



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**SUPLEMENTACIÓN CON ALTAS DOSIS DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3:
EICOSAPENTAENOICO (EPA) Y DOCOSAHEXAENOICO (DHA) SOBRE LOS
LINFOCITOS T CD4+ Y PARÁMETROS INFLAMATORIOS Y METABÓLICOS DE
PACIENTES CON OBESIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANGÉLICA IRAIS BORJA MAGNO

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO ENRIQUE GÓMEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO. MAYO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado, quiero agradecer a:

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que me abrió las puertas y aprendí tanto de sus profesores cada semestre en este programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que recibí, que me permitió desarrollar mi trabajo de investigación y enfocarme a él como prioridad.

Al Dr. Francisco Enrique Gómez Rodríguez, que me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió aprender, proponer, equivocarme, y que confió en mi para desarrollar este proyecto.

A los investigadores de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), en especial a la Dra. Lilia G. Noriega López y a la Dra. Martha Guevara Cruz.

A la Dra. Janette Furuzawa Carballeda por que aportó mucho a este proyecto.

A la Dra. Clorinda Arias y al Dr. Julio Granados quienes fueron parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Barry Sears por la donación de los suplementos que se utilizaron en este estudio y por aportar ideas al mismo.

A la Dra. Yolanda Chirino por su apoyo y seguimiento al final de este proceso

A Guillermo Ordaz Nava, por apoyarme en intervenciones, por ser mi inspiración y mi compañero de vida.

A mi familia, por el apoyo que recibí de todos.

A los amigos que hice en el laboratorio, por hacer los días de este proceso mucho más amenos y divertidos.

DEDICATORIA

Tal vez suene algo egocéntrico, aunque esa no es la intención, sin embargo, quiero dedicarme esta tesis, ya que es el resultado de mi esfuerzo, de la pasión que sentí por el desarrollo de esta investigación, de lo mucho que disfruté pipetear cada experimento, de la decepción cuando no salía y la satisfacción enorme cuando por fin logré que la técnica saliera.

Es el resultado de las técnicas que aprendí en el laboratorio, de otras que tuve que aprender en otros laboratorios, de pasar fines de semana leyendo y no sentir que eso fuera un castigo, al contrario.

Tuve la satisfacción de que CONACyT apoyó este proyecto (ya casi cuando terminé), sin embargo, eso nunca nos detuvo, avanzamos con los recursos que teníamos y gracias a las personas que nos apoyaron.

Esta tesis es el resultado de conocer tantas personas que enriquecieron mi camino.

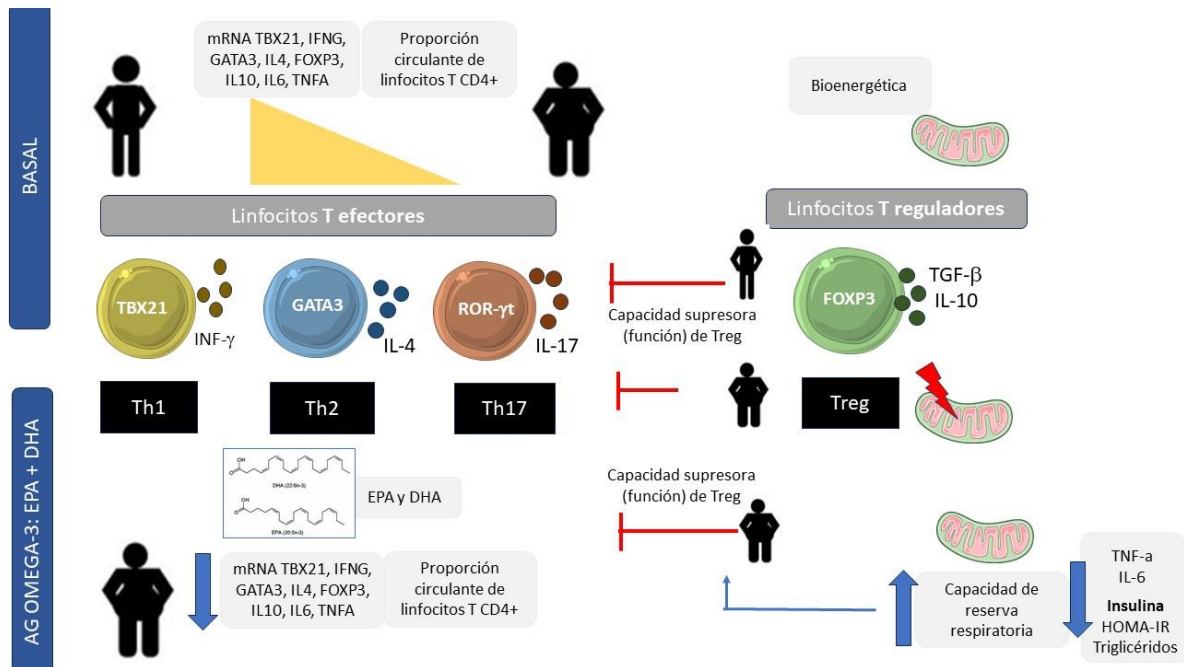
Esta tesis es el resultado de que no hay nada imposible, aunque yo así lo vea.

ÍNDICE

RESUMEN GRÁFICO	6
PUNTOS A RESALTAR	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1.0. INTRODUCCIÓN	11
<i>1.1. Obesidad y estado inflamatorio de bajo grado</i>	11
<i>1.2. Linfocitos T reguladores en presencia de obesidad</i>	12
<i>1.3. Metabolismo y función de los linfocitos Treg</i>	13
<i>1.4. Ácidos grasos omega-3 sobre la inflamación</i>	14
<i>1.5. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre los linfocitos T CD4+</i>	14
<i>1.6. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre los linfocitos Treg</i>	15
<i>1.7. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre bioenergética</i>	15
<i>1.8. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre marcadores inflamatorios y metabólicos en en plasma</i>	16
2.0. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	17
<i>2.1. Objetivo General</i>	17
<i>2.2. Objetivos Específicos</i>	17
3.0. HIPÓTESIS	18
4.0. SUJETOS Y MÉTODOS	19
<i>4.1. Población de estudio</i>	19
<i>4.2. Diseño del estudio</i>	19
<i>4.3. Características de la suplementación</i>	20
<i>4.4. Antropometría, composición corporal y presión arterial</i>	22
<i>4.5. Ensayo clínico-1</i>	22
<i>4.5.1. Consumo, apego al tratamiento y cuantificación de ácidos grasos</i>	22
<i>4.5.2. Determinaciones realizadas en sangre total</i>	23
<i>4.5.3. Expresión de mRNA de marcadores de linfocitos T CD4+</i>	23
<i>4.5.4. Parámetros inflamatorios en plasma</i>	25
<i>4.5.5. Parámetros metabólicos</i>	25
<i>4.6. Ensayo clínico-2</i>	25
<i>4.6.1. Inmunofenotipificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en PBMC</i>	26

4.6.2. <i>Ensayo de supresión de la proliferación celular mediado por Treg</i>	30
4.6.3. <i>Bioenergética de linfocitos Treg</i>	33
4.7. <i>Análisis estadístico</i>	34
5.0. RESULTADOS	35
5.1. <i>Resultados del Ensayo Clínico-1</i>	35
5.1.1. <i>Efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre la expresión de genes de linfocitos T CD4+ en sujetos con obesidad</i>	35
5.1.2. <i>Efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre parámetros inflamatorios y metabólicos</i>	41
5.1.3. <i>Apego y consumo del suplemento de EPA y DHA</i>	43
5.2. <i>Resultados del Ensayo clínico-2</i>	46
5.2.1 <i>Efecto de la suplementación con ácidos grasos omega-3 sobre la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en pacientes con obesidad</i>	46
5.2.2. <i>Efecto de la suplementación de AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la funcionalidad de los linfocitos Treg en pacientes con obesidad.</i>	50
5.2.3. <i>Efecto de la suplementación de AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la bioenergética de los linfocitos Treg en pacientes con obesidad.</i>	51
6.0. DISCUSIÓN	54
6.1. <i>Consumo del suplemento e indicadores de apego</i>	54
6.2. <i>Resolvinas en plasma</i>	55
6.3. <i>Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre marcadores inflamatorios en plasma</i>	56
6.4. <i>Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre los linfocitos T CD4+ circulantes</i>	58
6.5. <i>Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre los linfocitos Treg (funcionalidad y bioenergética).</i>	59
6.6. <i>Efecto de la suplementación con AG omega-3 sobre parámetros metabólicos</i>	61
7.0. CONCLUSIÓN	64
8.0 PERSPECTIVAS	64
9.0. REFERENCIAS	65

RESUMEN GRÁFICO



PUNTOS A RESALTAR

- Los linfocitos T CD4+, como Th1, Th2, Th17 y T reguladores se encuentran incrementados en sangre periférica de personas con obesidad.
- Los linfocitos T reguladores presentan disminuida la capacidad supresora de la proliferación celular, asociado con alteraciones en la función mitocondrial en sujetos con obesidad.
- La suplementación con ácidos grasos omega-3: EPA y DHA disminuyó la proporción de Th1, Th2 y Th17 en sangre periférica de personas con obesidad
- La suplementación con ácidos grasos omega-3: EPA y DHA mejoró marcadores de función mitocondrial, específicamente la capacidad de reserva respiratoria, lo que se asoció con un incremento en la capacidad supresora de la proliferación celular.
- La suplementación con ácidos grasos omega-3: EPA y DHA mejoró la concentración plasmática de citocinas inflamatorias y marcadores metabólicos

RESUMEN

Antecedentes: En la obesidad se presenta un estado inflamatorio crónico de bajo grado y sistémico, el cual se caracteriza por un incremento de linfocitos T CD4+ efectoros en sujetos con obesidad. Los ácidos grasos (AG) omega-3: eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) han mostrado un efecto antiinflamatorio que podría modular las alteraciones inflamatorias y metabólicas en la obesidad.

