las Apo's (Figura 1) (Ridker 2014).

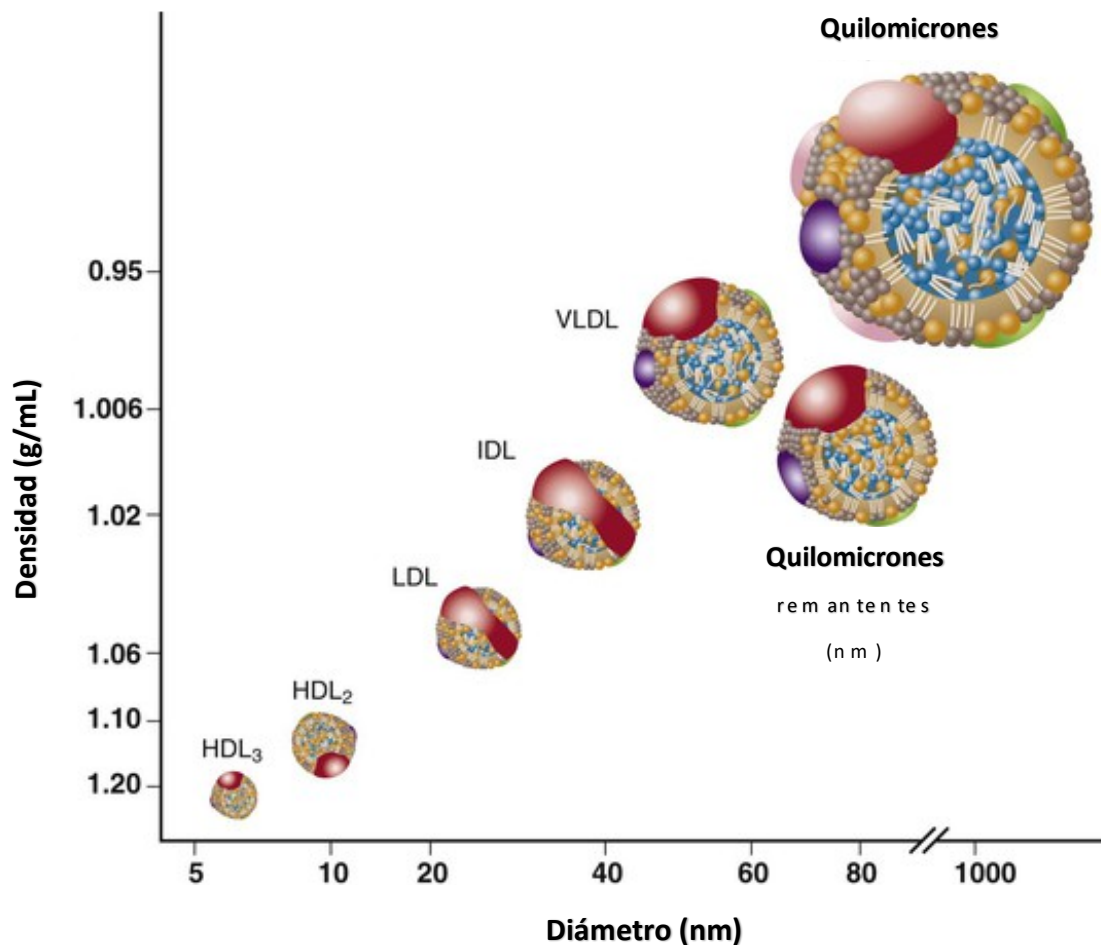
**Tabla 1. Clasificación de las lipoproteínas.**

Nombre	Densidad	Diámetro	Proteína	Colesterol	Fosfolípidos	Triglicéridos	Ácidos grasos libres
	(g/mL)	(nm)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>QM</b>	< 0.950	100-1000	< 2	4-8	7-8	84-88	0
<b>VLDL</b>	0.095-1.006	30-80	7-10	20-25	18-20	50-55	1
<b>IDL</b>	1.006-1.019	25-50	10-18	29-45	22-27	25-31	1
<b>LDL</b>	1.019-1.063	18-28	20-25	45-58	20-28	10-15	1
<b>HDL</b>	1.063-1.210	5-15	33-57	17-40	26-46	3-15	0-6

Abreviaciones: QM; Quilomicrón, VLDL; Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL; Lipoproteínas de intermedia densidad, LDL; Lipoproteínas de baja densidad, HDL; Lipoproteínas de alta densidad, Colesterol = Colesterol libre + ésteres de colesterol.

Las lipoproteínas se pueden clasificar en función de su densidad, ya que con base en este criterio pueden ser aisladas por ultracentrifugación secuencial. Este método separativo permite después determinar su contenido apolipoproteico y lipídico. La densidad de las diferentes lipoproteínas está condicionada en parte por su tamaño y por su relación lípido-proteína. Así, las lipoproteínas menos densas son las más grandes y con mayor contenido en lípidos. De mayor a menor tamaño tenemos; quilomicrones, VLDL, lipoproteínas de intermedia densidad (IDL), LDL y HDL (Tabla 1 y Figura 2). (Ricker 2014).

Sin embargo, es importante tener presente que se han definido diferentes tamaños y densidades de diferentes subtipos de VLDL, LDL y HDL y, por tanto, cada clase de lipoproteína está constituida a su vez por diferentes subpoblaciones de partículas con un interés clínico aún por definir. Los dos últimos subtipos son el tema principal del presente trabajo.



**Figura 2. Relación entre su tamaño relativo y densidad de las lipoproteínas.** Abreviaciones: VLDL; Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL; Lipoproteínas de intermedia densidad, LDL; Lipoproteínas de baja densidad, HDL; Lipoproteínas de alta densidad. Tomado y modificado de Ridker (2014).

## 2. Lipoproteínas de baja densidad

### Estructura, característica y función

Las LDL son partículas esféricas con diámetro de 21.8 a 27 nm, densidad entre 1.019 y 1.063 g/mL. Es la lipoproteína con mayor contenido de colesterol y cantidades considerables de tocoferoles, carotenoides y otros antioxidantes lipofílicos. Su superficie está compuesta por colesterol libre y fosfolípidos (predominantemente fosfatidilcolina y esfingomielina). Del contenido total de AG, aproximadamente el 50% son poliinsaturados, principalmente de ácido graso linoléico (AL) (Scheffer *et al.*, 2003). En la capa externa de la molécula se encuentra una sola apolipoproteína (Apo B-100). La Apo B-100 es una proteína constituida por 4536 aminoácidos y un peso molecular de 512 kDa, la cual desempeña una participación importante como ligando para las LDL y su receptor (Segrest *et al.*, 2001).

La función fisiológica de las LDL es transportar aproximadamente del 65% al 70% del colesterol hacia los tejidos periféricos y su vida media es de 2.5 a 3.5 días. Las LDL migran a través de la barrera endotelial para llevar a cabo el transporte de colesterol del torrente sanguíneo hacia los tejidos periféricos (Hevonoja *et al.*, 2000). El exceso de LDL circulantes, la presencia de LDL pequeñas y densas, el mayor tiempo de residencia de estas partículas en el compartimento intravascular, así como, su mayor penetración al espacio subendotelial, favorece la modificación química (oxidación, glicación y agregación) de sus componentes lipídicos y proteicos (Steinberg *et al.*, 1989).

## Susceptibilidad a la oxidación de la LDL

La susceptibilidad a la oxidación de las LDL depende de la proporción de los AGP y de los antioxidantes presentes en la partícula. También del grado de glicosilación, así como, de la concentración, duración y condiciones de exposición de los oxidantes presentes (radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo y peroxinitrito) y metales en el medio (Steinberg *et al.*, 1989; Jessup & Kritharides *et al.*, 2001; Scheffer *et al.*, 2003). Cuando los sistemas oxidante-antioxidante del organismo no se encuentran en equilibrio, se genera estrés oxidativo capaz de producir lipoperoxidación y la oxidación confiere citotoxicidad y aterogenicidad a la partícula LDL (Steinberg *et al.*, 1989; Witztum & Steinberg, 1991).

La lipoperoxidación es iniciada por el ataque de los radicales libres a las dobles ligaduras de los AGP; al perder un hidrógeno, ocurre un reordenamiento molecular y se originan dienos conjugados, los cuales reaccionan rápidamente con oxígeno molecular para formar lípidos hidroperoxidados. El proceso de ataque y daño oxidativo que sufren los lípidos insaturados se debe a reacciones en cadena mediadas por radicales libres, iniciadas por la abstracción de un átomo de hidrógeno del lípido insaturado por el radical libre peroxilo y seguido por una secuencia de reacciones propagadoras. Los lípidos hidroperoxidados se fragmentan a aldehídos de cadena corta, como el malondialdehído (Young & McEneny *et al.*, 2001). La mayoría de los estudios clínicos han demostrado mayor susceptibilidad a la oxidación de las LDL en condiciones como la hipercolesterolemia (Utarwuthipong *et al.*, 2009) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Scheffer *et al.*, 2003).

## Protección a la oxidación de la LDL

Anteriormente se mencionó que la capacidad para resistir la modificación oxidativa depende, entre otros factores, de la cantidad de antioxidantes presentes en las LDL. Los antioxidantes asociados a las lipoproteínas incluye la vitamina E, carotenoides, ubiquinol-10 y polifenoles (Aviram, 2000).

La vitamina E se encuentra estructuralmente incorporada en las LDL y actúa como un antioxidante intrínseco que impide la transferencia de electrones involucrada en el inicio y propagación de la lipoperoxidación, previniendo así la modificación de las LDL. Además, en circulación se encuentran entre otros antioxidantes como la albúmina, bilirrubina y vitamina C (Hevonoja *et al.*, 2000). La vitamina C es capaz de reaccionar y reducir las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (hidroperóxido, superóxido, radical hidroxilo, peroxinitrito, ozono y dióxido de nitrógeno) y de regenerar a la vitamina E (Hevonoja *et al.*, 2000).

Se considera que la oxidación de las LDL contribuye al inicio y progresión de la aterosclerosis. Las HDL protegen los lípidos y proteínas de las LDL contra la oxidación (Navab *et al.*, 2004). Las propiedades antioxidantes de las HDL se atribuyen principalmente a la paraoxonasa 1 (PON1), enzima que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos oxidados activos y destruye lipoperóxidos (Mackness *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 2008). La PON1 también inhibe la oxidación de las HDL, lo cual es relevante porque las HDL oxidadas pierden sus características ateroprotectoras (Ansell *et al.*, 2007).

### 3. Lipoproteínas de alta densidad

#### Estructura y características

Las partículas HDL son un grupo altamente heterogéneo y constituyen la fracción lipoproteica más densa del plasma. Su composición proteica es muy diversa; sin embargo, las moléculas más abundantes son la Apo AI y la Apo AII. La primera constituye hasta un 70% de la fracción proteica mientras que la segunda representa alrededor de un 15%. El porcentaje restante está compuesto principalmente por enzimas y otras apolipoproteínas menos abundantes (Davidson & Thompson, 2007; Florentin *et al.*, 2008; Rye *et al.*, 2009). En algunos estudios *in vitro* se ha demostrado que la diversidad en composición, estructura y densidad refleja diferencias en la función llevada a cabo por cada subpoblación. En un esfuerzo por develar si las poblaciones de las HDL podrían predecir mejor el riesgo cardiovascular, se han desarrollado diversas técnicas para fraccionarlas.

#### Subpoblaciones de las HDL

Empleando el método “ultracentrifugación secuencial”, se pueden distinguir dos subpoblaciones mayoritarias; las HDL<sub>2</sub> (densidad entre 1.063 – 1.125 g/mL) y las HDL<sub>3</sub> (densidad entre 1.125 – 1.210 g/mL). Si se realiza un fraccionamiento sucesivo mediante gel en gradiente de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (Rosenson *et al.*, 2011), distinguiremos de mayor a menor diámetro en promedio cinco grupos: HDL<sub>2b</sub> (10.6nm), HDL<sub>2a</sub> (9.2nm), HDL<sub>3a</sub> (8.4nm), HDL<sub>3b</sub> (8.0nm) y HDL<sub>3c</sub> (7.6nm) (Skinner, 1994).

Las subpoblaciones HDL<sub>2</sub> que son grandes, de baja densidad y ricas en lípidos son más eficaces inhibiendo la agregación plaquetaria y tienen una potente actividad vasodilatadora. Por su parte, las subpoblaciones HDL<sub>3</sub> que son pequeñas, densas y ricas en proteínas, son mejores mediadoras del transporte reverso del colesterol, cumplen importantes funciones antioxidantes, antiinflamatorias e inhiben mejor la actividad plaquetaria (Camont *et al.*, 2011). Sin embargo, las asociaciones clínicas son poco consistentes y el papel de las subpoblaciones de las partículas HDL en el campo clínico sigue siendo controversial (Posadas-Romero *et al.*, 2008; Rosenbaum *et al.*, 2012, Superko *et al.*, 2012).

#### Funciones de las HDL

Diversos estudios epidemiológicos, modelos animales e *in vitro* han mostrado evidencia de que las HDL tienen funciones antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas y su principal participación en el proceso del transporte reverso del colesterol (Florentin *et al.*, 2008). A continuación, se tratan con mayor detalle dos de las funciones antiaterogénicas mejor conocidas de las HDL: la protección de la modificación oxidativa de las lipoproteínas y el transporte reverso del colesterol.

#### Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las HDL está mediada principalmente por la inhibición de la oxidación de las LDL (Navab *et al.*, 2004). La acumulación de las LDL oxidadas se considera el mayor factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis. A través de diversos estudios se ha demostrado que tanto la Apo AI, como la Apo AII, las proteínas más abundantes en la



estructura de las HDL, reducen los hidroperóxidos lipídicos presentes en las LDL oxidadas, por medio de la oxidación de puentes disulfuro presentes en su estructura y en consecuencia reduciendo la lipotoxicidad (Ribas *et al.*, 2004). Otro mecanismo por el cual las HDL llevan a cabo funciones antioxidantes es mediado por las enzimas presentes en su estructura, y la PON1 es su principal enzima antioxidante.

La PON1 es una proteína de 2354 aminoácidos con una masa molecular de 43 kDa, sintetizada en el hígado de donde una porción es secretada al plasma (Primo-Parmo *et al.*, 1996). En circulación se encuentra asociada casi exclusivamente a las partículas HDL (Sorenson *et al.*, 1999). La actividad PON1 consiste en hidrolizar AG oxidados dando como resultado disminución de estos compuestos en las partículas de LDL (Precourt *et al.*, 2011) y está regulada tanto por factores genéticos como ambientales. Los factores ambientales incluyen el consumo de tabaco, alcohol y AG (Durrington *et al.*, 2002). Además, las concentraciones en plasma de colesterol total y el colesterol contenido en las HDL (C-HDL) también contribuyen en la modulación de PON1 (Ferré *et al.*, 2003). Se han reportado valores bajos de la actividad PON1 en enfermedades como la hipercolesterolemia familiar (Mackness *et al.*, 1991) y la DM2 (Abbott *et al.*, 1995).

### Transporte reverso del colesterol

El transporte reverso del colesterol hace referencia al proceso mediante el cual el colesterol captado por las HDL de las células periféricas, llega al hígado y es eliminado por las vías biliares. En los seres humanos esta captación hepática se realiza fundamentalmente a nivel de VLDL, lipoproteínas residuales tipo IDL, y LDL. El proceso por el cual los ésteres de colesterol pasan de las HDL al grupo de lipoproteínas que contienen apo B (QM, VLDL, IDL

y LDL) está mediado por la acción de la proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETP). El sistema está dividido en tres procesos: el eflujo de colesterol de las células al plasma, la esterificación del colesterol y el destino metabólico de los ésteres de colesterol formados.

### Eflujo de colesterol

Existen dos teorías sobre cómo se produce el eflujo de colesterol hacia las HDL. Una primera teoría propone que se trata de un proceso de difusión acuosa en el cual el colesterol no esterificado pasa de las membranas celulares a aceptores moleculares como vesículas de fosfolípidos sin proteínas, ciclodextrinas sintéticas, albúmina y HDL parcialmente hidrolizadas. Este proceso es lento, receptor-independiente, no saturable y tiene poco efecto sobre los depósitos de colesterol esterificado intracelulares (Rothblat *et al.*, 1999). Este proceso puede ser bidireccional y la esterificación del colesterol por la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) prevendría la redifusión del colesterol desde las HDL hacia la membrana plasmática, aumentando así el eflujo neto de colesterol (Czarnecka & Yokoyama, 1996).

La expresión del receptor pepenador clase B tipo 1 (SRB1) incrementa este eflujo de colesterol, facilitando la difusión de la membrana a los aceptores plasmáticos. Sin embargo, este eflujo no refleja simplemente la unión de la HDL a la membrana, ya que el CD-36, que es otro receptor pepenador, también une HDL pero no aumenta el eflujo. Por tanto, se sugiere que la unión de HDL al SRB1 facilita el flujo bidireccional pasivo entre las HDL y la membrana plasmática gracias a reorganizaciones de lípidos en los dominios ricos en colesterol y las caveolas en la membrana plasmática (De la Llera-Moya *et al.*, 1999).

Una segunda teoría, propone que el eflujo de colesterol es receptor-dependiente y se ha descrito como un mecanismo de transporte rápido, específico, unidireccional, saturable, independiente de acción de la LCAT y que es eficiente reduciendo los depósitos de ésteres de colesterol del citosol celular. Este eflujo de colesterol y fosfolípidos requiere de aceptores específicos como apolipoproteínas (Apo AI, Apo AII, Apo IV, Apo E y Apo C's) pero especialmente a una fracción minoritaria de las HDL, las pre $\beta$ -HDL. Sin embargo, este tipo de partículas contienen solo Apo AI, y suponen sólo el 5% del total de las HDL (Von Eckardstein *et al.*, 2001).