Objetivo: Determinar el efecto de la suplementación con AG omega-3: EPA y DHA sobre la expresión de marcadores y la proporción circulante de los linfocitos T CD4+ y sobre parámetros inflamatorios y metabólicos de pacientes con obesidad

Metodología: Este es un estudio prospectivo en el que se incluyeron participantes con obesidad (IMC ≥ 35 kg/m²) y sujetos normopeso (IMC entre 18.5 y 24.9 kg/m²) que llamaremos grupo control. Este estudio se conformó de dos ensayos clínicos, en el primero se reclutaron 12 mujeres con obesidad y 12 sin obesidad que recibieron 4.8 g/d de EPA y DHA por 3 meses y un mes sin intervención, y se evaluó la expresión de genes de linfocitos T CD4+ (TBX21, INF- γ , GATA3, IL4, FOXP3, IL10, TNFA y IL6) por q-PCR de forma mensual. En el segundo ensayo clínico se reclutaron 8 mujeres normopeso y 15 con obesidad, solo el grupo con obesidad recibió 5.2 g/d de EPA y DHA por 2 meses. Se evaluó la proporción circulante de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ por citometría de flujo. Se determinó la funcionalidad y la bioenergética de los linfocitos Treg, mediante un ensayo de supresión de la proliferación celular mediado por Treg y por un analizador de flujo extracelular, respectivamente. En ambas cohortes se determinaron parámetros metabólicos (perfil de lípidos, glucosa, insulina, índice HOMA-IR) e inflamatorios en plasma (factor de necrosis tumor alfa (TNF- α , interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, TGF- β , leptina, adiponectina).

Resultados: En el primer ensayo clínico se observó que la expresión de todos los genes de linfocitos T CD4+ evaluados fue mayor en el grupo con obesidad comparado con el grupo control, lo cual disminuyó desde el primer mes de tratamiento y durante el estudio. En la segunda parte del estudio, se observó mayor proporción de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en el grupo con obesidad al comparar con el grupo control, que disminuyeron

después de 1 mes de suplementación con EPA y DHA, excepto la proporción de Treg, que no cambió. La funcionalidad de las células Treg se encontró significativamente disminuida en el grupo con obesidad al comparar con el grupo control, lo cual se relacionó con alteraciones en la bioenergética de las células Treg. La suplementación por dos meses con EPA y DHA mejoró la funcionalidad y la bioenergética de las células Treg. Los parámetros inflamatorios (IL-6 y TNF- α) y metabólicos (insulina, HOMA-IR y triglicéridos) mejoraron con la suplementación en el grupo con obesidad.

Conclusión: La suplementación con EPA y DHA mejoró el estado metabólico e inflamatorio de pacientes con obesidad, mediante la disminución de la proporción circulante de linfocitos T CD4+ y mediante el incremento de la funcionalidad de Treg a través de una mejora en la bioenergética de estas células, sin pérdida de peso ni cambios en el estilo de vida.

ABSTRACT

Background: Obesity is complicated with chronic systemic low-grade inflammation, which is characterized by an increase in effector CD4⁺ T lymphocytes including regulatory T cells (Treg). Omega-3 fatty acids (FA): eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid have shown an anti-inflammatory effect, that may modulate inflammatory and metabolic alterations in obesity.

Objective: To determine the effect of omega-3 FA: EPA and DHA supplementation on the expression of markers and proportion of CD4⁺ T lymphocytes and plasma inflammatory and metabolic markers in patients with obesity.

Methods: This is a prospective study that included participants with obesity (BMI >35 kg/m²) and with normal weight (BMI 18.5 – 23.9 kg/m²). This study consisted in two clinical trials, the first one included 12 women with obesity and 12 with normal weight (control group), who received 4.8 g/d of EPA and DHA for 3 months and one month without intervention, the evaluation of mRNA expression of CD4⁺ T lymphocyte genes (TBX21, IFNG, GATA3, IL4, FOXP3, IL10, TNFA, IL6) by q-PCR was performed monthly. In the second clinical trial, included 8 women without obesity and 15 with obesity, only the group with obesity received 5.2g of EPA and DHA supplementation for 2 months. The proportion of circulating T CD4⁺ lymphocyte subsets by flow cytometry were determined, and the Treg function and bioenergetics were evaluated by Treg-mediated suppression of cell proliferation assay and by an extracellular flux analyzer, respectively. Metabolic (lipid profile, glucose, insulin, and HOMA-IR) and inflammatory (tumoral necrosis factor alfa (TNF- α), interleukin (IL) IL-6, IL-8, leptin, and adiponectin) markers were determined in both phases of the study.

Results: In the first clinical trial, we observed higher expression of genes of CD4⁺ T lymphocytes in the group with obesity, which decreased from the first month of treatment and during the study. In the second clinical trial, there was a higher proportion of CD4⁺ T lymphocyte subsets compared with the control group, there was a significant decrease of Th1, Th2 and Th17, but not Treg after one-month of EPA and DHA supplementation. The Treg proliferation suppressor capacity was decreased in the group with obesity compared with the control group, which was related with the alteration in Treg bioenergetics in the group with obesity. After 2-month supplementation with EPA and DHA, we observed a tendency to

increase the Treg proliferation suppressor capacity which was accompanied by the improvement in Treg bioenergetics. The improvement of inflammatory (IL-6 and TNF- α) and metabolic (insulin, HOMA-IR and triglycerides) was observed at the first month and during the EPA and DHA supplementation in both groups.

Conclusion: The supplementation with EPA and DHA improved metabolic markers and modulated inflammation by decreasing the proportion of effector CD4⁺ T lymphocytes and inflammatory cytokines and increased Treg function by improving their bioenergetics in patients with obesity without weight loss of lifestyle changes.

1.0. INTRODUCCIÓN

1.1. *Obesidad y estado inflamatorio de bajo grado*

Se ha descrito que en la obesidad se presenta un estado inflamatorio sistémico crónico de bajo grado caracterizado por niveles altos de proteínas proinflamatorias en plasma como leptina, interleucina (IL)-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Ellulu et al., 2017). Asimismo, existe un incremento de leucocitos (Bonaccio et al., 2016; Purdy & Shatzel, 2021), principalmente de linfocitos T, los cuales se clasifican en T CD4+ también llamados T cooperadores o T *helper* (Th) y T CD8+ o T citotóxicos. El incremento de linfocitos observado en la obesidad es debido a los linfocitos T CD4+ (Van Der Weerd et al., 2012).

Los linfocitos T CD4+ abarcan distintas subpoblaciones (**Figura 1**), entre ellas se encuentran: los linfocitos Th1 que se caracterizan por expresar el factor de transcripción maestro T-box (TBX21) y sintetizar principalmente interferón gamma (INF- γ); los linfocitos Th2 que se caracterizan por expresar el factor de transcripción maestro GATA3 y sintetizar principalmente IL-4; los linfocitos Th17 que se caracterizan por expresar el factor de transcripción maestro ROR- γ t y producen principalmente IL-17; y los linfocitos T reguladores (Treg) que se caracterizan por expresar el factor de transcripción maestro FOXP3 y liberar citocinas como IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Travers et al., 2015). Los linfocitos Th1 y Th17 son considerados efectores por participar en procesos principalmente inflamatorios, en el caso de los linfocitos Th2 se consideran efectores por su papel en las reacciones alérgicas (**Figura 1**).

Los linfocitos T CD4+ tienen un papel importante en el estado inflamatorio del tejido adiposo en la condición de obesidad. Se ha descrito que la subpoblación Th1 promueve el reclutamiento y activación de macrófagos con fenotipo inflamatorio (M1) a través de la síntesis de INF- γ . Los linfocitos Th2 promueven la polarización de macrófagos a fenotipo anti-inflamatorio (M2) mediante la síntesis de IL-4. En cuanto al papel de los linfocitos Th17, no se ha descrito en tejido adiposo, sin embargo, el incremento de linfocitos Th17 en tejido adiposo se relaciona con el incremento de IL-6 (Nyambuya et al., 2019), en circulación, el incremento de Th17 se relacionó con alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad

(Artemniak-Wojtowicz et al., 2022). Los linfocitos Th2 y Treg regulan el proceso inflamatorio, mientras que las células Th1 y Th17 son células con actividad proinflamatoria (Nyambuya et al., 2019; Purdy & Shatzel, 2021). En conjunto, los linfocitos T CD4+ y sus subpoblaciones celulares, juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes y síndrome metabólico (Ahmed et al., 2021). El estado inflamatorio crónico de la obesidad, se caracteriza por el incremento de linfocitos T CD4+, lo cual podría tener relación con alteraciones en la regulación inmunológica, la cual se encuentra en gran parte mediada por los linfocitos Treg (Han & Levings, 2013).

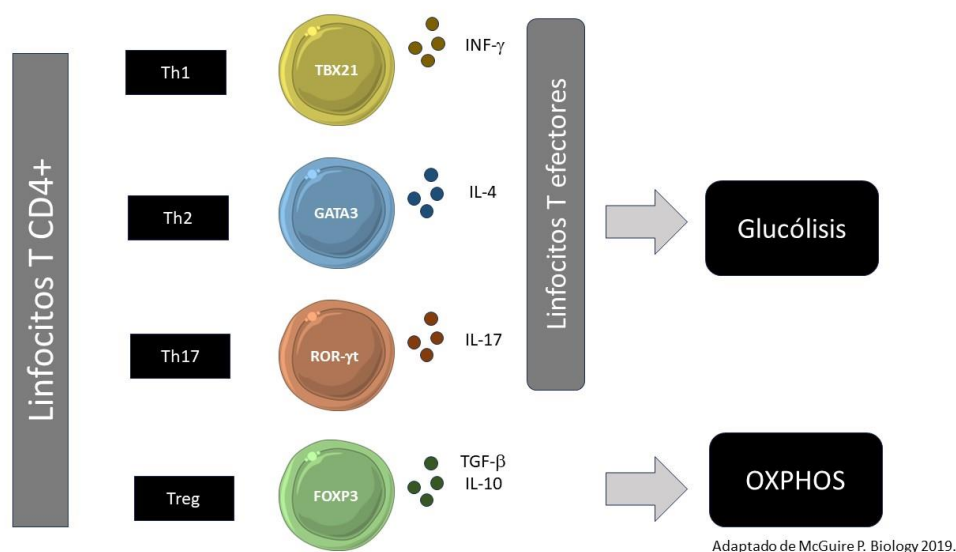


Figura 1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4+. Dentro de la célula se muestra el factor de transcripción maestro de cada subpoblación, los círculos más pequeños ilustran las citocinas que cada subpoblación sintetiza de forma principal. Los linfocitos Th1, Th2 y Th17 se consideran linfocitos efectores y la vía metabólica preferencial por la cual obtienen energía es a través de la glucólisis. Los linfocitos T reguladores (Treg) son linfocitos con función antiinflamatoria y utilizan principalmente la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para alcanzar su demanda energética.

1.2. Linfocitos T reguladores en presencia de obesidad

Los linfocitos Treg contribuyen en la regulación de la inflamación, se caracterizan por expresar el factor de transcripción de la familia *forkhead* p3 (FOXP3) y por la alta expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25⁺). Por lo que sus marcadores característicos de esta subpoblación son (CD4⁺ CD25⁺FOXP3⁺). Los linfocitos Treg pueden suprimir la respuesta de distintas células incluyendo linfocitos B, células natural killer (NK), células dendríticas, monocitos, linfocitos CD4⁺ efectores y CD8⁺ mediante diferentes mecanismos.

Se ha descrito que modulan células presentadoras de antígeno mediante la expresión de la molécula de inhibición llamada linfocito T citotóxico asociado a antígeno 4 (CTLA-4); por otra parte mediante la síntesis de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, TGF- β , contribuye a limitar los procesos inflamatorios; asimismo, la captación de IL-2 a través del receptor de IL-2 de las Treg limita la proliferación de linfocitos T CD4⁺ efectores y por último, uno de los mecanismo de supresión más importantes incluye el contacto célula a célula, de esta manera inducen apoptosis de linfocitos efectores mediante la síntesis de granzimas y perforinas (Schmidt et al., 2012).

En modelo murino se ha descrito una disminución en la cantidad de linfocitos Treg infiltrantes en tejido adiposo con obesidad (Chen et al., 2013). En humanos, la evidencia no es concluyente, algunos reportes muestran que la cantidad de linfocitos Treg se encuentra disminuida en tejido adiposo de pacientes con obesidad mórbida secundario a un incremento de Th1 y de IFN- γ (Bradley et al., 2022); y en sangre periférica de pacientes con obesidad considerada por los autores como índice de masa corporal (IMC) superior a 27 kg/m² (Wagner et al., 2013). Mientras que otros reportes, describen un incremento en la expresión de marcadores de linfocitos Treg en tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes con obesidad mórbida (Travers et al., 2015; Zeyda et al., 2011), así como en sangre periférica (Gómez F, 2011; Van Der Weerd et al., 2012). No se conoce el motivo de estas inconsistencias, sin embargo, es posible que la cantidad de linfocitos Treg dependa del grado de obesidad del sujeto, sin embargo, se requieren más estudios que permitan dilucidar, en humanos, la proporción de Treg en distintos niveles de IMC.

Se ha sugerido que la obesidad y la resistencia a la insulina podrían suprimir la diferenciación de linfocitos Treg o bien podrían alterar la función estas células (Feurerer et al., 2009), sin embargo, se requieren más estudios que contribuyan a dilucidar la cantidad y función de Treg en personas con obesidad.

1.3. Metabolismo y función de los linfocitos Treg

Las vías metabólicas activas a través de las cuales los linfocitos alcanzan su requerimiento energético son cruciales en su activación, función y fenotipo (Palmer et al., 2015). El metabolismo de los linfocitos T CD4⁺ efectores como Th1, Th2 y Th17 es preferentemente glucolítico (Palmer et al., 2015), mientras que los linfocitos Treg dependen del metabolismo

oxidativo (Newton et al., 2016), es decir, la fosforilación oxidativa (OXPHOS), la cual les permite mantener un fenotipo y función reguladora y supresora de inflamación (Breda et al., 2019). La activación de vías oxidativas en las células Treg es mediada por FOXP3 del cual depende la sobreexpresión de los complejos mitocondriales incluyendo el complejo V mitocondrial o ATP sintasa, para producir más ATP (Howie et al., 2017). Sin embargo, también se ha descrito que la activación de los complejos mitocondriales III y IV en la OXPHOS está involucrado específicamente en la generación de Treg (Yin & O'Neill, 2021).

1.4. Ácidos grasos omega-3 sobre la inflamación

Los AG omega-3 son ácidos grasos poliinsaturados, que tienen su primer doble enlace en el carbono 3 de la nomenclatura omega. El ácido alfa linolénico (ALA) (18:3n-3) es un AG omega-3, es esencial ya que debemos obtenerlo de la dieta, el ser humano no tiene las desaturasas para sintetizarlo. De ALA derivan el ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6n-3). Los ácidos grasos EPA y DHA se definen como dos tipos de ácidos grasos de la serie omega-3 de cadena muy larga, 20 carbonos con 5 insaturaciones en el caso de EPA y 22 carbonos con 6 insaturaciones en el caso de DHA. EPA y DHA han mostrado efectos antiinflamatorios (Kavyani et al., 2022; Schweitzer et al., 2021).

El efecto antiinflamatorio de los AG omega-3 es en parte mediado por la generación de mediadores lipídicos resolutivos (SPM) como resolvinas (Rv) de la serie E (RvE1 a 4) las cuales proceden de EPA, mientras que las Rv de la serie D (RvD1 a 6) se sintetizan a partir de DHA (Chiang & Serhan, 2020). Los SPM se sintetizan a partir de al menos dos reacciones de oxigenasas como ciclooxigenasa o lipoxigenasa, sin embargo, la capacidad de los leucocitos de producir SPM es muy baja (Schebb et al., 2022).

1.5. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre los linfocitos T CD4+

Se ha descrito que los AG omega-3 atenúan la activación de linfocitos T CD4+ (Yang-Yi Fan, et al., 2018) y la migración de los linfocitos T CD4+ al tejido adiposo (Cucchi et al., 2020). *In vitro* se ha observado que los linfocitos T CD4+ tratados con EPA y DHA tienen una menor síntesis de citocinas y una disminución en la diferenciación a fenotipo Th1 (Lee et al., 2021).

Por otra parte, las SPM como RvD1, RvD2 y maresinas disminuyen la diferenciación de linfocitos a fenotipos inflamatorios como Th1 y Th17 y promueven la diferenciación a Treg (Chiurchiù et al., 2016).

1.6. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre los linfocitos Treg

En un modelo murino *in vivo* y *ex vivo* se ha observado que los AG omega-3 incrementaron los linfocitos Treg (Carlsson et al., 2015; Kim & Lee, 2013). Un estudio en un modelo murino mostró que la administración de DHA incrementó la expresión de FOXP3⁺ y CTLA-4 (Carlsson et al., 2015). Por otra parte, una inyección intraperitoneal de EPA en un modelo murino de trasplante mostró un incremento en la población de células Treg (Iwami et al., 2011). Los ácidos grasos EPA y DHA podrían inducir la expresión de FOXP3 en linfocitos T CD4⁺ a través del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ), lo que podría disminuir la respuesta inflamatoria, esto se ha descrito en ratones a los que se les indujo daño hepático, en donde el consumo de EPA y DHA por 3 meses disminuyó el daño hepático inducido, a través del incremento de la proporción de Treg y expresión de PPAR γ en hígado (Iwami et al., 2011; Lian et al., 2015).

1.7. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre bioenergética

Se ha descrito que alteraciones en las mitocondrias de las células del sistema inmune, como los linfocitos, está vinculado a la progresión de la inflamación en la obesidad (Faas & de Vos, 2020). Como se mencionó anteriormente, los linfocitos con fenotipo proinflamatorio requieren principalmente de la vía glucolítica para cubrir su demanda energética de activación y producción de citocinas inflamatorias, mientras que, los linfocitos Treg requieren del metabolismo oxidativo para mantener su fenotipo antiinflamatorio y su capacidad de supresión de inflamación (Faas & de Vos, 2020; O'Neill et al., 2016). La disfunción mitocondrial de los linfocitos T genera un incremento en la vía glucolítica y promueve la diferenciación a fenotipos inflamatorios (Baixauli et al., 2015).