El eflujo específico implica interacciones con proteínas de la membrana plasmática, con generación de señales intracelulares que provocan la translocación de colesterol del retículo endoplásmico, Golgi o endosomas hacia la membrana plasmática. Se ha descrito que las HDL y la Apo AI son internalizadas por macrófagos en el compartimiento endosomal desde donde son resecretadas juntamente con lípidos. La contribución de la expresión del transportador de membrana dependiente de ATP (adenosín trinucleótido fosfato) tipo 1 (ABCA1) en macrófagos en el colesterol de HDL es muy bajo y al parecer la contribución mayor proviene de la expresión de ABCA1 en hepatocitos (Haghpasand *et al.*, 2001). Actualmente se acepta que los dos tipos de procesos pueden coexistir, y que en algunos tipos celulares el eflujo de colesterol se llevaría a cabo utilizando los sistemas, mientras que en otros uno de los sistemas de eflujo sería mayoritario.

#### 4. Obesidad y sus complicaciones metabólicas

La prevalencia mundial de la obesidad y sus complicaciones metabólicas han incrementado en las recientes décadas. La obesidad también se ha asociado con incremento en la prevalencia del hígado graso no alcohólico (HGNA). Entre los países de América: Estados Unidos, Belice y México, tienen una alta prevalencia de obesidad e HGNA (López-Velázquez *et al.*, 2014).

La obesidad, principalmente la abdominal, es uno de los principales y predominantes factores de riesgo del síndrome metabólico (Carr *et al.*, 2004, Fabbrini *et al.*, 2010). El exceso del tejido adiposo y la disfunción del adipocito resulta en una desregulación de secreción de diversas adipocinas, como adiponectina, la cual puede regular acciones y modular el metabolismo de la glucosa y lípidos, a través de la oxidación de los AG e incrementando la sensibilidad a la insulina en hígado y músculo (Hauner, 2005; Kadowaki *et al.*, 2006; Halberg *et al.*, 2008). En adición, el exceso en la acumulación de grasa promueve la liberación de AG libres hacia la circulación provenientes de los adipocitos, los cuales pueden ser un factor crítico en la modulación de la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la concentración de los AG libres no incrementa en proporción a la cantidad de grasa corporal (Boden, 2008).

##### Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) es un factor adicional del síndrome metabólico y es el principal predictor en el desarrollo de DM2 (Jung & Choi, 2014). La RI es definida como la disminución en la capacidad de los tejidos para responder a la acción de la insulina. El tejido adiposo es uno de los tejidos respondedores a la insulina, y la insulina estimula el

almacenamiento de TG en el tejido adiposo por múltiples mecanismos, incluyendo la promoción de la diferenciación de preadipocito a adipocito, incrementando la captación de glucosa y los AG liberados por las lipoproteínas, así como la lipogénesis e inhibición de la lipólisis en los adipocitos maduros (Mirza, 2011).

### Dislipidemia

La dislipidemia es una alteración en la cantidad de lípidos circulantes en sangre, como colesterol y TG, y es ampliamente aceptado que es un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular. La dislipidemia relacionada a la obesidad es caracterizada por concentraciones elevadas en plasma de AG libres y TG, disminución del C-HDL y composición anormal de las partículas LDL. El factor principal que contribuye a presentar dislipidemia en la obesidad es el descontrol en la liberación de los AG del tejido adiposo, específicamente la grasa abdominal visceral (GAV) (Klop *et al.*, 2013).

## **5. Hígado graso**

### Definición

El HGNA se caracteriza por la acumulación de TG en una cantidad mayor al 5% del peso total del hígado en ausencia del consumo excesivo de alcohol (20 g de etanol/día) y del uso de medicamentos hepatotóxicos (Stefan *et al.*, 2008). La teoría clásica en el desarrollo y progresión del HGNA comprende dos etapas: la primera consiste en el acúmulo de lípidos y la segunda, caracterizada por la presencia de inflamación debida al incremento del estrés oxidativo y peroxidación lipídica (Day & James, 1998).

## Diagnóstico

El estándar de oro para el diagnóstico de HG es la biopsia hepática. Sin embargo, por tratarse de un método invasivo no se puede realizar sin que exista un motivo clínico sólido. En la actualidad existen técnicas de imagen que permiten evaluar la presencia de grasa en el tejido hepático (Chalanasi *et al.*, 2012).

El ultrasonido es la técnica más utilizada y económica, permite detectar esteatosis moderada y severa, es decir, cuando la grasa hepática excede el 30%. La sensibilidad y especificidad del método es de 73.3-90.5% y 69.6-85.2%, respectivamente (Ma *et al.*, 2009; Bohte *et al.*, 2011). La tomografía axial computarizada (TAC) es un método cuantitativo validado para evaluar y cuantificar: 1) la calcificación arterial coronaria, 2) la GAT, subcutánea y GAV (Kvist *et al.*, 1988) y 3) la atenuación del tejido hepático (Ma *et al.*, 2009) y se expresa en unidades Hounsfield. Se considera HG cuando el cálculo del índice de atenuación hígado/bazo (IAH:B) es  $< 1.0$  (McKimmie *et al.*, 2008). La TAC permite detectar HG cuando la grasa hepática excede el 30%, con sensibilidad de 46.1-72.0% y especificidad del 88.1-94.6% (Bohte *et al.*, 2011). Una ventaja que tiene la técnica es el empleo del bazo como referencia y que, la atenuación hepática reportada es el promedio en unidades Hounsfield de la medición de varias regiones del tejido hepático.

La resonancia magnética es probablemente el método más certero y rápido para medir grasa hepática. Sin embargo, es costoso. Permite diagnosticar HG cuando el contenido de grasa es  $\geq 5.56\%$  (Szczepaniak *et al.*, 2005); la sensibilidad y especificidad de este método son 72.7-88.5% y 92.0-95.7%, respectivamente (Bohte *et al.*, 2011).

## Tratamiento

Los cambios en el estilo de vida son la primera opción como tratamiento para el HGNA y la disminución de peso corporal es el principal objetivo para la mayoría de los pacientes con HGNA. Sin embargo, algunas modificaciones dietéticas pueden tener una participación significativa en el tratamiento para el HGNA, independientemente de la pérdida de peso (Ueno *et al.*, 1997).

Se ha reportado que los AGP  $\omega$ -3 disminuyen la concentración de TG plasmáticos, regulan la síntesis de los AG y el metabolismo de TG y además tienen propiedades antiinflamatorias. Estas propiedades en conjunto pueden ser de utilidad en el tratamiento de HGNA (Scorletti & Byrne, 2013; Calder, 2014). Diversos estudios reportan que un exceso en la ingesta de hidratos de carbono simples, grasa saturada y proteína de origen animal y bajo consumo de AGP  $\omega$ -3 y micronutrientes se relacionan con la formación de HGNA (Cortez-Pinto *et al.*, 2006; Zelber-Sagi *et al.*, 2007; Volynets *et al.*, 2012; González-Salazar *et al.*, 2014). Además, Cortez-Pinto y colaboradores reportaron que los sujetos con HGNA presentan una elevada ingesta de AGP  $\omega$ -6 y en consecuencia una mayor relación en el consumo de AGP  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (Cortez-Pinto *et al.*, 2006).

## Ácido graso $\alpha$ -linolénico

El ALA es el precursor de los AGP de cadena larga. Este es un ácido graso esencial puesto que no puede ser sintetizado en animales incluyendo a los humanos (Adkins & Kelley, 2010). De la misma manera, el AL es un AGP  $\omega$ -6 esencial. Ambos tienen que ser adquiridos a través de la dieta, se sintetizan en plantas y consecuentemente se encuentran en semillas,

nueces y aceites de semillas. Son la fuente para poder llevar a cabo la conversión de otros AGP  $\omega$ -3 como es el ácido graso eicosapentaenoico (EPA), el docosapentaenoico (DPA) y el docosahexaenoico (DHA). Sin embargo, la conversión específicamente de este último es baja y se sabe que es menor en los hombres que en las mujeres (Welch *et al.*, 2010).

El proceso de conversión de ALA a EPA involucra desaturación, elongación y otra desaturación usando delta-6-desaturasa, elongasa y delta-5-desaturasa, respectivamente (Calder, 2014). Estas mismas enzimas son usadas en la conversión de los AG de la familia  $\omega$ -6 a partir del AL para obtener como producto final el ácido graso araquidónico. A pesar de presentar una mayor afinidad la delta-6-desaturasa por el ALA que por el AL, la familia  $\omega$ -6 muestra mayor velocidad de conversión debido a las altas cantidades del AL a nivel celular (Burdge & Calder, 2006). Por lo que, la elevada ingesta de AGP  $\omega$ -6 en dietas occidentales da como resultado una baja conversión del ALA hacia AGP  $\omega$ -3 (Burdge & Calder, 2006). Además, se ha reportado que una relación baja de AGP  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (5 o menos) en la dieta es considerado saludable para contrarrestar las enfermedades cardiovasculares, cáncer, inflamación y enfermedades autoinmunes.

### Microbiota intestinal

La microbiota intestinal se puede clasificar de acuerdo al phylum: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias y Proteobacteria. Debido a la interacción anatómica y funcional entre el lumen intestinal y el hígado a través del sistema portal, se ha propuesto que la microbiota intestinal pudiera tener una participación importante en la patogénesis del HGNA (Mokhtari *et al.*, 2017). Entre los mecanismos que pudieran impactar en la fisiopatología se sugiere: incremento en la permeabilidad intestinal, sobrecrecimiento de bacterias gram negativas y



aumento en la producción de metabolitos hepatotóxicos como es el lipopolisacárido. Además, se ha reportado que la alteración del contenido de TG intrahepáticos es asociado con la abundancia baja de Bacteroidetes pero con alta de Firmicutes (Wong *et al.*, 2013). Por otro lado, en modelos animales se ha reportado que la ingesta de AGP  $\omega$ -3 puede modular la diversidad microbiana y a su vez, varias vías metabólicas involucradas en el desarrollo del HGNA (Pachikian *et al.*, 2013).

## **6. Semilla de chía**

La chía (*Salvia hispánica* L.), forma parte de la familia Lamiaceae, es nativa de México y de algunas partes de Sudamérica. Se ha reportado que la semilla de chía formaba parte de la dieta de los mexicanos prehispánicos debido por su reconocido aporte de nutrientes de alta calidad como por ejemplo su contenido de proteína, fibra, lípidos y antioxidantes (Cahill, 2003).

La composición de la semilla varía dependiendo de la región en la que se cultive (Álvarez-Chávez *et al.*, 2008; Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Valdivia-López & Tecante, 2015). Sin embargo, se ha reportado que en promedio la semilla de chía contiene aproximadamente 5.80% de humedad, 16.54% de proteína, 30.74% de lípidos, 42.12% de carbohidratos totales, del cual 34.40% corresponde a fibra dietética. La semilla de chía es rica en calcio, fósforo, potasio y magnesio (335-860 mg/100 g) pero baja en sodio, hierro y zinc (4.58-16 mg/100 g). Adicionalmente, la semilla de chía es una buena fuente de vitaminas (A, C y niacina) (USDA, 2004) y antioxidantes (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014).

La semilla de chía contiene cantidades significantes de AGP  $\omega$ -3 sin importar el origen de la semilla; la cantidad del ALA se encuentra por arriba del 75% del contenido total de los AG presentes en la semilla. Otras fuentes naturales similares al contenido de AG son las semillas de cártamo y de girasol con 75% y 67%, respectivamente. Sin embargo, entre los AG presentes en las semillas de cártamo y girasol no contiene al ALA (USDA, 2004). Además, Porras-Loaiza y colaboradores (2014), estudiaron la semilla de chía cultivada en cuatro diferentes regiones de México y reportaron una relación de 1:3 entre el balance de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 en su contenido de perfil de AG presentes. Por ello, la semilla de chía independientemente de su aporte nutricional puede ser clasificada como un alimento funcional, porque además de su valor nutricio puede incrementar la saciedad y prevenir factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, inflamación, DM2, entre otras (Muñoz *et al.*, 2013).

En efecto, a partir del 2007, se han realizado 12 estudios en el que evalúan si el consumo de la semilla de chía puede reducir factores de riesgo cardiovascular, pero no se ha establecido como eficaz y los resultados de los pocos estudios presentan inconsistencias; debido a varios factores como: diseño del estudio, población incluida, cantidad de semilla de chía consumida (7 a 50 g, con un promedio de 25 g durante 8 semanas aproximadamente) y presentación del consumo de la semilla de chía, es decir, entera o molida (Teoh *et al.*, 2018). Sin embargo, en los estudios en el que ingerieron la semilla de chía molida, los resultados obtenidos fueron positivamente prometedores que aquellos que la consumieron entera (Vuksan *et al.*, 2007; Nieman *et al.*, 2009; Vuksan *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2012; Nieman *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013; Vuksan *et al.*, 2017).

## JUSTIFICACIÓN

El HGNA es la enfermedad hepática más común en ciudades del occidente y su prevalencia en nuestra población es del 30% (Lizardi-Cervera *et al.*, 2007; Martínez-Alvarado *et al.*, 2014). Es una condición clínica que va acompañada de diversas alteraciones metabólicas que incrementan a la par en prevalencia como son la obesidad, dislipidemia aterogénica, RI, inflamación y DM2, las cuales son factores de riesgo cardiovascular (Jung & Choi *et al.*, 2014). Se ha reportado que los AGP  $\omega$ -3 pueden reducir el riesgo cardiovascular a través de la modulación del metabolismo de lípidos mediante el incremento en la  $\beta$ -oxidación de los AG e inhibiendo la lipogénesis *de novo* y en consecuencia disminuir la concentración de TG circulantes plasmáticos, así como también, disminución de la inflamación (De Castro & Calder, 2017).

La semilla de chía (*Salvia hispánica* L.) es rica en AGP  $\omega$ -3, principalmente de ALA, por lo que puede ser una opción para la prevención y tratamiento del HGNA. Así como también, incorporarse en la estructura de las lipoproteínas y mejorar sus propiedades estructurales y funcionales. Sin embargo, a la fecha no existen estudios que hayan investigado el potencial terapéutico de la chía en el manejo de las alteraciones cuantitativas y cualitativas de las lipoproteínas; por lo que, su importancia de llevar a cabo dicho estudio en nuestra población.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿La ingesta de 25 g de semilla de chía molida en sujetos con HGNA y RI modifica el contenido en AG de las partículas de LDL y HDL?

En caso de ser afirmativo, ¿estas modificaciones se asocian con cambios estructurales y funcionales en el tamaño, el eflujo de colesterol y la actividad antioxidante de las HDL, y con la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas?

## HIPÓTESIS

- El consumo de 25 gramos de la semilla de chía molida durante 8 semanas producirá incremento del contenido del ácido graso  $\alpha$ -linolénico en el perfil de los AG presentes en las partículas LDL y HDL.
- El enriquecimiento en el contenido de AGP  $\omega$ -3 en las partículas de LDL y HDL, se asociarán con una menor susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas y con un aumento en el tamaño de las partículas HDL, incremento de la actividad paraoxonasa y en el eflujo de colesterol mediado por HDL *in vitro*.

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la suplementación con 25 gramos de chía molida durante 8 semanas, modifica el perfil de los AGP  $\omega$ -3 en las partículas LDL y HDL y si el enriquecimiento se asocia con cambios en la estructura y función de las lipoproteínas.

## OBJETIVOS PRIMARIOS

- Determinar el perfil de AG en las partículas LDL y HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial.
- Estimar el tamaño y la distribución de las subclases de las partículas HDL mediante electroforesis.
- Evaluar la susceptibilidad a la oxidación de las partículas LDL y HDL de manera *in vitro*.
- Cuantificar la propiedad antioxidante mediante la actividad paraoxonasa de las partículas HDL.
- Determinar el eflujo de colesterol mediado por el receptor SRB1 empleando células de hepatoma de rata de la línea celular Fu5AH.

## OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Cuantificar las concentraciones de glucosa en ayuno y 2 horas después de ingerir 75 gramos de glucosa oral.
- Estimar la resistencia a la insulina evaluada mediante el modelo de homeostasis.
- Determinar la cantidad de grasa abdominal y la atenuación hepática mediante tomografía axial computarizada.
- Evaluar el estado inflamatorio a través de la determinación de las concentraciones séricas de proteína C reactiva, lipopolisacárido y adiponectina.
- Evaluar el estrés oxidativo sistémico mediante la cuantificación de malondialdehído como producto final de la lipoperoxidación.
- Estudiar en un subgrupo de participantes cambios en la microbiota intestinal mediante secuenciación masiva de segunda generación.

## **METODOLOGÍA**

### **I. Intervención**

El diseño de estudio es un ensayo clínico de antes y después de tratamiento. Los participantes (n=19) fueron seleccionados del grupo control del estudio GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerosa) que se encuentra en su fase de seguimiento en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Se eligieron sujetos de ambos géneros, con diagnóstico tomográfico de HG y RI (HOMA-RI  $\geq$  p75 de la población del estudio mexicano GEA sin alteraciones metabólicas) (Martínez-Alvarado *et al.*, 2014).