Los AG omega-3 podrían mejorar la función mitocondrial de las células del sistema inmune (Lyons et al., 2016). En mitocondrias de hígado y músculo, se ha descrito que la administración de AG omega-3 disminuye la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a través de la mejora en la dinámica mitocondrial, donde se ha descrito el incremento de marcadores de fusión mitocondrial, lo cual se ha vinculado con la mejora de la sensibilidad a la insulina (Putti et al., 2015).

1.8. Ácidos grasos omega-3 y su efecto sobre marcadores inflamatorios y metabólicos en plasma

En humanos, la evidencia muestra que la suplementación con AG omega-3, disminuye la concentración de TNF- α , IL-6 y proteína C reactiva (Li et al., 2014). Sin embargo, la heterogeneidad en la metodología descrita en diferentes estudios muestra resultados no concluyentes sobre el efecto de la suplementación con AG omega-3 sobre marcadores inflamatorios en plasma (Rangel-Huerta & Gil, 2018; Ridker et al., 2022). En la mayoría de los estudios en los que se ha encontrado la reducción de marcadores inflamatorios en plasma, utilizan dosis superiores a 3 g/d (Rangel-Huerta & Gil, 2018). Sin embargo, se han observado que 4g de EPA en individuos mayores de 45 años con hipercolesterolemia no mostró efectos sobre marcadores inflamatorios en plasma (Ridker et al., 2022).

A nivel metabólico, meta-análisis muestran que la suplementación con AG omega-3 no cambia la concentración de colesterol total, colesterol de baja densidad (LDL-C), ni aumenta significativamente la concentración de colesterol de alta densidad (HDL-C) (Y.-X. Liu et al., 2023).

El efecto de la suplementación de AG omega-3 a nivel metabólico, que se ha descrito de forma más consistente, es la reducción de triglicéridos, esto se ha descrito que es dosis dependiente (Y.-X. Liu et al., 2023; Yee et al., 2010). La Asociación Americana del Corazón (AHA) sugiere que para el manejo de hipertrigliceridemia se debe administrar una dosis de 4g/d de AG omega-3, en específico, sugiere un mínimo de 3g de EPA y DHA o solo EPA (Skulas-Ray et al., 2019).

Por otra parte, no es concluyente el efecto de la suplementación con AG omega-3 sobre niveles de insulina, índice HOMA-IR y glucosa. Se ha observado la disminución de Índice HOMA-IR, sin embargo, no todos los reportes en los que se ha dado una suplementación con AG omega-3 han mostrado esta disminución. Esto se debe a las diferentes dosis y grupos de estudio en los que estos ensayos clínicos se han llevado a cabo (Lalia & Lanza, 2016).

2.0. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la suplementación con altas dosis de ácidos grasos omega-3: eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) sobre los genes marcadores de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y la proporción circulante de subpoblaciones de linfocitos T CD4+, así como sobre parámetros inflamatorios y metabólicos en plasma de pacientes con obesidad.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar la expresión de genes de linfocitos T CD4+ en células mononucleares de sangre periférica, la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y la concentración de parámetros metabólicos e inflamatorios en plasma de pacientes con obesidad vs normopeso.
- Comparar la función y bioenergética de linfocitos Treg en pacientes con obesidad vs normopeso.
- Evaluar el efecto de la suplementación con altas dosis de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) sobre la expresión de genes de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en células mononucleares de sangre periférica en sujetos con obesidad.
- Evaluar el efecto de la suplementación con altas dosis de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) sobre la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en sujetos con obesidad.
- Evaluar el efecto de la suplementación con altas dosis de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) sobre la bioenergética y funcionalidad de las células T reguladoras de sujetos con obesidad.
- Evaluar el efecto de la suplementación con altas dosis de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA)

3.0. HIPÓTESIS

- La expresión de genes marcadores de linfocitos T CD4+, la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y los marcadores metabólicos e inflamatorios en plasma se encuentran incrementados en pacientes con obesidad al comparar con un grupo control.
- La suplementación con altas dosis de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) modula la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y el estado inflamatorio y metabólico de sujetos con obesidad.

4.0. SUJETOS Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), fue aprobado por el comité de ética del INCMNSZ con el número de referencia 1832 y con registro internacional NCT05219890 en *Clinical Trials*.

4.1. Población de estudio

Se estudiaron mujeres de entre 25 y 45 años con obesidad y se compararon con voluntarios normopeso, que fueron considerados como el grupo de referencia. Esta edad fue elegida para evitar sesgos por el proceso inflamatorio presente en la menopausia. No se controló por fase del ciclo menstrual. El grupo de pacientes con obesidad se conformó de participantes que tenían al menos obesidad Grado 2 ($\geq 35 \text{ kg/m}^2$) según lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2018), mientras que el grupo sin obesidad se conformó de voluntarios con un IMC entre 18.5 y 24.9 kg/m^2 (considerado como normal) (WHO, 2018). No se incluyeron pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedad renal, insuficiencia hepática, mujeres embarazadas o en lactancia materna, sujetos que hayan consumido algún suplemento nutricional 3 meses antes del estudio y/o que consuman medicamentos hipolipemiantes, antihipertensivos, hipoglucemiantes, esteroides, quimioterápicos, inmunosupresores. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado. Durante el estudio se les pidió que no consumieran ningún suplemento nutricional aparte de las cápsulas de aceite de pescado que fueron brindadas por el personal del estudio y que no cambiaran su dieta habitual ni nivel de actividad física.

4.2. Diseño del estudio

Este estudio corresponde a un ensayo clínico, prospectivo, experimental, abierto (no cegado) y comparativo.

La investigación se conformó por dos ensayos clínicos, conformados por cohortes diferentes (**Figura 2**):

- Ensayo clínico-1: Se desarrolló para determinar la efectividad de la suplementación de EPA y DHA sobre la expresión de marcadores de linfocitos T CD4+ en células

mononucleares de sangre periférica (PBMC) y marcadores inflamatorios y metabólicos en plasma.

- Ensayo clínico-2: Se desarrolló para determinar el efecto de la suplementación sobre la proporción circulante de subpoblaciones de linfocitos T CD4+, y determinar la funcionalidad y bioenergética de linfocitos Treg en pacientes con obesidad y marcadores inflamatorios y metabólicos en plasma.

La obtención de las muestras analizadas a lo largo de esta investigación, se realizaron en el INCMNSZ en la Unidad de paciente ambulatorio (UPA) posterior a un ayuno entre 8 y 12 hrs (en caso de que no se cumpliera con este requisito se reagendaba la visita). Se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA k2 para la obtención de todas las muestras de sangre.

4.3. Características de la suplementación

Todos los participantes recibieron 2 frascos de 120 cápsulas cada mes durante 3 meses. Los suplementos fueron donados por *Inflammation Research Foundation (Peabody, MA)*.

En el ensayo clínico-1, se pidió a los participantes que consumieran 8 cápsulas al día, repartidas en 2 tomas (4 en el desayuno y 4 en el almuerzo), correspondientes a una dosis de 4.8 g de AG omega-3 (3.2 g de EPA y 1.6 g de DHA). En el ensayo clínico-2, se pidió a los participantes que consumieran 7 cápsulas al día, para alcanzar una dosis de 5.2g (3.5g de EPA y 1.75g de DHA). Esto debido a que la presentación del producto cambió, y buscábamos dar la dosis más parecida posible para todos los participantes.

Esta dosis fue elegida ya que es la dosis mínima necesaria para alcanzar una concentración plasmática de EPA y DHA similar a dosis mayores de suplementación (Yee et al., 2010) y también se considera una dosis eficaz para mejorar la concentración de triglicéridos y disminuir el riesgo cardiovascular en un 25 % (Kris-Etherton et al., 2019).