Los participantes fueron instruidos para consumir una dieta isocalórica durante 2 semanas. Después de este periodo, recibieron instrucciones para consumir durante 8 semanas 25 gramos de chía molida, ajustando el porcentaje de macronutrientes a las proporciones en la dieta indicada. Se les indicó que no modificaran su actividad física habitual y que no consumieran ninguna otra fuente de AGP  $\omega$ -3, así como también, complementos vitamínicos ricos en antioxidantes. A cada participante se le proporcionó 30 paquetes con 25 gramos de chia entera para un mes de tratamiento, además de un aditamento para que la semilla de chía fuera molida al día de su consumo. Para evaluar el apego a la suplementación, se contó el número de paquetes vacíos devueltos en su visita mensual. Para evaluar el apego a la dieta, se recabó recordatorios de tres días, uno de un fin de semana y dos de días entre semana. Los datos se analizaron con el software NUTRIKCAL. Un nutriólogo se encargó de realizar al menos una llamada semanal para resolver dudas, evaluar posibles efectos adversos (constipación, acidez, diarrea, náuseas y alergias) y dar opciones en caso necesario. Se interrogó al participante en cuanto a la sensación de

sacidad y nivel de energía durante el día. No se incluyeron sujetos con diagnóstico previo de DM2, tratamiento con fármacos hipoglucemiantes o hipolipemiantes, consumo de suplementos alimenticios que contengan AGP  $\omega$ -3, vitaminas liposolubles o complementos vitamínicos ricos en antioxidantes. También aquellos que reportaran pérdida de peso mayor a 3 kg durante los últimos tres meses, ingesta mayor de 20 g/día de alcohol y consumo de fármacos hepatotóxicos. Se eliminaron aquellos pacientes que abandonaron el protocolo en cualquiera de las visitas así como aquellos que no consumieron la semilla de chía. El protocolo fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y realizado con base a los lineamientos de la Declaración de Helsinki. Se incluyeron únicamente los participantes que después de conocer las características del estudio, aceptaron firmar la carta de consentimiento informado (Anexo 1).

## **II. Métodos clínicos**

El peso se midió en kilogramos (kg) y la talla en centímetros (cm), utilizando una báscula calibrada y un estadiómetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). El IMC fue calculado con la fórmula peso (kg) / talla (m<sup>2</sup>). La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca con una aproximación de 0.5 cm. La tensión arterial se midió en tres ocasiones después de por lo menos cinco minutos de reposo, en posición sedente, utilizando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, serie 52000 (Shaneateies Falls, Nueva York, EUA). El promedio de las dos últimas mediciones consecutivas se utilizó para el análisis.



### III. Análisis de laboratorio

Con ayuno de 10 a 12 horas, después de 20 minutos en posición sedente, se colectó sangre venosa en tubos con y sin anticoagulante EDTA (1.8 mg/mL). Después de centrifugar en frío (20 minutos a 2500 rpm), el plasma y el suero se dividieron en 15 alícuotas para conservarlas a -70°C para su posterior análisis. A las alícuotas de plasma se le añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 kIU/mL, Benzamidina 1 mM). Se determinó en muestras frescas las concentraciones de glucosa, perfil de lípidos (colesterol total, TG, C-HDL), química sanguínea (ácido úrico, creatinina) y enzimas hepáticas [alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT)] con métodos enzimáticos-colorimétricos estandarizados y las apo's AI y B, por inmunturbidimetría en un autoanalizador COBAS c311 con estuches comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La reproducibilidad y precisión de las determinaciones de los lípidos y lipoproteínas fueron evaluadas periódicamente por el Programa de Estandarización de Lípidos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (LSP-CDC, Atlanta, GA, EUA). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores al 3 %. El C-LDL se calculó con la fórmula de Friedewald modificada por De Long (1986). Se estimó el tamaño de las partículas de LDL (Wägner *et al.*, 2002).

La concentración de insulina en suero se determinó por radioinmunoanálisis (Millipore RIA Kit St. Charles, Missouri, EUA) y la RI se estimó con el modelo de homeostasis (HOMA-RI =  $[(\text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) * \text{glucosa (mmol/L)}) / 22.5]$  (Matthews *et al.*, 1985). Se determinó simultáneamente en suero: malondialdehído, malonato y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, por arreglo de diodos, en un equipo de electroforesis capilar en zona, bajo detección UV

Beckman Coulter (Urbana, Illinois, EUA). La proteína C reactiva de alta sensibilidad en suero se cuantificó por inmunonefelometría en un autoanalizador BN Pro Spec (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania). La concentración de adiponectina y lipopolisacárido, se determinó por ensayos comerciales de ELISA (Quantikine ELISA, R&D systems, Minneapolis, EUA) y (Cloud-Clone Corp., CEB526Ge, Houston, Texas, EUA), respectivamente, en un espectrofotómetro BioTek Sinergy BH (BioTek, Winooski, VA, EUA).

#### **IV. Estudio de tomografía computarizada**

La TAC con multidetector es un método validado para cuantificar la GAT, la grasa abdominal subcutánea (GAS) y la GAV e identificar la presencia de HG. En el presente trabajo se utilizó un tomógrafo multidetector de 64 canales (Somaton Sensation, Siemens, Forcheim, Alemania). Para medir la grasa abdominal se realizó un solo corte tomográfico a nivel del espacio intervertebral L4-L5. El área transversal total del tejido adiposo abdominal se midió utilizando un rango de atenuación entre -190 a -30 UH. El área de la GAV y GAS, fueron separadas mediante un trazo manual siguiendo la pared muscular abdominal. Se cuantificó la GAT y la GAV en  $\text{cm}^2$  y la GAS se calculó restando el área de GAV a la GAT (Kvist *et al.*, 1988). Para estimar la atenuación del hígado y del bazo, se practicó un solo corte tomográfico de 3 milímetros a nivel de T11-T12 ó T12-L1. Durante el análisis de las imágenes, se marcaron varias regiones de interés de  $1 \text{ cm}^2$  en ambos lóbulos hepáticos y se obtuvo un promedio de estas medidas. El HG se diagnosticó cuando el índice de atenuación hígado/bazo (IAH:B) fue  $< 1.0$  (McKimmie *et al.*, 2008).

## V. Caracterización de las lipoproteínas

Las subpoblaciones de HDL fueron determinadas en HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (4% al 25%) en condiciones nativas (Blanche *et al.*, 1981). En cada gel se utilizaron como referencia marcadores de alto peso molecular (Pharmacia, Piscataway, NJ), con diámetros conocidos (tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.2 nm, y albúmina 7,1 nm). Previa tinción con azul de Coomassie R250, las proporciones relativas a las diferentes subpoblaciones de HDL se cuantificaron por densitometría óptica en un fotodocumentador (modelo ChemiDoc; Bio-Rad, Hércules, USA), que utiliza el programa de análisis molecular Image Lab Bio-Rad versión 5.2.1. Los intervalos utilizados para las diferentes subpoblaciones fueron HDL<sub>3c</sub> 7.21-7.76 nm, HDL<sub>3b</sub> 7.76-8.17 nm, HDL<sub>3a</sub> 8.17-8.77 nm, HDL<sub>2a</sub> 8.77-9.71 nm y HDL<sub>2b</sub> 9.71-12.93 nm. El tamaño promedio de las partículas de las HDL se calculó con base a la proporción relativa de cada una de sus subpoblaciones (Perusse *et al.*, 2001), por lo que se obtuvo sumando el tamaño promedio (nm) de cada subpoblación, multiplicando por su proporción relativa, y la suma total se dividió entre 100.

El eflujo de colesterol, mediado por el receptor SRB1, se determinó *in vitro* empleando células de hepatoma de rata de la línea celular Fu5AH, siguiendo el procedimiento descrito por De la Llera-Moya (1994), con algunas modificaciones. Brévemente, las células Fu5AH se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino al 5% (Gibco BRL) a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> y una humedad de 5%. Los ensayos se realizaron en placas de 24 pozos, se cultivaron 250 000 células/pozo durante 24 horas, posteriormente las células se marcaron con <sup>3</sup>H-colesterol (PerkinElmer) a una

concentración de 5  $\mu\text{Ci}$ /pozo. Después de 24 horas las células se lavaron y equilibraron con MEM adicionado con albúmina sérica bovina al 0.5% durante 18 horas. Finalmente, las células se lavaron e incubaron durante 4 horas a 37 °C, con el suero de cada participante diluido al 2.5% o con HDL aisladas (20  $\mu\text{g}$  de proteína HDL/pozo). Al término de la incubación se retiró el medio y la monocapa de células se removió con NaOH (1N). La radioactividad se cuantificó tanto en las células como en el medio, en un contador beta (Parkard). La fracción del eflujo se calculó al dividir la cantidad del colesterol captado por el suero del participante (medio), entre el colesterol remanente en las células de cada pozo, multiplicado por 100. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, y en cada ensayo se corrió un control positivo (HDL obtenida por precipitación con dextrán-sulfato) y un suero estándar para comprobar la variabilidad del ensayo.

La actividad paraoxonasa en suero se cuantificó fotométricamente en un espectrofotómetro BioTek Sinergy H1 (BioTek, Winooski, VA, EUA) usando paraoxón (Sigma-Aldrich D9286) como sustrato. La velocidad de producción de p-nitrofenol se determinó a 412 nm en una dilución final de suero 1:82 en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se compone de paraoxón 0.98mM, glicina 48.8 mM, cloruro de calcio 0.98 mM y cloruro de sodio 0.98M a 25°C. Se utilizó un coeficiente de extinción (412 nm, pH = 10) de 18920  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para calcular las unidades de actividad paraoxonasa, las cuales se expresan como la cantidad de p-nitrofenol formado en nanomoles por minuto por mililitro de suero (Eckerson *et al.*, 1983). Los ensayos de la actividad se realizaron por triplicado y se calculó el promedio de las determinaciones de la actividad enzimática para cada muestra. En cada determinación se incluyeron mezclas de sueros alto, medio y bajo, independientemente

uno del otro, tomados de varios voluntarios de actividad conocida para asegurar la calidad de cada ensayo.

La susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las lipoproteínas se determinó por el método descrito por Esterbauer y colaboradores (1989) con algunas modificaciones (De Juan-Franco *et al.*, 2009). Las lipoproteínas HDL y LDL se aislaron mediante ultracentrifugación secuencial. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry y colaboradores (1951). Las lipoproteínas aisladas se diluyeron en amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 7.4), 0.16 M cloruro de sodio saturado con oxígeno, a una concentración final de 50 µg/mL. La oxidación de las lipoproteínas se inició mediante la adición de una solución recién preparada de sulfato de cobre a una concentración final de 5 µM, a 37°C en placas de 96 pozos para UV. La cinética de oxidación se monitoreó mediante lecturas espectrofotométricas (BioTek, Winooski, VA, EUA) a 234 nm, para seguir la formación de dienos conjugados (De Juan-Franco *et al.*, 2009). Se registraron lecturas de densidad óptica cada 2 minutos, durante 180 minutos. Con estos datos se construyó la curva de la cinética de oxidación y a partir de ella se calculó la fase de latencia. La fase de latencia, definida como el intervalo entre la adición del sulfato de cobre y el inicio de oxidación rápida, se determinó por la intersección de la recta de la línea basal con la tangente de la fase de oxidación (Kleinveld *et al.*, 1992, De Juan-Franco *et al.*, 2009). Su duración está determinada por la presencia de los antioxidantes endógenos presentes en las partículas. Los resultados se expresaron en minutos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en las primeras 24 horas después del aislamiento, y en cada ensayo se corrió un control interno para validar la calidad del ensayo.

## **VI. Perfil de ácidos grasos**

El contenido de AG fue cuantificado en las partículas de LDL y HDL aislados por ultracentrifugación secuencial. Los AG se determinaron por cromatografía de gases, previa extracción según el método de Folch (1957), que utiliza cloroformo:metanol (1:1 v/v) con hidroxitolueno butilado al 0.002% y ácido heptadecanoico como estándar interno. La transesterificación de los lípidos se realizó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al 2% en metanol, a 90°C durante 2 horas. Los ésteres metílicos de los AG se analizaron en un cromatógrafo Shimadzu GC-8A equipado con una columna capilar de SP2330 de 25 m de largo y 0.25 mm de diámetro interior a 190 °C utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 1.5 mL/min (El Hafidi *et al.*, 2001). Los diferentes ésteres metílicos de los AG fueron identificados según su tiempo de retención determinado con anterioridad con estándares comerciales (Supelco 37 Component FAME Mix, CRM47885).

## **VII. Microbiota intestinal**

Se recolectaron muestras de heces antes y después de la suplementación con semilla de chía en tubos eppendorf de 2 mL. De dichas muestras se realizó la extracción del ácido desoxirribonucleico mediante el uso de columnas de QIAGEN usando el estuche comercial QIAamp fast DNA Stool Mini Kit. La concentración y pureza del ADN se cuantificó mediante el NanoDrop 2000. También se verificó su integridad mediante electroforesis capilar en el Bioanalizador Agilent 2100. Posteriormente, se realizó la amplificación y secuenciación del ácido desoxirribonucleico siguiendo el protocolo de secuenciación masiva con la plataforma MiSeq de Illumina, en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional en Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de acuerdo al protocolo previamente

reportado (Sánchez-Tapia *et al.*, 2017). Dicha plataforma se basa en la secuenciación por síntesis y para ello se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S, usando primers para dichas regiones que además contenían un adaptador propio de Illumina (F:5´TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3´ y R:5´GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3´). Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron mediante reacción en cadena de la polimerasa. Los amplicones tuvieron un tamaño aproximado de 610 pares de bases. Se determinó la concentración del ácido desoxirribonucleico de doble hebra por fluorometría con el Qubit 3.0. La librería final se mezcló de manera equimolar y se secuenció en la plataforma de Illumina MiSeq generando lecturas de 300 bases en cada dirección. Finalmente se utilizó el programa QIIME V1.9 para analizar los datos de secuenciación y caracterizar los patrones bacterianos (Caporaso *et al.*, 2010).

#### **VIII. Análisis estadístico**

Se llevó a cabo un análisis exploratorio con todas las variables a fin de identificar la naturaleza de su distribución mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Mediante estadística descriptiva se caracterizaron las variables, se elaboraron tablas y gráficos con medidas de resumen (promedios y desviación estándar o sus equivalentes no paramétricos, medianas y rango intercuartil) de toda variable. Las comparaciones de antes y después de la suplementación se realizó mediante análisis de t de Student o Wilcoxon para muestras pareadas. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS v22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) y los gráficos con el software GraphPad Prism v6.0c (GraphPad, EUA).

## RESULTADOS

### I. Consumo de nutrimentos de los participantes durante el protocolo y perfil de ácidos grasos mayoritarios contenidos en la semilla de chía.

En el presente trabajo se incluyeron en el análisis estadístico 19 sujetos (8 mujeres y 11 hombres) con promedio de edad de  $58 \pm 8$  años e IMC de  $30.7 \pm 3.8$  kg/m<sup>2</sup>. El consumo de macronutrimentos de los participantes antes y después de la suplementación con la semilla de chía del estado de Jalisco se describe en la Tabla 2. Se observó que los participantes incrementaron de manera significativa el porcentaje de grasa total al término del protocolo. Sin embargo, respecto a la ingesta en el porcentaje de hidratos de carbono disminuyó.

**Tabla 2. Distribución del consumo de nutrimentos en los participantes.**

	<i>Todos (n = 19)</i>		<i>Mujeres (n = 8)</i>		<i>Hombres (n = 11)</i>	
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
<b>Energía (kcal)</b>	1579 [1387-1769]	1665 [1455-1915]	1574 [1246-1676]	1475 [1223-1809]	1674 [1387-2073]	1721 [1636-1915]
<b>Proteína (%)</b>	19.29 ± 3.83	20.67 ± 2.73	19.44 ± 4.86	21.01 ± 2.45	19.18 ± 3.21	20.39 ± 3.04
<b>Grasa total (%)</b>	<b>26.75 ± 8.16</b>	<b>30.43 ± 6.14*</b>	26.10 ± 7.21	30.58 ± 6.36	27.21 ± 9.12	30.32 ± 6.30
<b>Grasa saturada (%)</b>	5.68 ± 2.99	5.71 ± 2.03	4.76 ± 2.58	5.80 ± 2.02	6.40 ± 3.23	5.63 ± 2.14
<b>Grasa monosaturada (%)</b>	8.24 ± 2.94	8.42 ± 3.40	7.71 ± 2.58	7.75 ± 3.65	8.64 ± 3.28	8.95 ± 3.28
<b>Grasa poliinsaturada (%)</b>	4.70 ± 2.12	5.54 ± 1.87	5.36 ± 2.87	5.30 ± 1.96	<b>4.19 ± 1.26</b>	<b>5.74 ± 1.88*</b>
<b>Hidratos de carbono (%)</b>	<b>53.95 ± 6.63</b>	<b>48.90 ± 5.24*</b>	54.46 ± 6.07	48.41 ± 6.13	<b>53.60 ± 7.30</b>	<b>49.29 ± 4.73*</b>
<b>Fibra (g)</b>	24.9 ± 14.5	21.8 ± 8.4	28.7 ± 17.0	18.6 ± 6.2	22.0 ± 12.5	24.4 ± 9.4
<b>Colesterol (mg)</b>	198 ± 105	193 ± 98	192 ± 79	206 ± 100	203 ± 126	184 ± 99
<b>Vitamina E (mg)</b>	3.23 ± 1.73	2.95 ± 1.95	3.30 ± 1.76	2.42 ± 1.71	3.17 ± 1.81	3.38 ± 2.12

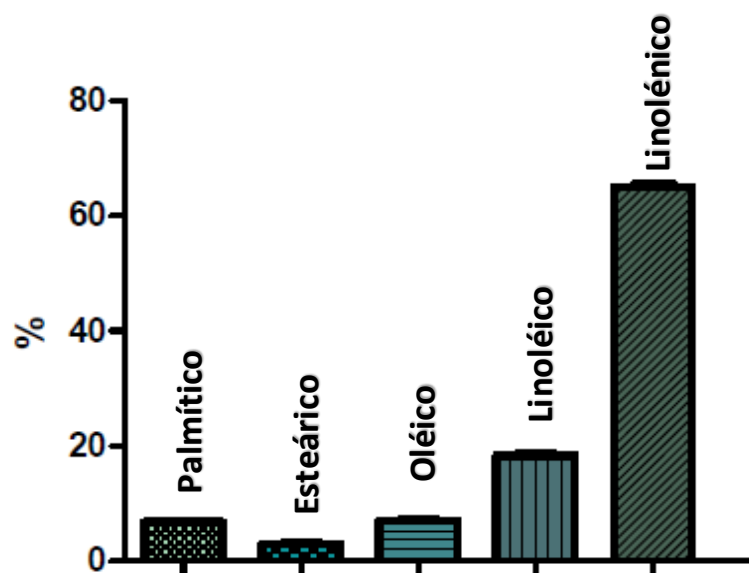
Datos obtenidos de tres recordatorios. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar o mediana [rango intercuartil]. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050. Prueba estadística T-Student pareada o Wilcoxon para variables con distribución normal y asimétrica, respectivamente.

No hubo cambios en el aporte calórico, debido en parte al diseño del estudio (dieta isocalórica). Tampoco se observaron cambios en el porcentaje de proteína, grasa saturada, grasa monoinsaturada, colesterol, fibra y vitamina E. Al estratificarlo por género, en las



mujeres no se observan cambios en ninguno de los nutrimentos. En los hombres se mantiene de manera significativa la disminución en el porcentaje de hidratos de carbono. Sin embargo, de manera significativa incrementa el porcentaje de grasa poliinsaturada.

La semilla de chía es una de las pocas fuentes de origen vegetal, que contiene una alta concentración de AGP  $\omega$ -3. Además es una fuente excelente de proteína vegetal, fibra y antioxidantes, principalmente polifenoles (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014). Al determinar el perfil de AG por triplicado, se observó que nuestra semilla está compuesta por al menos 65% de ácido graso  $\alpha$ -linolénico y 20% de ácido linoléico.



**Figura 3. Distribución en porcentaje de la composición de los ácidos grasos mayoritarios en la semilla de chía empleada en el protocolo.** Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar.

Las características antropométricas de los participantes (Tabla 3), el perfil de lípidos (Tabla 4) y las enzimas hepáticas (Tabla 5), se describen en sus respectivas tablas.

## II. Características antropométricas, lipídicas y bioquímicas de los participantes incluidos en el estudio.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso, IMC y circunferencia de cintura entre el antes y el después en población total y al estratificarlo por género. Todas estas variables disminuyen después de la suplementación con chía, excepto para la circunferencia de cintura en el caso particular del género femenino. Los valores de tensión arterial sistólica y diastólica se mantienen similares a lo largo del estudio.

**Tabla 3. Características antropométricas antes y después de la suplementación con chía en población general y estratificado por género.**

	<i>Todos (n = 19)</i>		<i>Mujeres (n = 8)</i>		<i>Hombres (n = 11)</i>	
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
<i>Edad (años)</i>	58 ± 8		56 ± 7		60 ± 8	
<i>Talla (m)</i>	1.59 ± 0.10		1.51 ± 0.07		1.65 ± 0.07	
<i>Peso (kg)</i>	77.9 ± 11.1	76.1 ± 11.3***	74.5 ± 10.3	72.3 ± 10.0**	80.4 ± 11.4	78.9 ± 11.8*
<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	30.7 ± 3.8	30.0 ± 3.9***	32.5 ± 3.1	31.5 ± 3.1**	29.4 ± 3.9	28.9 ± 4.1*
<i>Circunferencia de cintura (cm)</i>	97.9 ± 9.4	95.3 ± 9.6**	95.2 ± 10.8	92.5 ± 10.6	99.9 ± 8.3	97.4 ± 8.7*
<i>Tensión arterial sistólica (mmHg)</i>	119 ± 13	115 ± 11	113 ± 13	108 ± 7	123 ± 12	119 ± 11
<i>Tensión arterial diastólica (mmHg)</i>	71 ± 6	70 ± 7	69 ± 7	66 ± 2	73 ± 5	72 ± 7

Abreviaciones: IMC; Índice de Masa Corporal. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Diferencias significantes están en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050, \*\*p < 0.010, \*\*\*p < 0.001. Prueba estadística T-Student pareada.

En el perfil de lípidos tampoco hubo diferencias para las variables como colesterol total, C-HDL, C-LDL, Apo B y Apo AI. Sin embargo, disminuyó de manera significativa las concentraciones de TG plasmáticos al analizar los datos en conjunto, así como manteniéndose la significancia estadística en el género masculino. En la tabla 4 se presentan los parámetros bioquímicos que reflejan el funcionamiento renal (creatinina) y hepático (ALT, AST, FA, GGT).

**Tabla 4. Parámetros lipídicos antes y después de la suplementación con chía en población general y estratificado por género.**

	<i>Todos</i> (n = 19)		<i>Mujeres</i> (n = 8)		<i>Hombres</i> (n = 11)	
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	185.2 ± 18.1	176.0 ± 19.9	183.4 ± 16.4	178.3 ± 10.9	186.5 ± 20.0	174.4 ± 25.0
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	35.0 [30.1-41.6]	35.3 [31.4-40.2]	37.9 [35.6-51.0]	36.1 [32.4-52.0]	32.6 [29.0-35.5]	33.9 [30.6-39.9]
<b>C-noHDL (mg/dL)</b>	148.1 ± 18.5	138.4 ± 21.1	138.8 ± 18.1	136.3 ± 17.6	154.8 ± 16.4	139.9 ± 24.1
<b>C-LDL (mg/dL)</b>	117.3 ± 14.3	115.0 ± 19.4	116.8 ± 12.6	113.8 ± 16.9	117.6 ± 16.3	115.8 ± 21.8
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	<b>187.6 ± 68.8</b>	<b>146.9 ± 51.0*</b>	138.2 ± 48.2	140.5 ± 50.1	<b>223.4 ± 59.4</b>	<b>151.6 ± 53.5**</b>
<b>Apolipoproteína B (mg/dL)</b>	108.6 ± 15.2	106.8 ± 16.8	100.3 ± 8.6	102.4 ± 14.4	114.6 ± 16.4	110.0 ± 18.3
<b>Apolipoproteína AI (mg/dL)</b>	131.5 [123.9-137.0]	124.1 [115.3-136.5]	133.9 [125.7-155.2]	134.4 [117.1-172.0]	129.7 [122.3-133.4]	120.8 [115.3-126.7]

Abreviaciones: C-HDL; Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, C-LDL; Colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar o mediana [rango intercuartil]. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050, \*\*p < 0.010. Prueba estadística T-Student pareada o Wilcoxon para variables con distribución normal y asimétrica, respectivamente.

Después de la suplementación con la semilla no hay cambios en la concentración de ácido úrico y creatinina, actividad de las enzimas ALT, AST y FA. Sin embargo, la GGT disminuye al término del estudio, siendo evidente y permaneciendo significativamente en los hombres.

**Tabla 5. Parámetros bioquímicos de función renal y hepática antes y después de la suplementación con chía en población general y estratificado por género.**

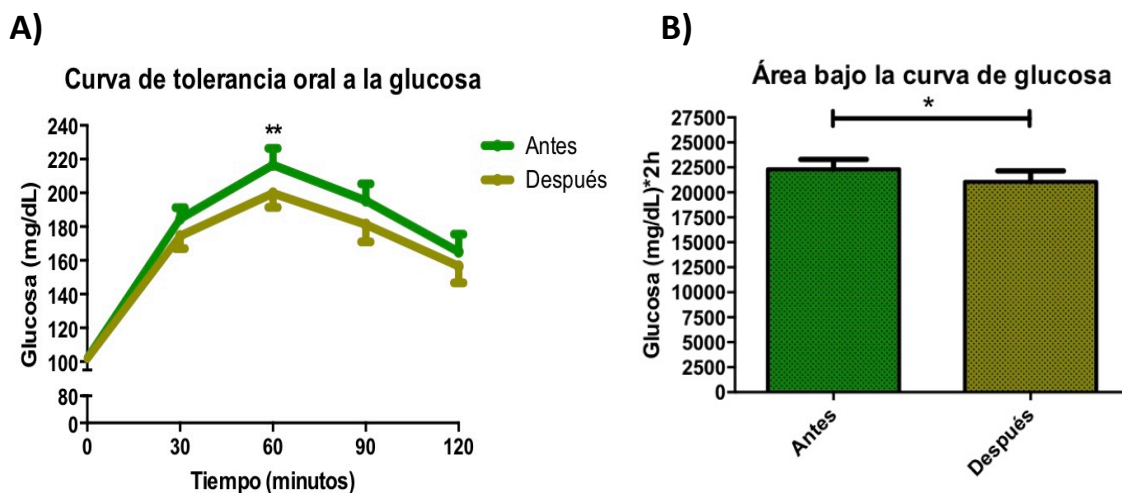
	<i>Todos</i> (n = 19)		<i>Mujeres</i> (n = 8)		<i>Hombres</i> (n = 11)	
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	6.6 ± 1.6	6.6 ± 1.5	5.9 ± 1.1	5.6 ± 0.9	7.2 ± 1.7	7.3 ± 1.4
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<b>Alanino aminotransferasa (UI/L)</b>	27.7 [21.3-30.5]	26.9 [20.4-46.3]	28.2 [21.2-34.5]	36.6 [24.7-50.9]	23.3 [21.4-30.5]	24.8 [20.0-34.9]
<b>Asparto aminotransferasa (UI/L)</b>	24.5 [20.0-25.6]	23.9 [21.3-28.4]	24.7 [23.3-29.9]	28.3 [23.3-31.2]	20.7 [19.1-25.3]	23.7 [20.0-25.2]
<b>Fosfatasa alcalina (UI/L)</b>	75.5 ± 19.6	76.4 ± 21.4	71.9 ± 23.8	73.2 ± 28.0	78.1 ± 16.7	78.6 ± 16.1
<b>Gamma glutamil transpeptidasa (UI/L)</b>	<b>27.1</b> <b>[22.7-46.3]</b>	<b>26.9*</b> <b>[24.1-45.3]</b>	23.2 [22.5-27.0]	25.6 [20.2-27.7]	<b>35.0</b> <b>[24.3-50.0]</b>	<b>32.2*</b> <b>[26.9-45.7]</b>
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	102.6 ± 8.2	102.1 ± 9.9	100.3 ± 7.7	97.5 ± 6.5	104.3 ± 8.5	105.5 ± 10.8
<b>Insulina (μU/mL)</b>	22.4 [19.4-37.4]	23.5 [18.3-58.0]	25.2 [23.3-31.5]	25.5 [21.9-58.0]	20.4 [17.8-37.4]	21.1 [15.3-34.3]
<b>HOMA-RI</b>	5.74 ± 1.34	5.87 ± 1.89	5.95 ± 0.86	6.10 ± 1.59	5.61 ± 1.61	5.73 ± 2.12

Abreviaciones: HOMA-RI; Modelo de homeostasis para estimar la resistencia a la insulina. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar o mediana [rango intercuartil]. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050. Prueba estadística T-Student pareada o Wilcoxon para variables con distribución normal y asimétrica, respectivamente.

### III. Evolución y área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa oral.

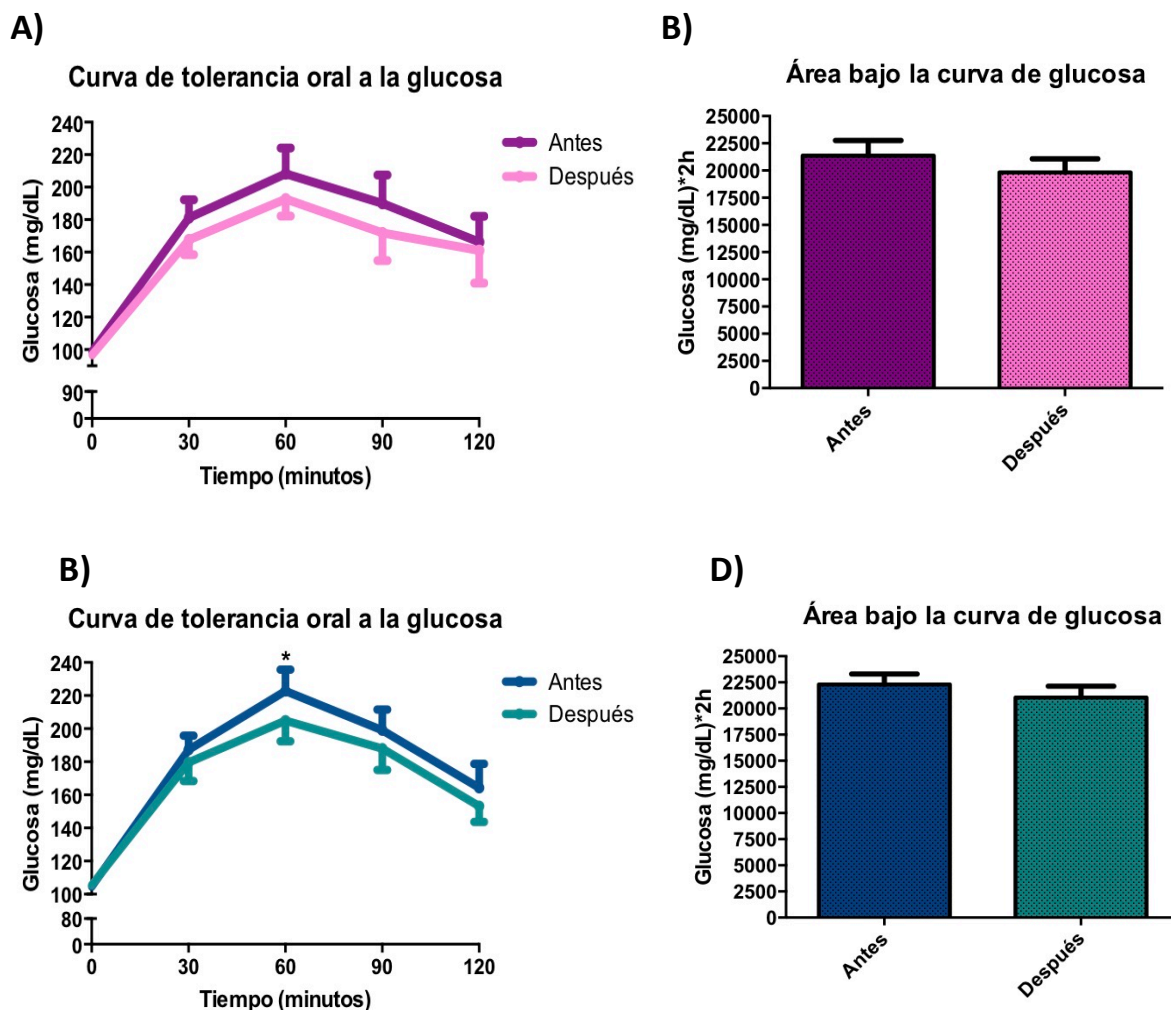
A todos los participantes se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa oral por dos horas y con las concentraciones en ayuno se calculó el índice HOMA como modelo para evaluar la RI (Tabla 5), así como también, el área bajo la curva de las concentraciones para glucosa (Figura 4). Además, se evaluó posteriormente de manera estratificada por género (Figura 5).

No se observó diferencia significativa entre los valores de glucosa en ayuno al compararla antes y después de la suplementación (Tabla 5). Sólo existió diferencia para el tiempo 60 min después de iniciar la prueba. La concentración de glucosa post-carga al final del estudio fue inferior respecto al iniciar al suplementación y la diferencia fue de 16.81 mg/dL (-6.74%).



**Figura 4. Prueba de tolerancia a la glucosa oral antes y después de la suplementación con chía en población general.** Concentración de glucosa (A) durante la prueba a diferentes tiempos. Área bajo la curva para glucosa (B). Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ . Prueba estadística T-Student pareada.

Al calcular el área bajo la curva para la concentración de glucosa durante las dos horas, fue significativa y estadísticamente menor (Figura 4B;  $p < 0.05$ ). Los datos sugieren que una dieta baja en grasa suplementada con semilla de chía disminuye las concentraciones de glucosa post-carga y probablemente quizás cause una mejoría en la sensibilidad a la insulina.



**Figura 5. Prueba de tolerancia a la glucosa oral antes y después de la suplementación con chía estratificada por género.** Concentración de glucosa en mujeres (A) y en hombres (C) durante la prueba a diferentes tiempos. Área bajo la curva para glucosa en mujeres (B) y en hombres (D). Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$ . Prueba estadística T-Student pareada.

#### IV. Determinación de depósitos de grasa abdominal y hepática por medio de tomografía axial computada.

Hubo una disminución significativa en la GAT debida principalmente al depósito de GAV, ( $p < 0.001$ ). No se observaron cambios en el depósito de GAS en población general ni estratificado por género. Sin embargo, al analizarlo por género a pesar de no disminuir la circunferencia de cintura las mujeres, se mantuvo el mismo patrón y en los hombres la GAT no alcanzó diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 6. Medidas de adiposidad abdominal y hepática antes y después de la suplementación con chía en la población estudiada y estratificada por género.**

	Todos (n = 19)		Mujeres (n = 8)		Hombres (n = 11)	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
<b>Grasa abdominal total (cm<sup>2</sup>)</b>	505 ± 102	<b>476 ± 98**</b>	520 ± 103	<b>479 ± 70*</b>	494 ± 104	474 ± 118
<b>Grasa abdominal visceral (cm<sup>2</sup>)</b>	195 ± 59	<b>174 ± 55***</b>	166 ± 31	<b>146 ± 29**</b>	216 ± 67	<b>194 ± 62*</b>
<b>Grasa abdominal subcutánea (cm<sup>2</sup>)</b>	310 ± 83	302 ± 75	354 ± 77	333 ± 58	277 ± 75	280 ± 80
<b>Densidad del bazo (Unidades Hounsfield)</b>	49 ± 3	49 ± 3	48 ± 4	50 ± 4	49 ± 2	48 ± 2
<b>Densidad del hígado (Unidades Hounsfield)</b>	46 ± 12	49 ± 3	44 ± 17	50 ± 4	47 ± 8	48 ± 2
<b>Índice de atenuación hígado/bazo</b>	<b>0.93 ± 0.23</b>	<b>1.08 ± 0.14**</b>	0.91 ± 0.32	1.09 ± 0.14	<b>0.95 ± 0.15</b>	<b>1.07 ± 0.14**</b>

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \* $p < 0.050$ , \*\* $p < 0.010$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Prueba estadística T-Student pareada.