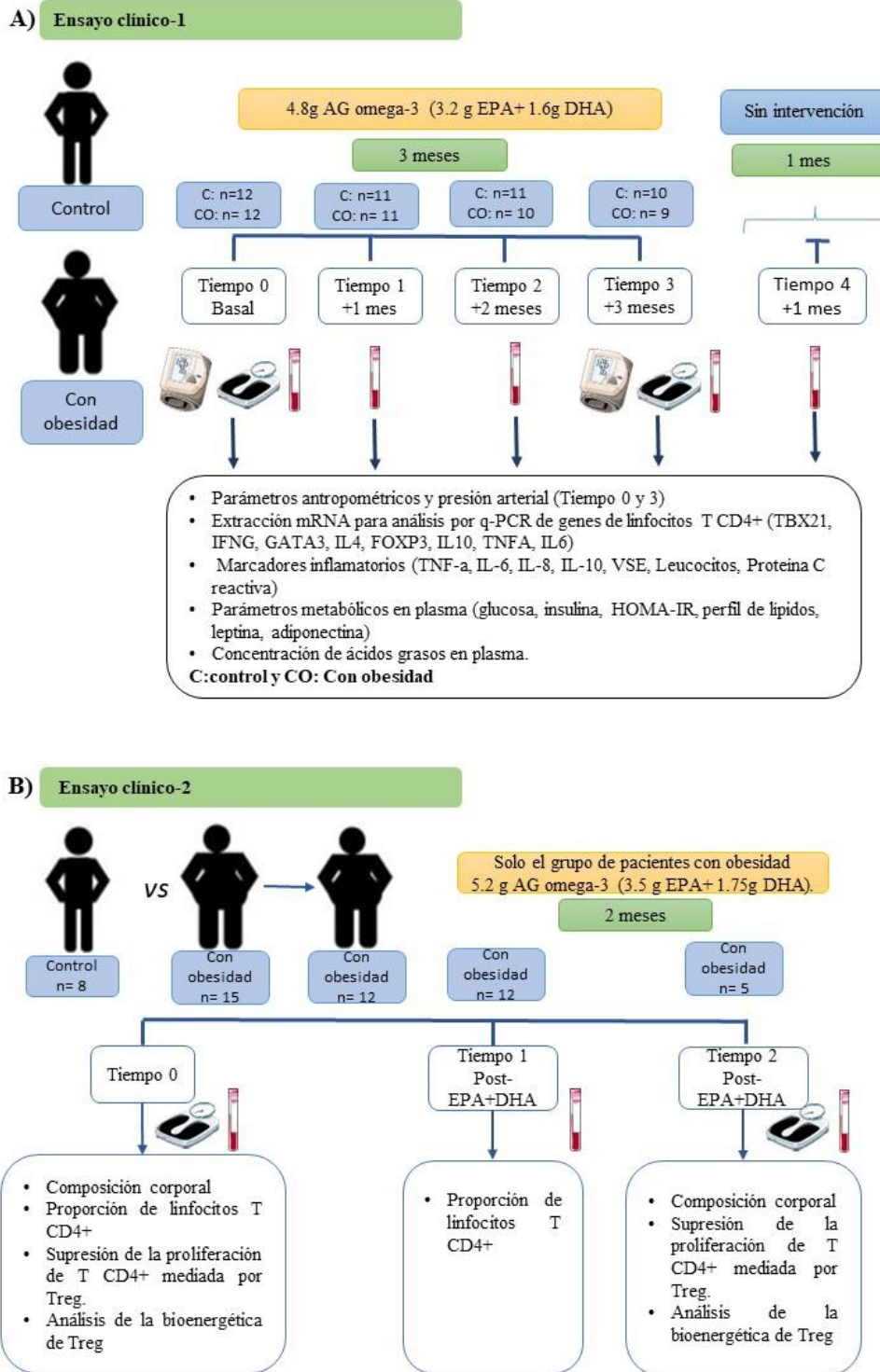


Figura 2. Diseño del estudio. El estudio se conformó por dos ensayos clínicos, cada uno con cohortes diferentes. **A) Ensayo clínico-1.** se evaluó el efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre la expresión de genes de linfocitos T CD4+ en PBMC y sobre parámetros metabólicos e inflamatorios en plasma. **B) Ensayo clínico-2.** Se desarrolló para evaluar si existen diferencias en la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+

periféricos y en la funcionalidad y bioenergética de Treg entre sujetos con y sin obesidad y para determinar el efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ periféricos y sobre la funcionalidad y bioenergética de Treg en sujetos con obesidad.

4.4. Antropometría, composición corporal y presión arterial

La evaluación antropométrica y de composición corporal se realizó por la mañana después de 8 a 12 horas de ayuno, incluyó la evaluación de peso, porcentaje de masa grasa y masa libre de grasa con el analizador de composición corporal X-CONTACT 357S (Corea del Sur). La altura se midió con un estadiómetro 274 (SECA, Deutschland, Hamburgo, Alemania). El IMC se determinó según lo indicado por la Organización Mundial de la Salud. La presión arterial se midió utilizando el tensiómetro digital de brazo HEM-7120 (Omron, Kyoto, Taiyo, Japón).

4.5. Ensayo clínico-1

El estudio se conformó de un total de 4 meses de seguimiento, y se dividió en un periodo de intervención correspondiente a 3 meses de suplementación con EPA y DHA (Tiempo 0, 1,2,3) y por un periodo sin intervención correspondiente a un mes (Tiempo 4). En total, los pacientes asistieron 5 ocasiones al INCMNSZ, en la primera y la cuarta visita se evaluaron la composición corporal y presión arterial. En todas las visitas se obtuvo una muestra de sangre para evaluar la expresión de mRNA de marcadores de linfocitos T CD4+ en PBMC y para la determinación de parámetros metabólicos e inflamatorios en plasma (**Figura 2A**).

4.5.1. Consumo, apego al tratamiento y cuantificación de ácidos grasos.

En el Tiempo 1, 2, 3 se pidió a los participantes que llevaran los frascos vacíos o con las cápsulas sobrantes y su hoja de registro de consumo del suplemento, hoja que fue brindada por el personal del estudio, con el objetivo de indicar las cápsulas que tomaban diariamente y si se reportaban efectos adversos. También se determinó el cumplimiento del tratamiento mediante la cuantificación de ácidos grasos en plasma mediante la extracción con cloroformo/metanol y derivatizados a sus ésteres de metilo (FAME) con metanol en tricloruro de boro (BCl₃). Los FAME se cuantificaron con el cromatógrafo de gases Varían 3400, se utilizó ácido tridecanóico (13:0) como estándar interno (Eggers & Schwudke, 2016).

Como indicador de apego se calculó el índice araquidónico (AA)/EPA [AA (mmol) / EPA (mmol)] (Endres et al., 1989). Los valores de AA/EPA inferiores a 3 se consideran valores ideales de ácidos grasos en plasma (Sekikawa et al., 2012).

4.5.2. Determinaciones realizadas en sangre total

Se cuantificó la cantidad de leucocitos con una dilución 1:10 y se utilizó la cámara de Neubauer. La determinación de velocidad de sedimentación eritrocítica (VSE) se realizó por un método estándar utilizando los tubos de Wintrobe.

El plasma se recolectó posterior a la centrifugación de la sangre total a 3000 rpm por 10 min, se recolectaron 500 ml y se colocaron en tubos estériles de 1.5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a -70 °C.

4.5.3. Expresión de mRNA de marcadores de linfocitos T CD4+

Se aislaron las PBMC mediante separación por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep™ (Stemcell technologies, Vancouver, Canadá) (Grievink et al., 2016) (**ANEXO 1**). Se extrajo el RNA total utilizando TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, EE. UU.) mediante la técnica descrita anteriormente (Rio et al., 2010). La concentración y pureza del RNA se cuantificó mediante espectrofotómetro ultravioleta a 260 nm y la integridad se evaluó mediante electroforesis. Gel de agarosa al 1%.

Se sintetizó DNA complementario (cDNA) a partir de 1 µg de RNA mediante una reacción de retrotranscripción con transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) y *primers* oligo (dT) (12–18) (Invitrogen, Groningen, Holanda) , inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), dNTP para la síntesis de cDNA (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.), Buffer 5X (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) y agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich, St. Louis , MO, EE. UU.). La expresión relativa del mRNA se evaluó mediante la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR), utilizando 2 µL de cDNA, 10µL de 2X Sybergreen Master mix (Roche Diagnostics, Lewis, Reino Unido), 2 µL de la mezcla de *primers* de genes específicos de T CD4+ en una concentración de 10 mM. El gen rRNA 18S se usó como gen de referencia para el análisis respectivo (Bas et al., 2004). En La **Tabla 1** se muestran las secuencias correspondientes de los *primers* utilizados (Oligo T4, Guanajuato, México). Asimismo, en la **Figura 3** se muestran geles utilizados para determinar el tamaño del amplicón de los *primers* y para determinar la especificidad de los mismos.

Tabla 1. Secuencia de <i>primers</i> y tamaño del amplicón de genes de T CD4+			
Gen	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	Tamaño del amplicón (pb)
TNFA	5' CTGGGCAGGTCTACTTTGGG 3'	5'CTGGAGGCCCCAGTTTGAAT 3'	272
IL6	5' CCACCGGAACGAAAGAGAA 3'	5'GAGAAGGCAACTGGACCGAA 3'	92
TBX21	5' GTCGGTGTCTCCAACCTAA 3'	5'CCCTTGGTGTGGACTGAGAT 3'	245
IFNG	5' ATATTGCAGGCAGGACAACC 3'	5'TCATCCAAGTGATGGCTGAA 3'	116
GATA3	5' TTTTTCGGTTTCTGGTCTGG 3'	5'CTCATTAAGCCCAAGCGAAG 3'	205
IL4	5' CCAACGTACTCTGGTTGGCT 3'	5'GCACCGAGTTGACCGTAACA 3'	258
FOXP3	5' ATTGAGTGTCCGCTGCTTCT 3'	5'TCCAGAGTTCCTCCACAAC 3'	122
IL10	5' TCTCGGAGATCTCGAAGCAT 3'	5'TGCAAAACCAAACCACAAGA 3'	176
18s Rrna	5' CCTCCAATGGATCCTCGTTA 3'	5'AAACGGCTACCACATCCAAG 3'	155

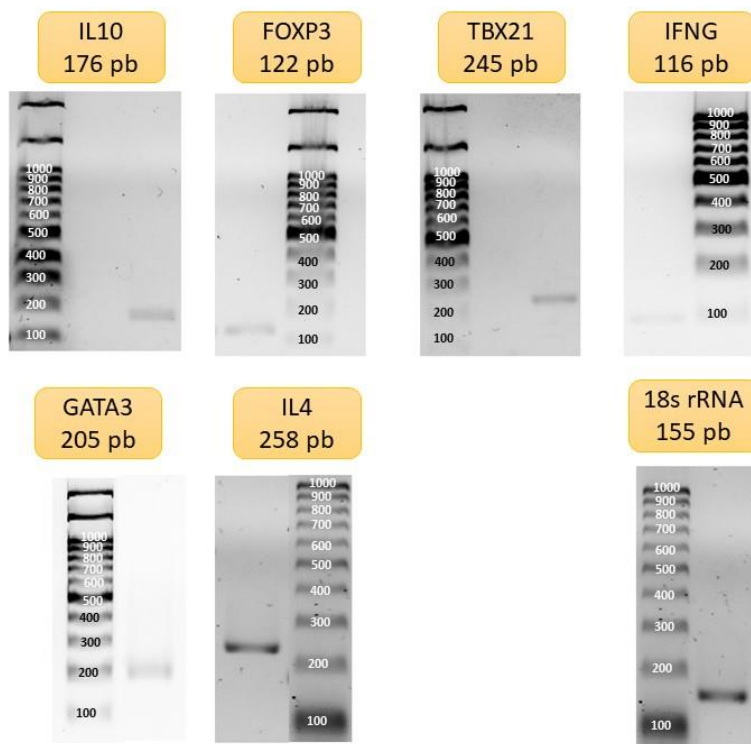


Figura 3. Tamaño del amplicón para los *primers* utilizados. Gel de agarosa al 1.5%.