La TAC permite cuantificar la grasa hepática y se considera HG cuando el IAH:B es  $< 1$  (McKimmie *et al.*, 2008). En el presente trabajo se observó un incremento en el valor de IAH:B, esto quiere decir que al aumentar la atenuación del hígado, disminuye el contenido de grasa intra-hepática. Al término del estudio, la mejoría en el índice de atenuación fue del 22.89%, ( $p < 0.010$ ).

**V. Evaluación de la capacidad antioxidante total y algunos marcadores de estrés oxidante en suero en población general y estratificada por género.**

Se determinó la capacidad antioxidante total expresada en equivalentes Trolox, en cada sujeto antes y después de la suplementación (Tabla 7). Se observó tendencia a incremento en la capacidad antioxidante total, pero no alcanzó diferencia estadística significativa. Se desconoce la dimensión del daño a la salud de los sujetos con HGNA y RI por lo que, se midieron algunos marcadores de estrés oxidante, productos que pueden reflejar daño a nivel de lípidos (malondialdehído) y ácidos nucleicos (8-hidroxi-2-deoxi-guanosina).

**Tabla 7. Marcadores de estrés oxidante e inflamación antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.**

	<i>Todos (n = 19)</i>		<i>Mujeres (n = 8)</i>		<i>Hombres (n = 11)</i>	
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
<i>Capacidad antioxidante total (Equivalentes de Trolox mmol/L)</i>	505 ± 210	666 ± 286	495 ± 189	729 ± 318	513 ± 233	620 ± 267
<i>Malondialdehído (pmol/mL)</i>	<b>1.02 ± 0.59</b>	<b>0.81 ± 0.59*</b>	1.08 ± 0.56	0.77 ± 0.52	1.11 ± 0.64	0.84 ± 0.66
<i>Malonato (pmol/mL)</i>	<b>0.057</b> [0.033-0.080]	<b>0.031*</b> [0.028-0.062]	0.058 [0.38-0.086]	0.032 [0.028-0.058]	0.057 [0.033-0.080]	0.039 [0.028-0.080]
<i>8-Hidroxi-2-deoxi-guanosina (pM)</i>	2.81 ± 1.78	2.41 ± 1.38	2.45 ± 1.27	3.08 ± 2.10	2.14 ± 1.12	2.61 ± 1.56
<i>Adiponectina (µg/mL)</i>	5.81 ± 2.23	6.29 ± 2.65	6.96 ± 3.04	7.19 ± 3.28	<b>4.98 ± 1.80</b>	<b>5.64 ± 2.00*</b>
<i>Proteína C reactiva (mg/L)</i>	1.85 [0.89-4.19]	1.75 [1.09-4.59]	2.45 [1.75-5.86]	3.10 [1.81-6.07]	1.39 [0.75-2.81]	1.44 [0.89-2.40]
<i>Lipopolisacárido (ng/mL)</i>	148.3 [128.6-279.8]	148.3 [88.5-375.4]	167.3 [138.4-293.1]	355.8 [125.3-410.2]	138.7 [92.8-221.5]	120.4 [81.4-227.3]

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar o mediana [rango intercuartil]. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050. Prueba estadística T-Student pareada o Wilcoxon para variables con distribución normal y asimétrica, respectivamente.

Al término del estudio disminuyeron las concentraciones circulantes de malondialdehído y malonato. Esto solamente es significativo al analizarlo en población general. Sin embargo, respecto a los otros analitos como la 8-hidroxi-2-deoxi-guanosina no se observó ningún cambio. Respecto a los marcadores de inflamación como la adiponectina, la proteína C reactiva y el lipopolisacárido evaluados en el presente trabajo; en población general no se observó ningún cambio al término del estudio. Al estratificar la población por género, en los hombres se observó un incremento del 15.54% ( $p < 0.050$ ) en la concentración de adiponectina sérica después de la suplementación con semilla de chía. Respecto a la concentración de la proteína C reactiva y del lipopolisacárido circulante no se observó cambio estadísticamente significativo (Tabla 7).

#### **VI. Evaluación de la funcionalidad de las partículas de alta y baja densidad en población general y estratificada por género.**

Se evaluó el eflujo de colesterol hacia el plasma total de cada participante, empleando la línea celular Fu5AH. Se observó más bajo al término de la suplementación con dieta y chía, dicha diferencia fue estadísticamente significativa en población general y al separarlos por género ( $p < 0.050$ , sólo hombres). Respecto a la actividad PON1, no hubo diferencia entre el antes y el después de la suplementación con chía (Tabla 8). Respecto a la distribución de las subpoblaciones de las HDL, se incrementó de manera estadísticamente significativa la subpoblación HDL<sub>2a</sub> en población general y al estratificarlo por género, solo en las mujeres incrementó el tamaño promedio de las HDL explicado por el incremento de las subpoblaciones HDL<sub>2a-b</sub> y disminución de la subpoblación HDL<sub>3b</sub> ( $p < 0.050$ ).



**Tabla 8. Caracterización estructural y funcional de las partículas de alta densidad antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.**

	<b>Todos (n = 19)</b>		<b>Mujeres (n = 8)</b>		<b>Hombres (n = 11)</b>	
	<b>Antes</b>	<b>Después</b>	<b>Antes</b>	<b>Después</b>	<b>Antes</b>	<b>Después</b>
<b>HDL<sub>2b</sub> (%)</b>	9.42 ± 0.58	9.53 ± 0.75	<b>9.51 ± 0.74</b>	<b>9.89 ± 0.88*</b>	9.35 ± 0.45	9.27 ± 0.55
<b>HDL<sub>2a</sub> (%)</b>	<b>18.33 ± 1.98</b>	<b>18.62 ± 2.19*</b>	<b>19.28 ± 2.34</b>	<b>19.74 ± 2.58*</b>	17.64 ± 1.41	17.80 ± 1.50
<b>HDL<sub>3a</sub> (%)</b>	23.42 ± 2.00	23.23 ± 1.28	23.92 ± 1.81	23.59 ± 0.98	23.06 ± 2.13	22.97 ± 1.45
<b>HDL<sub>3b</sub> (%)</b>	25.42 ± 1.40	25.21 ± 1.35	<b>25.19 ± 1.55</b>	<b>24.42 ± 1.17*</b>	25.58 ± 1.32	25.79 ± 1.20
<b>HDL<sub>3c</sub> (%)</b>	23.41 ± 2.69	23.44 ± 2.36	22.09 ± 2.71	22.42 ± 2.78	24.36 ± 2.35	24.18 ± 1.80
<b>Tamaño HDL (nm)</b>	8.55 ± 0.06	8.56 ± 0.7	<b>8.58 ± 0.7</b>	<b>8.60 ± 0.07*</b>	8.53 ± 0.05	8.53 ± 0.05
<b>Actividad paraoxonasa (nmol p-nitrofenol/min/mL)</b>	242.3 ± 174.3	239.5 ± 174.9	327.1 ± 163.3	321.2 ± 166.5	180.6 ± 161.5	180.1 ± 162.7
<b>Eflujo de colesterol total vía SRB1 (%)</b>	<b>15.89 ± 2.96</b>	<b>14.85 ± 2.78**</b>	16.51 ± 2.75	15.47 ± 2.78	<b>15.44 ± 3.16</b>	<b>14.40 ± 2.83*</b>
<b>Eflujo de colesterol ajustado por fosfolípidos vía SRB1 (%)</b>	4.88 ± 0.72	5.01 ± 0.98	5.33 ± 0.76	5.33 ± 1.40	4.56 ± 0.52	4.78 ± 0.44
<b>Eflujo de colesterol en HDL aislada vía SRB1 (%)</b>	7.06 ± 2.48	7.11 ± 2.42	7.05 ± 2.84	6.82 ± 2.65	7.07 ± 2.34	7.32 ± 2.35
<b>Lag time HDL (min)</b>	26.77 ± 5.01	28.09 ± 4.77	29.21 ± 4.36	30.71 ± 5.61	25.06 ± 4.90	26.26 ± 3.21

Abreviaciones: HDL; Lipoproteínas de alta densidad. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050, \*\*p < 0.010. Prueba estadística T-Student pareada.

En la Tabla 9 se presenta la caracterización funcional de las partículas LDL. En la población total no hay diferencias significativas, pero después de estratificar por género, significativamente en las mujeres disminuyó el tamaño estimado de las partículas LDL. En los hombres no se observaron cambios.

**Tabla 9. Caracterización estructural y funcional de las partículas de baja densidad antes y después de la suplementación con chía en población estudiada y estratificado por género.**

	<b>Todos (n = 19)</b>		<b>Mujeres (n = 8)</b>		<b>Hombres (n = 11)</b>	
	<b>Antes</b>	<b>Después</b>	<b>Antes</b>	<b>Después</b>	<b>Antes</b>	<b>Después</b>
<b>Tamaño LDL (C-LDL/Apo B)</b>	1.09 ± 0.10	1.08 ± 0.12	<b>1.17 ± 0.07</b>	<b>1.11 ± 0.09*</b>	1.03 ± 0.07	1.05 ± 0.13
<b>Lag time LDL (min)</b>	65.92 ± 16.87	67.25 ± 17.66	79.56 ± 16.14	78.58 ± 16.15	57.73 ± 11.44	60.45 ± 15.42
<b>Lag time LDL-HDL (min)</b>	57.80 ± 9.70	57.62 ± 10.69	62.23 ± 8.10	64.77 ± 7.58	54.70 ± 9.87	52.62 ± 9.86

Abreviaciones: LDL; Lipoproteínas de baja densidad, Apo B; Apolipoproteína B, HDL; Lipoproteínas de alta densidad. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050. Prueba estadística T-Student pareada.

## VII. Perfil de los ácidos grasos en plasma y en las partículas HDL y LDL en población general y estratificado por género.

La composición de los AG en plasma total y en las partículas aisladas se describen en la Tabla 10 expresados en porcentaje y agrupados con base al grado de saturación. En plasma no se observaron diferencias significativas entre el antes y después de la suplementación con chía para los AG saturados, monoinsaturados (AGM), AGP  $\omega$ -6 y en la relación AGP  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, excepto para los AGP  $\omega$ -3 y el ALA, los cuales incrementan al término del estudio. Después de estratificar por género, las diferencias significativas se mantienen. Sin embargo, en el género de masculino también se observó disminución de manera significativa en el porcentaje de los AGM.

Al aislar las partículas LDL y HDL por la técnica de ultracentrifugación se observó incremento de los AGP  $\omega$ -3 y del ALA y de manera inversa disminución del valor de la relación AGP  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 en ambas partículas. En las partículas HDL se observó disminución en el porcentaje de AGM al analizar a los 19 participantes en conjunto. Posteriormente al segmentar por género, en las mujeres se mantiene la significancia de dichas variables, con excepción de la disminución del contenido de los AGM en las partículas HDL.

En los hombres solamente permanece la significancia observada en el incremento del porcentaje del ALA en las partículas LDL. Respecto a las partículas HDL, se observó disminución en el porcentaje de AGM y en la relación AGP  $\omega$ -6/ $\omega$ -3. Sin embargo, se mantuvo el incremento en el porcentaje del enriquecimiento del ALA en dichas partículas.

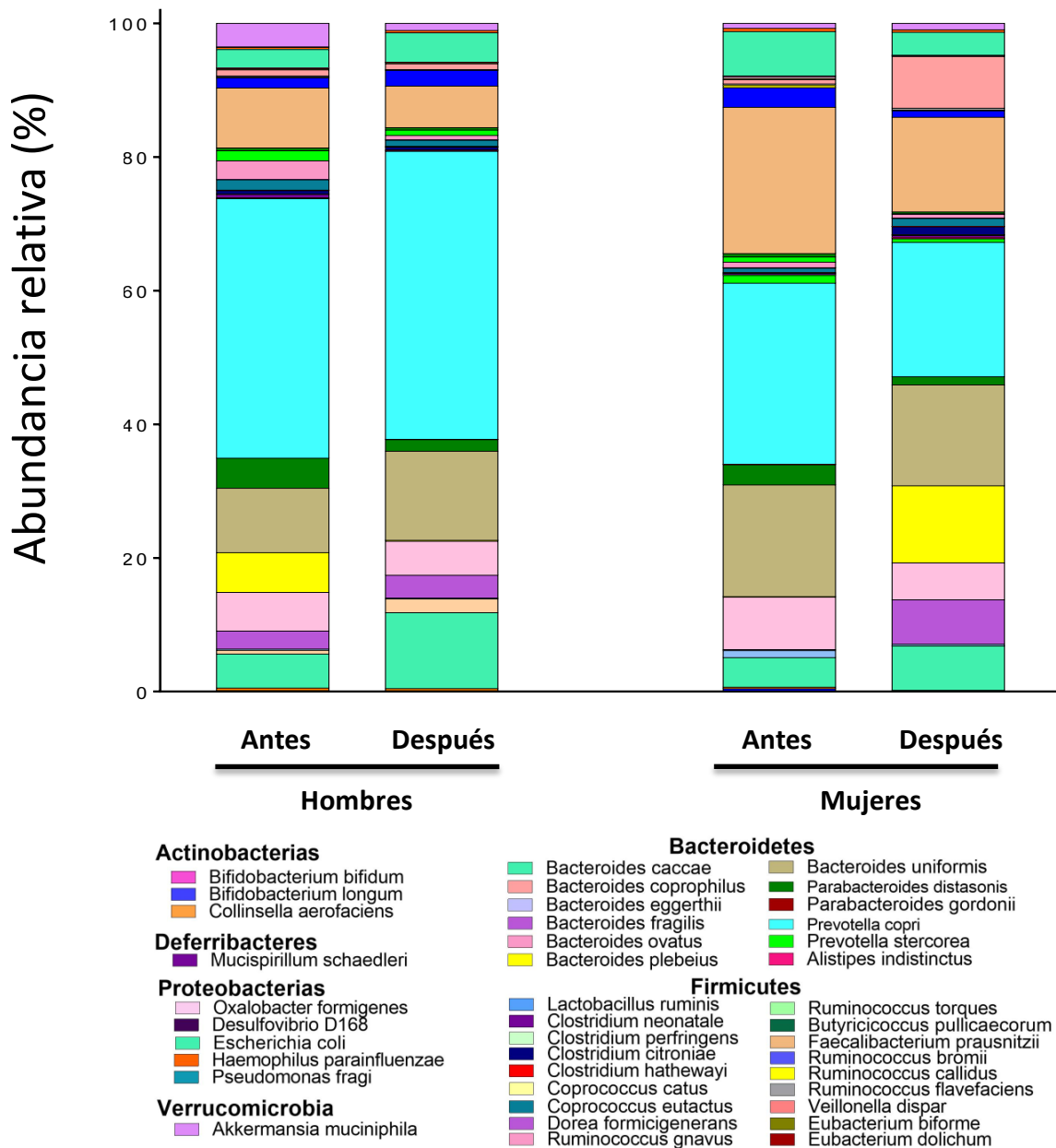
**Tabla 10. Perfil de ácidos grasos en plasma y en las partículas de alta y baja densidad antes y después de la suplementación con chía en población total y estratificado por género.**

	<i>Todos (n = 19)</i>		<i>Mujeres (n = 8)</i>		<i>Hombres (n = 11)</i>	
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Ácidos grasos saturados en plasma (%)	35.39 ± 2.16	34.48 ± 2.19	35.40 ± 2.19	34.68 ± 1.55	35.38 ± 2.24	34.34 ± 2.63
Ácidos grasos monoinsaturados en plasma (%)	25.93 ± 3.19	24.82 ± 2.89	25.05 ± 2.64	25.27 ± 2.40	<b>26.58 ± 3.51</b>	<b>24.49 ± 3.27*</b>
Ácidos grasos poliinsaturados ω-3 en plasma (%)	<b>2.36 ± 0.77</b>	<b>3.30 ± 1.25**</b>	<b>2.36 ± 0.75</b>	<b>3.17 ± 1.31*</b>	<b>2.36 ± 0.82</b>	<b>3.40 ± 1.26**</b>
Ácido graso linolénico en plasma (%)	<b>0.86 ± 0.25</b>	<b>1.55 ± 0.71***</b>	<b>0.75 ± 0.16</b>	<b>1.45 ± 0.82*</b>	<b>0.94 ± 0.28</b>	<b>1.63 ± 0.66**</b>
Ácidos grasos poliinsaturados ω-6 en plasma (%)	35.83 ± 3.71	36.94 ± 3.21	36.64 ± 3.81	36.55 ± 3.28	35.24 ± 3.69	37.22 ± 3.30
Relación ω-6/ω-3 en plasma	16.90 ± 6.17	13.64 ± 7.87	17.12 ± 6.05	14.32 ± 8.61	16.74 ± 6.54	13.15 ± 7.68
Ácidos grasos saturados en LDL (%)	30.71 ± 1.83	30.68 ± 1.92	30.29 ± 2.01	30.40 ± 1.53	31.01 ± 1.71	30.89 ± 2.20
Ácidos grasos monoinsaturados en LDL (%)	20.11 ± 1.74	19.70 ± 1.98	20.14 ± 1.88	20.30 ± 2.05	20.09 ± 1.72	19.26 ± 1.90
Ácidos grasos poliinsaturados ω-3 en LDL (%)	<b>2.49 ± 0.93</b>	<b>3.23 ± 1.21**</b>	<b>2.26 ± 0.51</b>	<b>3.03 ± 0.98*</b>	2.66 ± 1.14	3.37 ± 1.38
Ácido graso linolénico en LDL (%)	<b>0.62 ± 0.27</b>	<b>1.18 ± 0.45***</b>	<b>0.50 ± 0.15</b>	<b>1.05 ± 0.42*</b>	<b>0.71 ± 0.31</b>	<b>1.28 ± 0.46*</b>
Ácidos grasos poliinsaturados ω-6 en LDL (%)	45.95 ± 2.65	45.85 ± 3.30	46.47 ± 2.93	45.77 ± 3.18	45.58 ± 2.51	45.90 ± 3.54
Relación ω-6/ω-3 en LDL	<b>17.74</b> [15.10-24.40]	<b>14.99**</b> [12.42-19.19]	<b>23.34</b> [16.79-24.29]	<b>15.10*</b> [13.43-19.32]	15.77 [13.05-27.41]	14.99 [12.40-17.80]
Ácidos grasos saturados en HDL (%)	38.04 ± 1.97	38.17 ± 2.59	37.18 ± 1.98	37.75 ± 2.78	38.66 ± 1.81	38.48 ± 2.53
Ácidos grasos monoinsaturados en HDL (%)	<b>18.49 ± 1.38</b>	<b>17.71 ± 1.90*</b>	17.99 ± 1.47	17.59 ± 1.61	<b>18.86 ± 1.26</b>	<b>17.81 ± 2.16*</b>
Ácidos grasos poliinsaturados ω-3 en HDL (%)	<b>2.68 ± 1.04</b>	<b>4.03 ± 1.38**</b>	<b>2.80 ± 0.80</b>	<b>4.04 ± 1.51*</b>	2.59 ± 1.21	4.02 ± 1.36
Ácido graso linolénico en HDL (%)	<b>0.49 ± 0.21</b>	<b>0.97 ± 0.32***</b>	<b>0.47 ± 0.07</b>	<b>0.92 ± 0.40*</b>	<b>0.51 ± 0.27</b>	<b>1.00 ± 0.26**</b>
Ácidos grasos poliinsaturados ω-6 en HDL (%)	40.17 ± 3.10	39.22 ± 3.46	41.79 ± 2.60	39.55 ± 2.62	38.99 ± 2.98	38.97 ± 4.07
Relación ω-6/ω-3 en HDL	<b>15.05</b> [12.27-19.24]	<b>10.66**</b> [7.42-12.36]	<b>15.88</b> [13.50-18.24]	<b>11.39*</b> [6.89-13.72]	<b>13.88</b> [12.27-25.75]	<b>10.31*</b> [7.73-11.38]