4.5.4. Parámetros inflamatorios en plasma

Las citocinas y adipocinas plasmáticas se determinaron mediante inmunoensayos multiplexados usando luminiscencia cuantitativa Magpix Luminex, Merck Millipore (Luminex, Austin, Texas, EE. UU.), según lo indicado por el fabricante. Se cuantificó la concentración de proteína C reactiva y citocinas como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β . Asimismo, se cuantificó la concentración de leptina (valor de referencia es < 15.7 ng/ml) (Gijón-Conde et al., 2015). La cuantificación de adiponectina se realizó con un kit de ELISA (ALPCO, Salem, NH, EE. UU.). Se calculó el índice Adiponectina/Leptina (A/L) (valor de referencia >1) (Frühbeck et al., 2019).

Se realizó la cuantificación de la resolvina RvE1 mediante el kit de ELISA (MyBiosource, San Diego, USA) con una sensibilidad de 1 pg/ml.

4.5.5. Parámetros metabólicos

Se determinaron parámetros metabólicos en plasma: glucosa, colesterol total, colesterol de alta densidad (HDL-C), colesterol de baja densidad (LDL-C) y triglicéridos (TG) mediante un ensayo colorimétrico utilizando el Cobas c111 (Roche, Indianápolis, Indiana, EE. UU.). Los niveles de insulina en plasma también se determinaron utilizando un kit ELISA (ALPCO, Salem, NH, EE. UU.). El índice HOMA-IR que se utilizó como indicador de la resistencia a la insulina se calculó de la siguiente manera (Tang et al., 2015):

$$\text{HOMA-IR} = [(\text{insulina plasmática en ayuno (mU/L)} * \text{glucosa plasmática en ayuno (mg/dL)}) / 405]$$

El valor de referencia del índice HOMA-IR es < 2.5 (Tang et al., 2015). Asimismo, se calculó el índice TG/HDL-C que se relaciona con la presencia de resistencia a la insulina, y su valor de referencia es < 3 (Borrayo, 2018)

4.6. Ensayo clínico-2

Este ensayo clínico se desarrolló para conocer el efecto de la suplementación EPA y DHA sobre la proporción de subpoblaciones celulares de linfocitos T CD4⁺ y sobre la funcionalidad y bioenergética de los linfocitos Treg. Esta parte del estudio se subclasificó en dos etapas, la primera etapa para comparar de forma inicial al grupo de participantes con obesidad y sin obesidad; y la segunda etapa para determinar el efecto de la suplementación

con EPA y DHA sobre los parámetros inflamatorios y metabólicos en pacientes con obesidad (**Figura 2 B**).

Se reclutaron 15 mujeres de entre 25 y 45 años con obesidad y 8 con normopeso, con las características previamente descritas, no se controló por fase del ciclo menstrual. Solo el grupo de participantes con obesidad recibió la suplementación por un periodo total de dos meses. El grupo de participantes normopeso fue considerado como grupo de referencia, sin embargo, no recibió el tratamiento con AG omega-3. Se pidió a los participantes que mantuvieran su dieta y actividad física habituales, y que lo único diferente fuera el consumo del suplemento de AG omega-3 por dos meses, en la dosis y forma de administración especificada anteriormente (**Figura 2 B**).

Los participantes fueron citados en el INCMNSZ para tomar los parámetros basales en dos visitas, en la primera, se realizaron medidas antropométricas y de composición corporal, descritas anteriormente y se obtuvo una muestra de 12 ml sangre para el análisis de la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ que se detallará más adelante; en la segunda visita que se realizó en la siguiente semana, se obtuvo una muestra de 36 ml de sangre para determinar la función y bioenergética de los linfocitos Treg utilizando el ensayo de supresión de la proliferación celular mediado por Treg y el ensayo de Mito stress de Agilent Seahorse, que se detallarán más adelante, a las determinaciones realizadas al inicio del tratamiento en los participantes con obesidad se les llamó Pre-EPA+DHA. Solo el grupo de pacientes con obesidad recibió la suplementación con 5.2 g de EPA y DHA y asistieron un mes después, para determinar la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ (Post EPA+DHA) y después de dos meses de suplementación se citaron por última vez para determinar composición corporal y funcionalidad y bioenergética de Treg (Post EPA + DHA) (**Figura 2 B**).

4.6.1. Inmunofenotipificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ en PBMC

Para determinar la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica, se separaron las PBMC utilizando Lymphoprep™ (Stemcell technologies, Vancouver, Canadá) y se incubaron con 5µl del bloqueador de recetores Fc (Human TruStain FcX™ (BioLegend Inc)) y 100µl de PBS por millón de células durante 10 minutos previo a la tinción. Las PBMC se tiñeron utilizando 3 µl de anticuerpos *anti-human* CD4-FITC, *anti-*

human CD11c-PerCyP, anti-human CD25-APC para Th1, Th2 y Treg y *anti-human* CD161-APC, se utilizaron tubos por separado, aislados de la luz y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se permeabilizaron las células con 200 µl de Cytotfix/Citoperm (BD Biosciences) a 4°C por 90 minutos cubiertas de la luz en agitación y se agregó 1 ml de la solución de lavado Permash (BD Biosciences). Para la tinción intracelular se utilizaron 5 µl de anticuerpos *anti-human* IFN-γ-PE, *anti-human* IL-PE, *anti-human* FOXP3-PE y *anti-human* IL-17-PE a 4°C por 30 minutos protegidos de la luz. Los anticuerpos acoplados a fluorocromos usados en este ensayo se detallan en la **Tabla 2 (ANEXO 2)**.

Como control de isotipo se utilizó IgG1-FITC/IgG1-PE/CD45-PeCy5 mouse IgG1 kappa (BD Tritest, BD Biosciences). Se evaluó un control sin teñir y permeabilizado para determinar auto-fluorescencia de las PBMC. La auto-fluorescencia se comparó con la tinción simple de controles positivos para confirmar que las células teñidas se encuentren dentro de la escala para cada parámetro. Así mismo, se utilizó BD *calibrate 3 beads* para ajustar instrument settings, establecer la compensación de fluorescencia y checar la sensibilidad del instrumento (BD calibrates, BD Biosciences). Se corrieron controles FMO, por sus siglas en inglés: *Fluorescence minus one* se teñieron en paralelo usando el panel de anticuerpos con omisión o resta secuencial de un anticuerpo. Se utilizó el citómetro Accuri™ C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) y se analizaron 1,000,000 de eventos por tubo de muestra. Para el análisis se utilizó el software FlowJo X software (Tree Star, Inc.). Los diagramas de *gating* para cada subpoblación se muestran en la **Figura 4**.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la inmunofenotipificación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+.	
Subpoblación de linfocitos T CD4+	Anticuerpos acoplados a fluorocromos utilizados en la inmunofenotipificación
Th1	Anti-human CD4-FITC Anti-human CD11c-PercyP Anti-human CD25-APC Anti-human IFN- γ -PE *
Th2	Anti-human CD4-FITC Anti-human CD11c-PercyP Anti-human CD25-APC Anti-human IL-4 – PE *
Th17	Anti-human CD4-FITC Anti-human CD11c-PerCyP Anti-human CD161-APC Anti-human IL-17 – PE *
Treg	Anti-human CD4-FITC Anti-human CD11c-PercyP Anti-human CD25-APC Anti-human FOXP3 – PE *
BD Biosciences, San Jose, CA	
* Tinción intracelular	