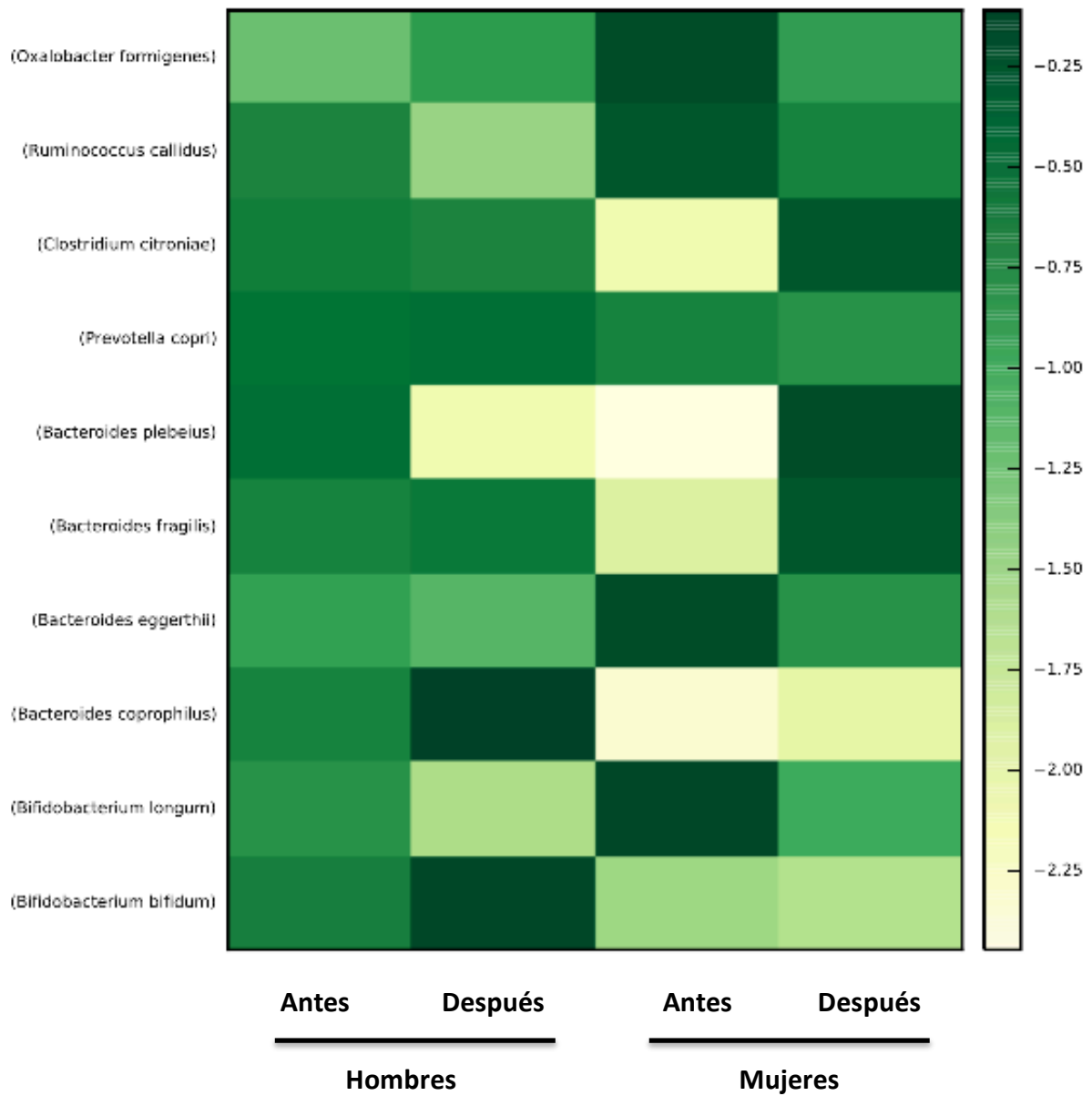
Abreviaciones: LDL; Lipoproteínas de baja densidad, HDL; Lipoproteínas de alta densidad, ω-3; Σ = ácido linolénico + ácido docosahexanoico + ácido eicosahexanoico, ω-6; Σ = ácido araquidónico + ácido linoleico. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar o mediana [rango intercuartil]. Diferencias significantes en negritas al comparar antes vs después de la suplementación, \*p < 0.050, \*\*p < 0.010, \*\*\*p < 0.001. Prueba estadística T-Student pareada o Wilcoxon para variables con distribución normal y asimétrica, respectivamente.

### VIII. Microbiota intestinal antes y después de la suplementación con semilla de chía molida estratificado por género.

Se obtuvieron muestras fecales de 14 participantes (50% hombres), con la finalidad de hacer un estudio exploratorio de cuáles son los cambios generados de la microbiota intestinal en este tipo de sujetos después de consumir semilla de chía molida por 8 semanas a través de secuenciación masiva con la plataforma Illumina MiSeq. El análisis se llevó a cabo estratificado por género de los participantes, quedando 7 hombres y 7 mujeres en cada grupo. El análisis de la microbiota en ambos grupos a nivel de phylum, se encontró compuesta principalmente por *Actinobacterias*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. A nivel de género, se encontró *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Ruminococcus* (Figura 6). En el gráfico de la Figura 7 se presenta las 10 principales especies cambiantes de la microbiota estratificado por género de los participantes al comparar el efecto antes y después de la suplementación con semilla de chía molida por un periodo de 8 semanas. Dicho gráfico se interpreta con base a la intensidad del color, es decir, conforme aumenta la intensidad del color verde quiere decir incremento en la abundancia relativa de cada especie. Por lo que, un cuadro de color amarillo indica disminución o ausencia en la abundancia relativa de la especie analizada en las heces de los sujetos. En los hombres se observó incremento de *Oxalobacter formigenes*, *Bacteroides coprophilus* y *Bifidobacterium bifidum* pero disminución de *Ruminococcus callidus*, *Bacteroides plebeius* y *Bifidobacterium longum*. Por otro lado, en las mujeres disminuyó *Oxalobacter formigenes*, *Ruminococcus callidus*, *Bacteroides eggerthii* y *Bifidobacterium longum* pero incrementó *Clostridium citroniae*, *Bacteroides plebeius* y *Bacteroides fragilis* (Figura 7).



**Figura 6. Análisis de la microbiota intestinal a nivel de especie antes y después de la suplementación con chía estratificado por género.** Los resultados se muestran como porcentaje de la abundancia relativa de los 14 participantes muestreados.



**Figura 7. Diez principales especies cambiantes en la microbiota antes y después de la suplementación con chía estratificado por género.** Los resultados muestran la abundancia relativa de los 14 participantes muestreados. La intensidad del color representa el cambio observado entre el antes y después del tratamiento; disminución (color amarillo) o incremento (color verde oscuro).

## DISCUSIÓN

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer estudio de intervención de dieta suplementado con semilla de chía en sujetos con HGNA y RI que analiza cambios estructurales y funcionales de las lipoproteínas (HDL y LDL). Actualmente no existe un tratamiento eficaz para el revertimiento del hígado graso. Sin embargo, se han estado estudiando diferentes estrategias nutricionales que incluyen alimentos funcionales para su control. En conjunto, los individuos con HGNA reportan baja ingesta de AGP con una elevada relación de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (Araya *et al.*, 2004; Solga *et al.*, 2004; Cortez-Pinto *et al.*, 2006; Zelber-Sagi *et al.*, 2007; Di Minno *et al.*, 2012).

Nosotros observamos un incremento en la ingesta de grasa total explicado por el incremento de grasa poliinsaturada al término del estudio (Tabla 2). En estudios con modelos animales se ha reportado que la baja ingesta de AGP  $\omega$ -3 favorece la lipogénesis, y en consecuencia el desarrollo de esteatosis hepática, esto debido a que los AGP  $\omega$ -3 activan a diversos factores de transcripción. Por un lado inhiben a la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c) y por otro lado activa al receptor activado de la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR- $\alpha$ ), quienes en conjunto favorecen la oxidación de los AG (Fernández & West, 2005); mecanismo que quizás explique la disminución observada del depósito de grasa hepática en nuestros participantes evaluado a través del IAH:B (22.89 %). Por lo que, la semilla de chía al ser rica en ALA, perteneciente a la familia de los AGP  $\omega$ -3, sería fundamental en la dieta de los sujetos con HGNA y RI dado que se podría inhibir la síntesis *de novo* y reducir la grasa hepática.

Cuando se analizó el efecto de la semilla de chía molida sobre las concentraciones de lípidos, nosotros observamos una reducción estadísticamente significativa de 40.66 mg/dL (14.51%) en la concentración de TG. Nuestros resultados son similares a los reportados en la literatura sobre la reducción de la concentración de TG plasmáticos después de la suplementación con AGP  $\omega$ -3 en sujetos con HGNA (Di Minno *et al.*, 2012). Por otro lado, nuestros resultados van de la mano con los datos de Siri & Kraus (2005), quienes reportaron que la disminución de la ingesta de hidratos de carbono se asocia de manera positiva con las concentraciones de TG circulantes. Además, previas investigaciones han demostrado que la ingesta AGP  $\omega$ -3 se asocia con disminución de las concentraciones del colesterol total y C-LDL (Rivellese *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2016). Sin embargo, en el presente estudio no observamos efecto sobre éstos parámetros lipídicos.

Una de las preguntas del presente estudio era, si el consumo de AGP  $\omega$ -3 pudiera tener un efecto en la GAV. Los resultados del presente estudio demostraron que el depósito de GAV disminuyó 11.89 % (21.73 cm<sup>2</sup>), acompañado de una pérdida de peso de 2.34%, es decir, 1.77 kg. Además, en los hombres se observó un incremento de manera significativa en la concentración de adiponectina del 15.54 %. Éstos resultados van de la mano con los datos de Vuksan y colaboradores (2017) que reporta pérdida de peso de 1.9 kg e incremento de la concentración de adiponectina (6.5 %). Sin embargo, aquellos participantes siguieron una dieta con restricción calórica durante seis meses. Los resultados en conjunto sugieren que probablemente el ALA de la semilla de chía pudieran tener un efecto benéfico sobre la producción de mediadores antiinflamatorios y antilipogénicos, como la adiponectina (Hauner, 2005; Detopoulou *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2013).



En el presente estudio uno de los hallazgos interesantes fue el posible efecto antihiperglucemiante de la semilla de chía al comparar el área bajo la curva de las dos pruebas de tolerancia a la glucosa oral antes y después de la suplementación con chía. Diversos estudios clínicos han demostrado el efecto benéfico que tiene el consumo de la semilla de chía a diferentes dosis, formulación, tipo de ingesta y tiempo de intervención; sobre la reducción de los picos postprandiales de glucosa (Vuksan *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2013). Son de vital importancia estos resultados debido a que la hiperglucemia en ayuno y postprandial es perjudicial para la salud porque podrían generar ERO produciendo estrés oxidante, que se define como un desequilibrio entre factores prooxidantes y la capacidad de los propios antioxidantes por neutralizarlos (Brownlee, 2005; Heine & Dekker, 2010).

Las ERO pueden generarse de forma endógena a partir de reacciones metabólicas de oxidación, que pueden causar daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, involucrados en diversos eventos como la RI, DM2, hipertensión, dislipidemia, obesidad visceral y la endotoxemia metabólica (West, 2000; Penckofer *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2012). Con base en los resultados de los marcadores de estrés oxidante (Tabla 7), la concentración sérica circulante del malondialdehído disminuyó al final de nuestro estudio, el cual es un marcador de daño lipídico (Young & McEneny, 2001).

Además, se observó una tendencia de incremento en la capacidad antioxidante total sérica en los pacientes. Este efecto puede en parte apoyar y enriquecer la hipótesis de que la semilla de chía al ser rica en ALA y polifenoles, disminuye el estado proinflamatorio y exceso de estrés oxidativo (Detopoulou *et al.*, 2010; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014; Marineli *et al.*, 2015). Dicha hipótesis se apoya aún más con nuestros resultados obtenidos

con base a la disminución en la actividad de la enzima hepática GGT (Tabla 5), de la cual se ha reportado que su inhibición en la síntesis y actividad, mejoran el daño hepático a nivel mitocondrial por disminución en la producción de ERO inducidas por la hidrólisis de glutatión y el transporte intracelular de sus precursores (Karp *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2006).

Otro de los mecanismos por el cual la semilla de chía pudiera tener un efecto benéfico sería a través de la captación y degradación de los lípidos oxidados mediante la acción de enzimas localizadas en la estructura de las lipoproteínas HDL, como la PON1, que es un buen indicador de su capacidad antioxidante (Mackness *et al.*, 1991). Al evaluar esta propiedad en nuestros participantes no se observó cambio alguno, sugiriendo quizás falta de tiempo en el periodo de ingesta de la semilla de chía para ver cambios significativos en la actividad de la PON1. Además, se ha reportado que las HDL son capaces de contra-restar la oxidación de las LDL. Sin embargo, cuando los sistemas oxidante-antioxidante del organismo no se encuentran en equilibrio, como es el caso del HGNA, se genera estrés oxidativo favoreciendo de esta manera la inducción de la lipoperoxidación. Nuestros resultados del presente trabajo mostraron que la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas no se modificó al término del estudio, pero sí hubo una disminución en el tamaño estimado de las LDL en el género femenino como previamente se ha reportado (Yu-Poth *et al.*, 2000; Kratz *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2003; Rivellese *et al.*, 2003; Scheffer *et al.*, 2003; Siri & Krauss, 2005; Bos *et al.*, 2007).

Por otro lado, como vimos en la Tabla 8, se observó ligeramente un incremento del 1.47% de las subpoblaciones HDL<sub>2a</sub>. Sin embargo, se ha reportado previamente que pequeños cambios en la distribución de las lipoproteínas pueden impactar en gran magnitud (Siri & Krauss, 2005; Hartweg *et al.*, 2007; Hernáez A *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2017; Hernáez A *et al.*, 2017). Cuando estratificamos a nuestra población, en los hombres no se observó ningún cambio en las cinco subpoblaciones de HDL ni en el tamaño. Sin embargo, en las mujeres incrementaron las subpoblaciones de las HDL grandes (HDL<sub>2a-b</sub>) y disminuyeron las HDL<sub>3b</sub>, así como también, aumentó el tamaño promedio estimado de las partículas. Estos resultados van de la mano con estudios epidemiológicos previos, en los cuales reportan que la ingesta de AGP  $\omega$ -3 se asocia de manera positiva con la concentración de partículas HDL grandes (Petersen *et al.*, 2002; Annuzzi *et al.*, 2012; Bogl *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2017).

Con el objetivo de mejorar la funcionalidad de las lipoproteínas por enriquecimiento con el ALA proveniente de la semilla de chía, estudiamos y encontramos un incremento del 45.09% en la concentración de los AGP  $\omega$ -3 en el plasma de nuestros participantes considerando la suma de ALA, EPA y DHA, del cual 86.45% corresponde al ALA. En las partículas HDL y LDL aisladas se observó una similar incorporación. Sin embargo, las HDL fueron preferentemente más enriquecidas por un 147.54% con ALA que las partículas LDL, 125.81%. Estos hallazgos son interesantes ya que, en un estudio previo, se reportó que el consumo de chía molida en mujeres postmenopáusicas con sobrepeso y no fumadoras incrementó la concentración de ALA por 58% y EPA por 39% a diferencia del grupo control y de los que consumían la semilla entera (Nieman *et al.*, 2012).

Respecto al contenido de AG presentes en las lipoproteínas, se ha demostrado que son un factor importante para la susceptibilidad a la oxidación de las LDL (Scheffer *et al.*, 2003). En nuestro trabajo no se observó efecto en las partículas HDL y LDL aisladas sobre la susceptibilidad a la oxidación evaluada mediante el tiempo lag, a pesar de verse cambios en el perfil de AG, reducción de peso y estratificado por género, similar a como reporta Kratz y colaboradores (2002). Por una parte, se vieron enriquecidas las partículas LDL y HDL de AGP  $\omega$ -3 con una disminución de los AGM sólo en las partículas HDL de manera significativa. Diversos estudios han reportado que las dietas ricas en AGP resultan en partículas LDL más rápidamente oxidables que la de los participantes que consumen dietas ricas en AGM (Yu-Poth *et al.*, 2000; Kratz *et al.*, 2002; Utarwuthipong *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros datos sugieren que a pesar de verse más susceptibles a la oxidación por la presencia de AG con tres o más dobles enlaces, también pudieran verse enriquecidas con antioxidantes como los polifenoles presentes en la semilla de chía haciendo a las partículas resistentes al proceso de la oxidación.