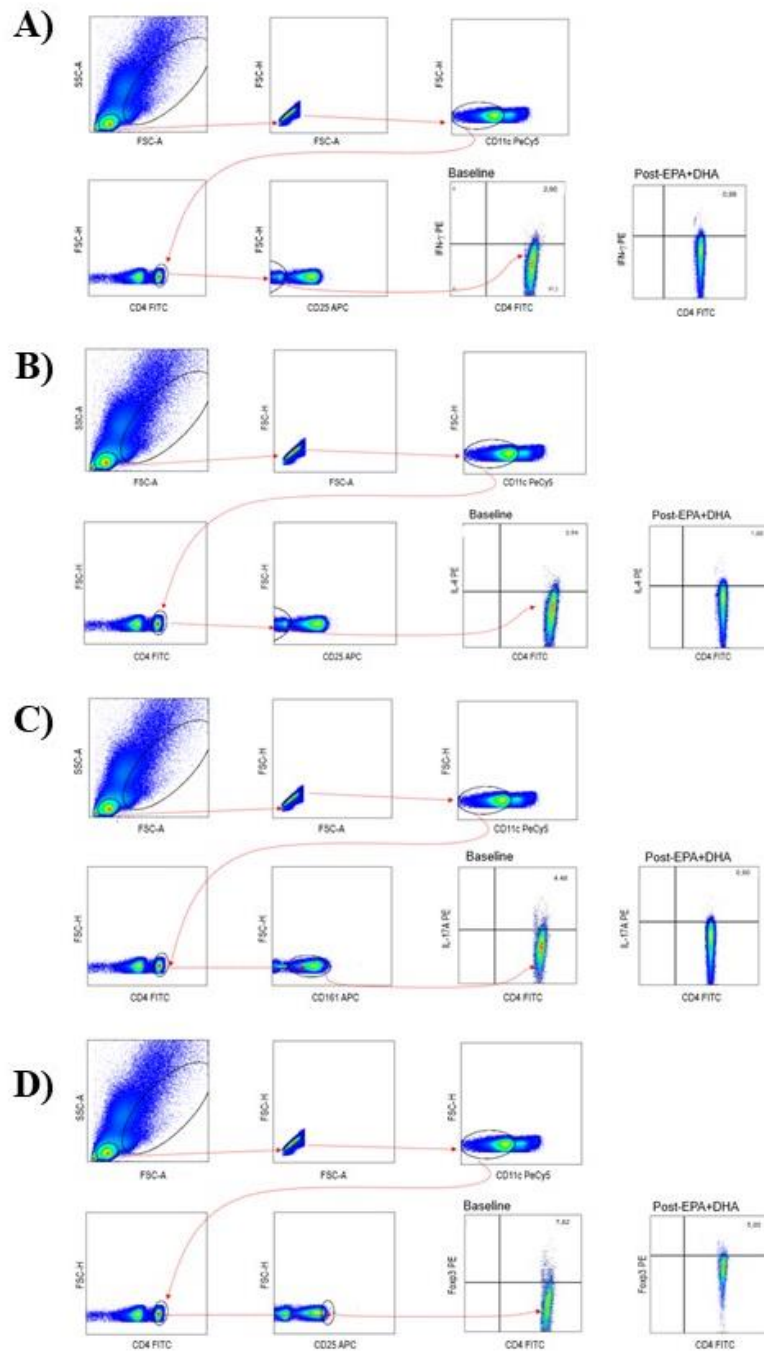


Figura 4. Estrategia de *gating* para las subpoblaciones de linfocitos T CD4+. **A)** Estrategia de *gating* para linfocitos Th1. Del total de PBMC se hizo el plot forward scatter y side scatter, posteriormente se analizaron por single cells y posteriormente se hizo un plot CD11c-/ CD4+/ CD25-/ IFN- γ +. **B)** Estrategia de *gating* para linfocitos Th2. Del total de PBMC se hizo el plot forward scatter y side scatter, posteriormente se analizaron por single cells y posteriormente se hizo un plot CD11c-/ CD4+/ CD25-/ IL-4+. **C)** Estrategia de *gating* para linfocitos Th17. Del total de PBMC se hizo el plot forward scatter y side scatter, posteriormente se analizaron por single

cells y posteriormente se hizo un plot CD11c-/ 161+/ CD4+/ IL-17+ **D**) Estrategia de *gating* para linfocitos Treg. Del total de PBMC se hizo el plot forward scatter y side scatter, posteriormente se analizaron por *single cells* y posteriormente se hizo un plot CD11c-/ CD4+/ CD25+/ FOXP3+.

4.6.2. Ensayo de supresión de la proliferación celular mediado por Treg

Posterior a la separación de PBMC se realizó la separación de linfocitos T reg, con el kit de separación por perlas magnéticas CD4+ CD25+ Regulatory T cell isolation kit human, (Miltenyi Biotec, Gladbach, Alemania), mediante el cual, los linfocitos T CD4+ efectores se aislaron por selección negativa y los linfocitos Treg por selección positiva (**ANEXO 3**). Una vez separados, los linfocitos Treg se mantuvieron a 4°C. Los linfocitos T CD4+ se tiñeron con éster de succinil carboxyfluoresceína (CFSE) (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Massachusetts, EE.UU.), en una concentración de 5 µM en una densidad celular de 5 X 10⁶ por 15 min a 37 °C protegidas de la luz, posterior a un lavado con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, y seguido de una segunda incubación por 20 min a 37 °C protegidas de la luz.

Se incubaron diferentes proporciones de T CD4+ efectoras: Treg, en placas de 96 pozos con fondo en U (NEST), lo cual se especifica en la **Tabla 3**, las células se activaron con perlas con Anti-CD3, Anti-CD28 utilizando el kit T cell Activation/expansion kit, human T cells, (Miltenyi Biotec, Gladbach, Alemania) tal cual se especifica en la **Tabla 3**, con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, piruvato 100 mM al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y antibiótico y antimicótico al 1% por 4 días a 37°C con 5% de CO₂ a un volumen final de 200 µl. Se obtuvieron de 5 a 10 x 10⁴ eventos en el citómetro ACCURI™ C6 (BD). Los datos se analizaron en el programa FlowJo 10.0. El diagrama de *gating* se muestra en la **Figura 5 (ANEXO 4)**

Tabla 3. Ensayo de supresión de proliferación de linfocitos T CD4+ mediado por Treg.						
	Proporción T CD4+ efectoras: T reguladoras					
	Sin teñir	Sin estímulo ¥	1:0 ¥	1:0.5 ¥	1:1 ¥	Treg
Células T CD4+ efectoras	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50µl)	50,000 células (50 µl)	0
Células T Reguladoras	0	0	0	25,000 células (25 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (100 µl)
Perlas con Anti-CD3, Anti-CD28	0	0	2 µl + 8 µl de medio	2 µl + 8 µl de medio	2 µl + 8 µl de medio	0
Medio de cultivo suplementado	150 µl	150 µl	140 µl	115 µl	90 µl	150 µl
Volumen final	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Se hace por duplicado						
¥ Células teñidas con CFSE						

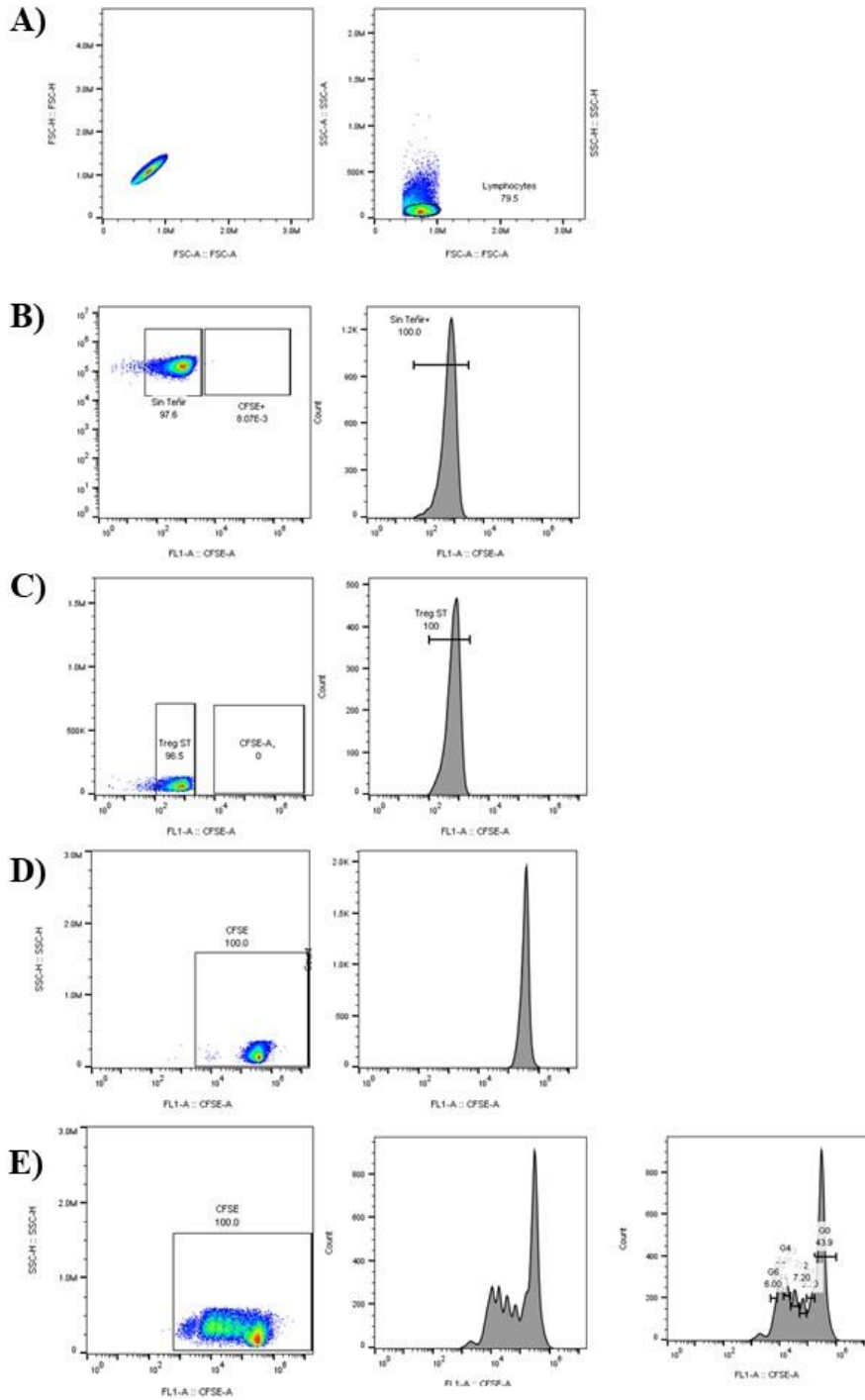


Figura 5. Estrategia de *gating* para el análisis de supresión celular mediado por Treg. **A)** Se analizó por *single cells* y posteriormente por Forward scatter y side scatter, **B)** Células T efectoras sin teñir, se determinó la auto-fluorescencia para fijar límites negativos. **C)** Treg sin teñir, se determinó la auto-fluorescencia de los linfocitos Treg para fijar límites negativos. **D)** Linfocitos T efectoras teñidos con CFSE, para determinar el límite positivo sin estímulo. **E)** Linfocitos T efectoras teñidos con CFSE y estimulados con perlas Anti-CD3 y Anti-CD28,

cada “pico” corresponde a una mitosis, se determinó la cantidad de células por “pico” para determinar la proliferación celular con diferentes proporciones de Treg.