El transporte reverso de colesterol se ha reportado como la principal función antiaterogénica de las partículas HDL y los resultados empleando células de hepatoma de rata de la línea celular Fu5AH y macrófagos THP-1 son contradictorios. Por un lado, se reporta que el consumo de AGP  $\omega$ -3 incrementan la capacidad de movilización del colesterol debido a la incorporación de los AGP  $\omega$ -3 en las membranas (Montoya *et al.*, 2002; Kasbi Chadli *et al.*, 2013). Sin embargo, en aquellos que reportan reducción, lo atribuyen a la disminución en la hidrólisis de los ésteres de colesterol y/o disminución en la secreción de la Apo E (Fournier *et al.*, 2016; Fournier *et al.*, 2017). Al analizar nuestros datos se observa que

disminuyó al término de la suplementación con semilla de chía (Tabla 8). Por lo que, se sugiere evaluar la composición de las partículas HDL que quizás nos ayude explicar más a detalle dicho comportamiento.

El sobrecrecimiento bacteriano, la producción de endotoxinas y la alteración de la barrera intestinal se han sugerido participar en la patogénesis del HGNA. Respecto al análisis de la microbiota intestinal después de la suplementación con semilla de chía observamos que los grupos bacterianos más abundantes a nivel de phylum son *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. A nivel de género, los *Bacteroides* y *Prevotella* representan mayoritariamente la microbiota intestinal. Se ha informado que *Prevotella copri*, una especie del enterotipo *Prevotella* se asocia con inflamación intestinal, un factor de riesgo para el desarrollo del HGNA (Henao-Mejia *et al.*, 2012). También se ha reportado una relación positiva entre la tolerancia a la glucosa y el incremento en la abundancia de la especie *P. copri*. Sin embargo, los resultados han sido controversiales con otros estudios sugiriendo que *P. copri* es dependiente del tipo de dieta (Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015; Pedersen *et al.*, 2016).

A nuestro conocimiento, no se ha publicado en la literatura la presencia de *Bifidobacterium longum* asociado con HGNA y RI. Nosotros encontramos disminución de *B. longum* en la población con HGNA y después de la intervención con semilla de chía aumentó su abundancia. Esta cepa es comúnmente empleada como probiótico y hasta el momento no existe mucha información de la presencia de esta bacteria en sujetos con HGNA. Sin embargo, se sabe que el género *Bifidobacterium* tiene la capacidad de degradar mucina, por lo que su presencia en la microbiota intestinal ocasiona disminución del grosor de la mucosa y a su vez, pérdida de la barrera protectora intestinal (Turroni *et al.*, 2014).

Interesantemente, dentro de las bacterias que aumentaron su abundancia se encontró a *Bacteroides fragilis* tanto en hombres como en mujeres. Se ha demostrado que esta bacteria tiene un gran número de enzimas que fermentan hidratos de carbono complejos probablemente como los que se encuentran en la semilla de chía. La presencia de esta bacteria se ha asociado con una mayor funcionalidad de la barrera epitelial (Wexler, 2007). Hasta el momento no se ha asociado alguna bacteria en específico con el desarrollo de esteatosis hepática. Sin embargo, estudios en humanos han sugerido existir la existencia de disbiosis y su contribución en la progresión de HGNA (Bashiardes *et al.*, 2016; Boursier *et al.*, 2016).

Nosotros también hemos encontrado en nuestra población, disminución en la concentración de *Ruminococcus*, resultado que se ha asociado con protección en el desarrollo de fibrosis hepática (Boursier *et al.*, 2016). Además, análisis metagenómicos sugieren un incremento en rutas involucradas en la síntesis de lípidos en sujetos con NAFLD en comparación con sujetos sanos (Michail *et al.*, 2015). Otra bacteria que se vio modificada por la intervención con semilla de chía fue *Bacteroides plebeius*. La especie *B. plebeius* ha demostrado ser capaz de adaptarse a la dieta local en diferentes grupos de poblaciones. En particular, las cepas de *B. plebeius* en japoneses contienen un gen que es adquirido a partir de bacterias marinas y que a su vez, se requiere para degradar al polisacárido porfirina. Este carbohidrato se encuentra en algas comestibles y aparentemente no se encuentra en la microbiota intestinal de las poblaciones Norteamericanas (Hehemann *et al.*, 2010).

Nuestros resultados sugieren que los AGP  $\omega$ -3 presentes en la semilla de chía pueden interactuar con la microbiota intestinal. Sin embargo, este estudio exploratorio sugiere el potencial de la semilla de chía como un prebiótico y agente antimicrobial que restaura la abundancia de ciertas comunidades bacterianas, no obstante el mecanismo por el cual se dan estos cambios no se ha dilucidado aún.

## LIMITACIONES Y FORTALEZAS

La fortaleza del presente estudio es que se estudia el efecto de un alimento funcional en sujetos que presentan una enfermedad para tener una evidencia científica sobre los efectos benéficos del consumo de la semilla de chía. Sin embargo, una de las limitaciones es que no contamos con un grupo control. Una segunda fortaleza es que se pudo evaluar dos propiedades funcionales de las partículas HDL (antioxidante y eflujo de colesterol) y se sugiere evaluar la composición de las partículas.

Considerando que en nuestra población las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte y el mecanismo de oxidación de los lípidos contenidos en las partículas lipoproteicas es un factor importante para el desarrollo de aterosclerosis; los resultados sugieren evaluar en un futuro el contenido de antioxidantes en las partículas aisladas (HDL y LDL) que pudieran explicar a mayor detalle su resistencia a oxidarse, a pesar de estar enriquecidas con AG de un mayor número de insaturaciones.



## CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que una dieta isocalórica suplementada con semilla de chía en sujetos que presentan HGNA y RI tiene un efecto específico de disminución en: obesidad visceral, acumulación de grasa hepática, triglicéridos plasmáticos circulantes y estrés oxidante evaluado por un producto de lipoperoxidación (malondialdehído).

Respecto al perfil de los AG, en el plasma incrementó hasta un 86.45% el ALA, principal ácido graso presente en la semilla de chía. En las partículas aisladas, las HDL fueron preferentemente más enriquecidas de ALA que las LDL, 147.54% y 125.81%, respectivamente.

De manera particular, en el género masculino, incrementó la concentración de adiponectina hasta un 15.54%. En el género femenino, aumentó el tamaño de las partículas HDL, explicado por el aumento de las partículas HDL<sub>2ab</sub> y disminución de las HDL<sub>3b</sub>. Además, en la población estudiada se observó que las partículas se vuelven resistentes a la oxidación, a pesar de enriquecerse de AGP y no existir cambio en el tiempo de latencia.

Por último, en nuestros participantes la comunidad bacteriana *Bifidobacterium longum* y *Ruminococcus callidus* disminuyó al término de la suplementación con semilla de chía molida.

## REFERENCIAS

- Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, et al. **Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995; 15: 1812-8.
- Adkins Y & Kelley DS. **Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Nutr Biochem*, 2010; 21: 781-92.
- Álvarez-Chávez LM, Valdivia-López MA, Aburto-Juárez, et al. **Chemical characterization of the lipid fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.).** *Int J Food Pro*, 2008; 11: 687-97.
- Ansell BJ, Fonarow GC & Fogelman AM. **The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein.** *Curr Opin Lipidol*, 2007; 18: 427-34.
- Anuzzi G, Rivellese AA, Wang H, et al. **Lipoprotein subfractions and dietary intake of n-3 fatty acid: The Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives study.** *Am J Clin Nutr*, 2012; 108: 1351-9.
- Araya J, Rodrigo R, Videla LA, et al. **Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.** *Clin Sci*, 2004; 106: 635-43.
- Aviram M. **Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases.** *Free Rad Res*, 2000; 33: S85-97.
- Bashiardes S, Shapiro H, Rozin S, et al. **Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota.** *Mol Metab*, 2016; 5; 782-94.
- Blanche P, Gong E, Forte T, et al. **Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis.** *Biochem Biophys Acta*, 1981; 665: 408-19.
- Boden G. **Obesity and free fatty acids.** *Endocrinol Metab Clin N Am*, 2008; 37: 635-46.
- Bogl LH, Pietiläinen KH, Rissanen A, et al. **Association between habitual dietary intake and lipoprotein subclass profile in health young adults.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013; 23: 1071-8.
- Bohte AE, Van Werven JR, Bipat S, et al. **The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and <sup>1</sup>H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis.** *Eur Radiol*, 2011; 21: 87-97.
- Bos G, Poortvliet MC, Scheffer PG, et al. **Dietary polyunsaturated fat intake is associated with low-density lipoprotein size, but not with susceptibility to oxidation in subjects with impaired glucose metabolism and type II diabetes: the Hoorn study.** *Eur J Clin Nutr*, 2007; 61: 205-11.
- Boursier J, Mueller O, Barret M, et al. **The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota.** *Hepatol*, 2016; 63 (3): 764-75.
- Brownlee M. **The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.** *Diabetes*, 2005; 54 (6): 1615-25.
- Burdge GC & Calder PC. **Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective.** *Nutr Res Rev*, 2006; 19: 26-52.

- Cahill JP. **Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae).** Economic Botany, 2003; 57(4): 604-8.
- Calder PC. **Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health.** Eur Lipid Sci Technol, 2014; 116: 1280-300.
- Camont L, Chapman MJ & Kontush A. **Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease.** Trends Mol Med, 2011; 17(10): 594-603.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.** Nat Met, 2010, 7 (5): 335-6.
- Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, et al. **Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome.** Diabetes, 2004; 53: 2087-94.
- Chalanasi N, Younossi Z, Lavine JE, et al. **The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association.** Hepatol, 2012; 55: 2005-23.
- Chen SJ, Yen CH, Huang YC, et al. **Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome.** Plos ONE, 2012; 7(9): e45693.
- Cortez-Pinto H, Jesus L, Barros H, et al. **How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients?** Clin Nutr, 2006; 25: 816-23.
- Czarnecka H & Yokoyama S. **Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin: cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange.** J Biol Chem, 1996; 271: 2023-8.
- Davidson WS & Thompson TB. **The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins.** J Biol Chem, 2007; 282(31): 22249-53.
- Day CP & James OF. **Steatohepatitis: a tale of two "hits"?** Gastroenterology, 1998; 114: 842-5.
- De Castro GS & Calder PC. **Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. Review.** Clin Nutr, 2017; 1-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2017.01.006>
- De la Llera-Moya M, Atger V, Paul JL, et al. **A cell system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1994; 14(7): 1056-65.
- De la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, et al. **Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface.** J Lipid Res, 1999; 40: 575-80.
- De Juan-Franco E, Pérez A, Ribas V, et al. **Standardization of a method to evaluate the antioxidant capacity of high-density lipoproteins.** Int J Biomed Sci, 2009; 5(4): 402-10.
- De Long DM, De Long ER, Wood PD, et al. **A comparison of methods for estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The lipid Research Clinics Prevalence Study.** JAMA, 1986; 256: 2372-7.

- Detopoulou P, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, et al. **Dietary antioxidant capacity and concentration of adiponectin in apparently healthy adults: The ATTICA study.** Eur J Clin Nutr, 2010; 64: 161-8.
- Di Minno MND, Russolillo A, Lupoli R, et al. **Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease.** World J Gastroenterol, 2012; 18(41): 5839-47.
- Dias CB, Amigo N, Wood LG, et al. **Effect of diets rich in either saturated fat or n-6 polyunsaturated fatty acids and supplemented with long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma lipoprotein profiles.** Eur J Clin Nutr, 2017; 1-6.
- Dias CB, Wood LG & Garg ML. **Effects of dietary saturated and n-6 polyunsaturated fatty acids on the incorporation of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids into blood lipids.** Eur J Clin Nutr, 2016; 1-7.
- Durrington PN, Mackness B & Mackness MI. **The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonasa.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002; 22: 1248-50.
- Eckerson HW, Wyte CM & La Du BN. **The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism.** Am J Hum Genet, 1983; 35: 1126-38.
- El Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, et al. **Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$ -desaturase activities.** J Nutr Biochem, 2001; 12(7): 396-403.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, et al. **Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein.** Free Rad Res Comms, 1989; 6: 67-75.
- Fabbrini E, Sullivan S & Klein S. **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications.** Hepatology, 2010; 51: 679:89.
- Fernández ML & West KL. **Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids.** J Nutr, 2005; 135: 2075-8.
- Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, et al. **Regulation of serum paraoxonasa activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population.** Clin Chem, 2003; 49: 1491-7.
- Florentin M, Liberopoulos EN, Wierzbicki AS, et al. **Multiple actions of high-density lipoprotein.** Curr Opin Cardiol, 2008; 23(4): 370-8.
- Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GH. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** J Biol Chem, 1957; 226: 497-509.
- Fournier N, Sayet G, Védie B, et al. **Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs cholesterol efflux from cholesterol-loaded human macrophages by reducing the cholesteryl ester mobilization from lipid droplets.** Biochem Biophys Acta, 2017; doi:10.1016/j.bbailip.2017.07.011.
- Fournier N, Tardivel S, Benoist JF, et al. **Eicosapentaenoic acid membrane incorporation impairs ABCA1-dependet cholesterol efflux via a protein kinase A signaling pathway in primary human macrophages.** Biochem Biophys Acta, 2016; 1861: 331-41.
- Gao X, Jayaraman S & Gursky O. **Mild oxidation promotes and advances oxidation impairs remodeling of human high-density lipoprotein in vitro.** J Mol Biol, 2008; 29 (376): 997-1007.

- González-Salazar MC, Medina-Urrutia AX, Juárez-Rojas JG, et al. **Dietary and physical activity patterns in Mexican population: Association with fatty liver.** *Gac Med Mex*, 2014; 150 Suppl 1: 39-47.
- Gray B, Steyn F, Davies PSW, et al. **Omega-3 fatty acids: a review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management.** *Eur J Clin Nutr*, 2013: 1-9.
- Haghpassand M, Bourassa PA, Francome OL, et al. **Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels.** *J Clin Invest*, 2001; 108: 1315-20.
- Halberg N, Wernstedt-Asterholm I & Scherer PE. **The adipocyte as an endocrine cell.** *Endocrinol Metab Clin N Am*, 2008; 37: 753-68.
- Hartweg J, Farmer AJ, Perera R, et al. **Meta-analysis of the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on lipoproteins and other emerging lipid cardiovascular risk markers in patients with type 2 diabetes.** *Diabetol*, 2007; 50: 1593-602.
- Hauner H. **Secretory factors from human adipose tissue and their functional role.** *Proc Nutr Soc*, 2005; 64: 163-9.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, et al. **Transfer of carbohydrate-enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota.** *Nature*, 2010, 8, 908-12.
- Heine RJ & Dekker JM. **Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease.** *Diabetol*, 2002; 45: 461-75.
- Henao-Mejia J, Elivav E, Jin C, et al. **Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity.** *Nature*, 2012; 482: 179-185.
- Hernández A, Castañer O, Elosua R, et al. **Mediterranean diet improves high-density lipoprotein function in high-cardiovascular-risk individuals.** *Circulation*, 2017; 135: 633-43.
- Hernández A, Fernández-Castillejo S, Farrás M, et al. **Olive oil polyphenols enhance high-density lipoprotein function in humans.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014; 34: 2115-9.
- Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, et al. **Structure of low density lipoprotein (LDL) particles. Basis for understanding molecular changes in modified LDL.** *Biochem Biophys Acta*, 2000; 1488: 189-210.
- Ho H, Lee AS, Jovanovski E, et al. **Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia Hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial.** *Eur J Clin Nutr*, 2013; 67: 786-8.
- Jessup W & Kritharides L. **Metabolism of oxidized LDL by macrophages.** *Curr Opin Lipidol*, 2001; 29: 359-62.
- Jin F, Nieman DC, Sha W, et al. **Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women.** *Plant Foods Hum Nutr*, 2012; 67 (2): 105-10.
- Jung UJ & Choi MS. **Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. Review.** *Int J Mol Sci*, 2014; 15: 6184-223.

- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al. **Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.** J Clin Invest, 2006; 116: 1784-92.
- Karp DR, Shimooku K & Lipsky PE. **Expression of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death.** J Biol Chem, 2001; 276: 3798-804.
- Kasbi Chadli F, Nazih H, Krempf M, et al. **Omega 3 Fatty Acids Promote Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Hamster Fed High Fat Diet.** PLoS ONE, 2013; 8 (4): e61109.
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, et al. **Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: Application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein.** Clin Chem, 1992; 38 (10): 2066-72.
- Klop B, Elte JW & Cabezas MC. **Dyslipidemia in obesity: Mechanisms and potential targets.** Nutrients, 2013; 5: 1218-40.
- Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. **Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*.** Cell Metab, 2015; 22: 971-982.
- Kratz M, Gulbahce E, Von Eckardstein A, et al. **Dietary mono- and polyunsaturated fatty acids similarly affect LDL size in healthy men and women.** J Nutr, 2002; 132: 715-8.
- Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, et al. **Effects of dietary acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein.** Eur J Clin Nutr, 2002; 56: 72-81.
- Kvist H, Chowdhury B, Grangård U, et al. **Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurement with computed tomography in adult men and women: predicted equations.** Am J Clin Nutr, 1988; 48: 1351-61.
- Lizardi-Cervera J, Chávez-Tapia NC, Pérez-Bautista O, et al. **Association among C-reactive protein, fatty liver disease, and cardiovascular risk.** Dig Dis Sci, 2007; 52: 2375-9.
- López-Velázquez JA, Silva-Vidal KV, Ponciano-Rodríguez G, et al. **The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas.** Ann Hepatol, 2014; 13: 166-78.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** J Biol Chem. 1951; 193: 265-75.
- Ma X, Holalkere NS, Kambadakone A, et al. **Imaging-based quantification of hepatic fat: methods and clinical applications.** RadioGraphics, 2009; 29: 1253-80.
- Mackness MI, Arrol S & Durrington PN. **Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein.** FEBS Lett. 1991; 286: 152-4.
- Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. **Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus.** Atherosclerosis, 1991; 86:193-9.
- Marineli RS, Lenquiste SA, Moraes EA, et al. **Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats.** Food Res Int, 2015; doi:10.1016/j.foodres.2015.07.039

- Martínez-Alvarado M, Juárez-Rojas JG, Medina-Urrutia AX, et al. **Association of fatty liver with cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in a Mexican population.** Rev Invest Clin. 2014, 66(5): 407-14.
- Martínez-Cruz O & Paredes-López O. **Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra-high performance liquid chromatography.** J Chromatogr A, 2014; 1346: 43-8.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** Diabetol, 1985, 28: 412-9.
- McKimmie RL, Daniel KR, Carr JJ, et al. **Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: The Diabetes Heart Study.** Am J Gastroenterol. 2008; 103: 3029-35.
- Michail S, Lin M, Frey MR, et al. **Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease.** FEMS Microbiol Ecol, 2015; 91 (2): 1-9.
- Mirza MS. **Obesity, visceral fat and NAFLD: Querying the role of adipokines in the progression of nonalcoholic fatty liver disease.** ISRN Gastroenterol, 2011: 1-11.
- Mokhtari Z, Gibson DL & Hekmatdoost A. **Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet.** Adv Nutr, 2017; 8: 240-52.
- Montoya MT, Porres A, Serrano S, et al. **Fatty acid saturation of the diet and plasma lipid concentrations, lipoprotein particle concentrations, and cholesterol efflux capacity.** Am J Clin Nutr, 2002; 75: 484-91.
- Muñoz LA, Cobos A, Díaz O, et al. **Chia seed (*Salvia hispanica*): An ancient grain and a new functional food.** Food Rev Int, 2013; 29(4): 394-408.
- Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, et al. **The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL.** J Lipid Res, 2004; 45 (6): 993-1007.
- Nieman D, Cayea E, Austin M, et al. **Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults.** Nutr Res. 2009; 29: 414-8.
- Nieman D, Gillitt N, Jin F, et al. **Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: A metabolomics Investigation.** J Altern Complement Med. 2012; 18: 700-8.
- Ortega E, Koska J, Salbe AD, et al., **Serum gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) is a determinant of insulin resistance (HOMA-IR) independent of adiposity in Prima Indian children.** J Clin Endocrinol Metab, 2006; 91: 1419-22.
- Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, et al. **Prebiotic approach alleviates hepatic steatosis: implication of fatty acid oxidative and cholesterol synthesis pathways.** Mol Nutr Food Res, 2013; 57: 347-59.
- Pedersen H, Petersen M, Major-Pedersen A, et al. **Influence of fish oil supplementation on in vivo and in vitro oxidation resistance of low-density lipoprotein in type 2 diabetes.** Eur J Clin Nutr, 2003; 57: 713-20.
- Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al. **Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity.** Nature, 2016; 535: 376-380.

- Penckofer S, Schwertz D & Florczak K. **Oxidative stress cardiovascular disease in type 2: the role of antioxidants and pro-oxidants.** J Cardiovasc Nurs, 2002; 16: 68-85.
- Perusse M, Pascot A, Despres JP, et al. **A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma.** J Lipid Res, 2001; 42: 1331-4.
- Petersen M, Pedersen H, Major-Pedersen A, et al. **Effect of fish oil versus corn oil supplementation on LDL and HDL subclasses in type 2 diabetic patients.** Diabetes Care, 2002; 25: 1704-8.
- Porras-Loaiza P, Jiménez-Munguía MT, Solorza-Feria J, et al. **Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds.** Int J Food Sci Tech, 2014; 49(2): 571-7.
- Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, Juárez-Rojas JG, et al. **Alteraciones de las lipoproteínas de alta y baja densidad en pacientes coronarios con C-LDL en meta pero C-HDL y triglicéridos anormales.** Arch Cardiol Mex, 2008; 78: 20-9.
- Precourt LP, Amre D, Denis MC, et al. **The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation.** Atherosclerosis, 2011; 214: 20-36.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. **The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family.** Genomics, 1996; 33: 498-507.
- Reyes-Caudillo E, Tecante A & Valdivia-López MA. **Dietary fiber and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds.** Food Chem, 2008; 107: 656-63.
- Ribas V, Sánchez-Quesada JL, Anton R, et al. **Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential.** Circ Res, 2004; 95 (8): 789-97.
- Ridker PM. **LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions.** Lancet, 2014; 384: 607-17.
- Rivelles AA, Maffettone A, Vessby B, et al. **Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects.** Atherosclerosis, 2003; 167: 149-58.
- Rosenbaum D, Hansel B, Bonnefont-Rousselot D, et al. **Waist circumference is a strong and independent determinant of the distribution of HDL subfractions in overweight patients with cardiovascular risk factors.** Diab Vasc Dis Res, 2012; 9 (2): 153-9.
- Rosenson RS, Brewer HB, Chapman MJ, et al. **HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events.** Clin Chem, 2011; 57 (3): 392-410.
- Rothblat GH, De la Llera-Mora M, Atger V, et al. **Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights.** J Lipid Res, 1999; 40: 781-96.
- Rye KA, Bursil CA, Lambert G, et al. **The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL.** J Lipid Res, 2009; 50: S195-200.



- Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Pérez-Cruz C, et al. **Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut Microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet.** Sci Rep, 2017; 7: 4716.
- Scheffer PG, Bos G, Volwater HG, et al. **Associations of LDL size with *in vitro* oxidizability and plasma levels of *in vitro* oxidized LDL in Type 2 diabetic patients.** Diabet Med, 2003; 20: 563-7.
- Scorletti E & Byrne CD. **Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease.** Annu Rev Nutr, 2013; 33: 231-48.
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, et al. **Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins.** J Lipid Res, 2001; 42: 1346-67.
- Siri PW & Krauss RM. **Influence of dietary carbohydrate and fat on LDL and HDL particle distributions.** Curr Atheroscler Rep, 2005; 7: 455-9.
- Skinner ER. **High-density lipoprotein subclasses.** Curr Opin Lipidol, 1994; 5: 241-7.
- Solga S, Alkhuraishe AR, Clark JM, et al. **Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease.** Dig Dis Sci. 2004; 49: 1578-83.
- Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, et al. **Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999; 19: 2214-25.
- Stefan N, Kantartzis K & Häring HU. **Causes and metabolic consequences of fatty liver.** Endocrine Reviews, 2008; 29 (7): 939-60.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. **Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.** N Engl J Med, 1989; 320: 915:24.
- Superko H, Pendyala RL, Williams PT, et al. **High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease.** J Clin Lipidol, 2012; 6(6): 496-523.
- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. **Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population.** Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005; 288: E462-8.
- Teoh SL, Lai NM, Vanichkulpitak P, et al. **Clinical evidence on dietary supplementation with chia seed (*Salvia hispanica* L.): a systematic review and meta-analysis.** Nutr Rev, 2018; 76(4): 219-242.
- Turrone F, Duranti S, Bottacini F, et al. ***Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal.** Food Microbiol, 2014; 437(5): 1-8.
- Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, et al. **Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver.** J Hepatol, 1997, 27: 103-7.
- **USDA: National Nutrient Database for Standard Reference.** Seeds, chia seeds, dried. Release 27. Basic Report: 12006. (2004). Nutrient Data Laboratory Home Page, Edited by U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service.
- Utarwuthipong T, Komindr S, Pakpeankitvatana V, et al. **Small dense low-density lipoprotein concentration and oxidative susceptibility changes after consumption of soybean oil, rice bran oil, palm oil and mixed rice bran/palm oil in hypercholesterolaemic women.** J Int Med Res, 2009; 37: 96-104.

- Valdivia-López MA & Tecante A. **Chia (*Salvia hispanica*): A review of native Mexican seed and its nutritional and functional properties.** Adv Foods Nutr Res, 2015; 75: 53-75.
- Volynets V, Kuper MA, Strahl S, et al. **Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).** Dig Dis Sci, 2012; 57: 1932-41.
- Von Eckardstein A, Nofer JR & Assmann G. **High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001; 21: 13-27.
- Vuksan V, Jenkins AL, Brissette C, et al. **Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized controlled trial.** Nutr Metab Cardio Dis. 2017; 27: 138-46.
- Vuksan V, Jenkins AL, Dias AG, et al. **Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.).** Eur J Clin Nutr, 2010; 64: 436-8.
- Vuksan V, Whitham D, Sievenpiper J, et al. **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. 2007; 30: 2840-10.
- Wägner, AM, Jorba O, Rigla M, et al. **LDL-cholesterol/apolipoprotein B ratio is a good predictor of LDL phenotype B in type 2 diabetes.** Acta Diabetol, 2002; 39: 215-20.
- Welch AA, Shakya-Shrestha S, Lentjes MA, et al. **Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the product-precursor ratio [corrected] of alpha-linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort.** Am J Clin Nutr, 2010; 92: 1040:51.
- West IC. **Radicals and oxidative stress in diabetes.** Diabetic Med, 2000; 17: 171-80.
- Wexler HM. **Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty.** Clin Microbiol Rev, 2007; 593-621.
- Witztum JL & Steinberg D. **Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.** J Clin Invest, 1991; 88: 1785-92.
- Wong VW, Tse CH, Lam TT, et al. **Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis-a longitudinal study.** PLoS One, 2013; 8:e62885.
- Yokoyama S. **Assembly of high-density lipoprotein.** Arterioscler Thromb Vas Biol, 2006; 26 (1): 20-7.
- Young S & Mc Eneny J. **Lipoprotein oxidation and atherosclerosis.** Biochem Soc Trans, 2001; 29: 358-62.
- Yu-Poth S, Etherton TD, Reddy CC, et al. **Lowering dietary saturated fat and total fat reduces the oxidative susceptibility of LDL in healthy men and women.** J Nutr, 2000; 130: 2228-37.

- Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, et al. **Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study.** J Hepatol, 2007; 47: 711-17.

## Consentimiento informado



Instituto Nacional de Cardiología  
Ignacio Chávez  
Evolución Continua



"2015 Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO: "Efecto de la Chía (*Salvia hispánica*) sobre las características estructurales y funcionales de las lipoproteínas de alta densidad en sujetos con hígado graso no alcohólico y resistencia a la insulina".

Investigador responsable: M en C. Aida Xochitl Medina Urrutia

## ESTIMADO SEÑOR (A):

Se le esta invitando a participar en este estudio de investigación debido a que usted participó en el proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerosa), y se identificó que usted presenta hígado graso y resistencia a la insulina. Antes de que decida participar en esta intervención, es importante que sepa por qué se está haciendo esta investigación y lo que implica. Por favor tómese todo el tiempo necesario para leer la siguiente información.

Pregunte cualquier cosa que no le haya quedado del todo clara o si desea más información.

## PROPÓSITO Y DESCRIPCIÓN:

La obesidad en México ha incrementado de forma considerable en las últimas décadas. Los cambios desfavorables en los hábitos de alimentación y la poca actividad física han favorecido que aumente el número de personas con hígado graso. Esta enfermedad es importante, por que en algunos casos puede dar lugar a enfermedades crónicas del hígado, diabetes mellitus e incluso infartos. En el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" estamos realizando un estudio de intervención en personas con hígado graso y resistencia a la insulina.

Hasta el momento no hay un tratamiento específico para estas alteraciones hepáticas; pero algunos estudios han mostrado que al incluir ciertos alimentos llamados "Alimentos funcionales" pueden mejorar estas anomalías. La chía (*Salvia hispánica*) es una semilla nativa del sur de México y el norte de Guatemala, que, por sus propiedades nutrimentales, medicinales y por su composición, puede corregir la resistencia a la insulina y el hígado graso.

## EL OBJETIVO DE ESTA PARTE DEL ESTUDIO INCLUYE:

Analizar en una serie de pacientes con diagnóstico tomográfico de hígado graso y resistencia a la insulina el efecto del consumo de 25g de chía molida sobre la mejora en la resistencia a la insulina, perfil de grasas en sangre, y si los posibles cambios pueden ayudar a mejorar el hígado graso.

## PROCEDIMIENTOS:

Usted acudirá por tres meses, en 3 visitas mensuales al Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", donde le atenderá una nutrióloga. Si usted esta de acuerdo en participar y reúne las condiciones para este estudio, se le harán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se le hará un breve interrogatorio para conocer sus condiciones de salud a partir de su última visita al Departamento de Endocrinología.
2. El nutriólogo le hará un examen físico midiendo su estatura, su peso, circunferencia de cintura, de cuello y de brazo, así como una serie de mediciones del tejido adiposo, para medir la cantidad de grasa corporal, además de medir su frecuencia cardiaca y presión arterial.
3. Se le tomará una muestra de sangre, equivalente a 4 cucharadas (40 ml) en las visitas mensuales (tres).

## Consentimiento informado



Instituto Nacional de Cardiología  
Ignacio Chávez  
Evolución Continua



"2015 Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

4. Será necesario que se presente en ayuno de 12 horas, sin haber ingerido exceso de bebidas alcohólicas.
5. Para lograr los objetivos, le será extraída una muestra de sangre. Parte de la muestra servirá para medir los niveles de glucosa y el perfil de lípidos, para conocer su perfil metabólico y dar seguimiento a las mediciones que se le hicieron en la cita anterior.
6. Después de esta serie de procedimientos, usted pasará con la nutrióloga asignada, quien le dará las instrucciones acerca de su alimentación durante el estudio. Así como de la programación de las citas mensuales.
7. Se le proporcionará la semilla Chía (25 gramos), en bolsitas individuales para su consumo diario, así como las instrucciones precisas de cómo comerla. Se entregará la cantidad necesaria para un mes, es decir, hasta que usted acuda a su próxima visita.
8. Durante el transcurso del estudio una nutrióloga se encargará de realizar contacto telefónico 1 vez por semana, para asegurarse que usted no tenga dudas sobre su alimentación, o presente alguna molestia con el consumo de la Chía.
9. Se le practicará el estudio radiológico conocido como Tomografía Computada, al final del estudio, para conocer la cantidad de grasa en hígado.

### RIESGOS FÍSICOS:

Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparece en varios días. El consumo de la chía en algunas personas puede ocasionar molestias como son distensión abdominal, náusea, estreñimiento o cólicos, es necesario que esta sintomatología la comunique a la nutrióloga para que haga las modificaciones pertinentes.

### RIESGOS DE LA INFORMACIÓN:

La información personal, la obtenida por el cuestionario y los resultados de laboratorio se codificarán (su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe que se genere del estudio). Toda la información que se obtenga, se almacenará en un lugar seguro y nos ajustaremos a los procedimientos internos y regulaciones gubernamentales para proteger la información personal y de laboratorio, se consultará para comprobar que es correcta y corresponde a los exámenes que le fueron practicados. Esto hará el personal que participa en la realización del estudio y que mantendrá la confidencialidad de su información.

### BENEFICIOS:

La visita al médico, los exámenes de laboratorio y el estudio radiológico son sin costo para usted. Es importante que usted sepa que no percibirá pago alguno por participar de manera voluntaria en el estudio. Los resultados de lípidos en sangre, glucosa, cifras de tensión arterial y la detección de la presencia de hígado graso permitirán tomar medidas preventivas en su salud.

Los resultados de estas pruebas las podrá usted recoger en 2 semanas.

Su participación en esta investigación podrá ayudar a las personas con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y aquellas que tengan hígado graso en un futuro, a través de mejoras en los diagnósticos y los tratamientos.

### PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y DERECHO DE LAS PERSONAS A TERMINAR SU PARTICIPACIÓN.

Su participación en este estudio es voluntaria, y usted puede rehusarse a participar. Si decide participar se le pedirá que firme esta forma de consentimiento.

En caso de tener alguna duda sobre el estudio, por favor comunicarse con la M en C Aída Xochitl Medina Urrutia, responsable del estudio, teléfono: 5573 2911 ext. 2911 o con la Nutrióloga María del Carmen González Salazar, en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Continuación

Consentimiento informado



Instituto Nacional de Cardiología  
Ignacio Chávez  
Evolución Continua



"2015 Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Estoy de acuerdo con participar en este estudio.

Firma del participante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del participante

Firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo

Dirección completa

Firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo

Dirección completa

Firma de la persona \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Que aplicó la carta  
De consentimiento

Nombre completo

## Hoja de asistencia



### DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA

**"Efecto de la chía (Salvia Hispánica) sobre las características estructurales y funcionales de las lipoproteínas de alta densidad en sujetos con ligado de grasa no alcohólico y resistencia a la insulina"**

#### Control Visitas-Nutrición

Nombre:										
F/Nac:										
Edad:										
Folio G.E.A.C.:										
Genotipo:										
	Visita Basal		Visita 1		Visita 2		Visita 3		Visita Final	
Fecha:										
Peso (kg):										
Talla(cm):										
C.Cintura(cm):										
C.Cuello I(cm):										
C.Cuello 2(cm):										
P. Brazo(cm):										
PC1 (mm):										
PC2(mm):										
PSE(mm):										
PC1(mm):										
IMC (kg/m2):										
Rec Dieta habitual										
Dieta indicada:										
TA 1(mmHg):										
TA 2(mmHg):										
TA 3(mmHg):										
Entrega/bolsa vacía:										
Eventos adversos:										
Semana	1	2	3	4	5	6	7	8		
Fecha										
Contacto telefónico										

Elaboró: L.Nut.P. María del Carmen González Salazar  
Nutrionista adscrita al Departamento de Endocrinología