Se calculó el índice de división de la siguiente manera:

$$\text{Índice de división} = \frac{\text{Número de divisiones}}{\text{Número de células al inicio del cultivo}}$$

La supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ (SP) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{SP (\%)} = \frac{\text{Índice de división} - \text{índice de división 1:0.5}}{\text{Índice de división 1:0}} \times 100$$

4.6.3. Bioenergética de linfocitos Treg.

Se evaluó la respiración mitocondrial mediante la determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la glucólisis aerobia mediante la tasa de acidificación celular extracelular (ECAR). Se utilizó el analizador de flujo extracelular Seahorse XF96 (Agilent, Santa Clara, California, USA). Los linfocitos Treg se resuspendieron en medio Seahorse XF RPMI sin rojo fenol con HEPES a un pH de 7.4, el cual fue suplementado con 11mM de glucosa, 2 mM de glutamina y 1mM de piruvato. Se utilizó una densidad celular de 2×10^5 por pozo y se sembraron en una placa previamente tratada con Cell-Tak (Corning, New York, USA). Se utilizó el kit de estrés mitocondrial (Seahorse XF cell mito stress test kit, Agilent) (**Figura 6**), en el cual, se hace la determinación basal de OCR y ECAR y se inyecta oligomicina (1.5 mM) para inhibir el complejo V mitocondrial, posteriormente se inyecta el carbonil-cianida-p-trifluorometoxyfenilhidrazona (FCCP) (1.5 mM), que es un agente desacoplante, y por último, se inyecta una mezcla de Rotenona y Antimicina A (0.9 mM) para inhibir el complejo I y III, respectivamente.

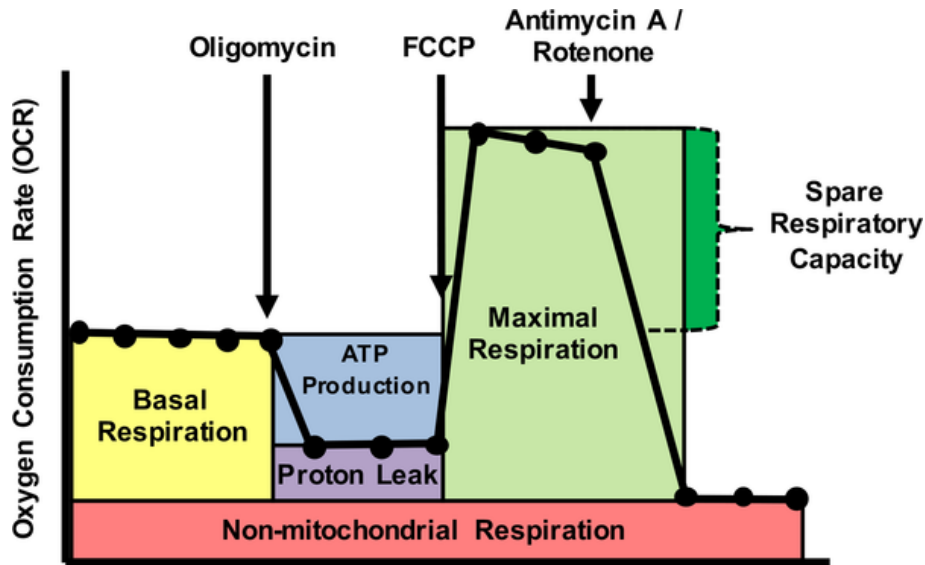


Figura 6. Marcadores de bioenergética. Respiración basal restando: OCR basal – OCR no mitocondrial; Respiración ligada a la generación de ATP: OCR basal – OCR posterior a la oligomicina; Capacidad de reserva: OCR después de FCCP – OCR basal; Fuga de protones se estimó: OCR después de oligomicina – OCR después de Rotenona y Antimicina A; Respiración no mitocondrial se determina con el valor de OCR posterior a la inyección de Rotenona y Antimincina A.

4.7. Análisis estadístico

Los datos se expresan en promedios y desviación estándar. Para comparar entre el grupo con obesidad y control, al inicio del estudio (en ambas cohortes) se utilizó la prueba estadística T de Student para muestras independientes. Para evaluar el efecto de la suplementación con EPA y DHA, en el Ensayo clínico-1, se utilizó la prueba ANOVA de medidas repetidas. Mientras que, para evaluar el efecto de la suplementación sobre proporción de linfocitos T CD4+, así como funcionalidad y bioenergéticas de Treg (en el grupo con obesidad antes y después) en el Ensayo clínico-2 se utilizó la prueba T de Student para muestras pareadas. Se consideró significancia estadística con un valor de p menor a 0.05.

5.0. RESULTADOS

En esta investigación, se pidió a los participantes que no realizaran cambios en su estilo de vida, únicamente la incorporación de la suplementación EPA y DHA, por lo que, los resultados observados podrían deberse principalmente al efecto de la suplementación. El suplemento de aceite de pescado fue bien aceptado, con un cumplimiento superior al 92%. No se observaron cambios en el peso o la composición corporal de los participantes, se hizo hincapié que debían continuar con su estilo de vida normal, y que no debían consumir ningún otro suplemento durante el tiempo que se encontraran en el estudio. Para mayor claridad, los resultados se clasificarán de acuerdo con las dos partes del presente proyecto de investigación.

5.1. Resultados del Ensayo Clínico-1

5.1.1. Efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre la expresión de genes de linfocitos T CD4+ en sujetos con obesidad

Para conocer el efecto de la suplementación de los AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la expresión de mRNA de linfocitos T CD4+ se desarrolló un estudio en el que se incluyeron 12 participantes con obesidad y 12 voluntarios sanos con normopeso, considerados como el grupo control. Las características antropométricas, metabólicas e inflamatorias de ambos grupos al inicio del estudio se muestran en la **Tabla 4**, por diseño de estudio existen diferencias en los parámetros antropométricos entre grupos, así mismo, se observó que el grupo con obesidad presentó niveles de glucosa, insulina, HOMA-IR y triglicéridos e índice TG/HDL-C mayores y menor concentración de HDL-C. Por otra parte, se observó mayor número de leucocitos, VSE, leptina, índice AL y menor concentración de adiponectina en el grupo con obesidad al comparar con el grupo control.

Tabla 4. Características antropométricas, metabólicas e inflamatorias de los participantes al inicio del estudio exploratorio (Time 0).

	Control (n= 12)	Con Obesidad (n= 12)	<i>p</i> valor
ANTROPOMETRÍA Y COMPOSICIÓN CORPORAL			
Edad (años) promedio ± DS	31.7 ± 6.7	38.1 ± 6.0	<0.05
Mediana	29.5	39.0	
Rango	24 – 43	27 – 45	
Estatura (m) promedio ± DS	1.62 ± 0.05	1.60 ± 0.08	0.18
Mediana	1.63	1.56	
Rango	1.55 – 1.70	1.51 – 1.75	
Peso (kg) promedio ± DS	56.3 ± 9.0	102.1 ± 15.4	<0.001
Mediana	55.7	103.3	
Rango	49.1 – 63.6	82.7 – 131.0	
IMC (kg/m ²) promedio ± DS	21.7 ± 2.2	39.8 ± 5.5	<0.001
Mediana	21.4	36.7	
Rango	17.8 – 23.9	35.0 – 52.7	
Masa grasa (kg) promedio ± DS	15.0 ± 3.9	42.7 ± 7.8	<0.001
Mediana	15.1	39.6	
Rango	8.3 – 20.8	34.5 – 60.4	
Masa grasa (%) promedio ± DS	25.5 ± 5.1	41.9 ± 3.6	<0.001
Mediana	24.3	42.6	
Rango	15.0 – 34.9	36.5 – 47.6	
Masa libre de grasa (kg) promedio ± DS	41.8 ± 3.6	59.3 ± 9.8	<0.001
Mediana	41.4	57.9	
Rango	37.5 – 49	46.8 – 76.6	
Masa libre de grasa (%) promedio ± DS	74.4 ± 5.3	58.1 ± 3.6	<0.001
Mediana	76.2	57.1	
Rango	65.1 – 85.0	52.4 – 63.5	
MARCADORES METABÓLICOS §			
PA sistólica (mm Hg) promedio ± DS	106 ± 8	123 ± 8	<0.001
Mediana	107	126	
Rango	95 – 125	109 – 136	
PA diastólica (mm Hg) promedio ± DS	67 ± 6	78 ± 9	<0.02
Mediana	65	79	
Rango	58 – 82	63 – 92	
Glucosa (mg/dL) promedio ± DS	82.4 ± 7.5	93.3 ± 11.8	<0.02
Mediana	81.7	89.5	
Rango	73.1 – 99.2	80.8 – 112.6	
Insulina (mU/L) promedio ± DS	3.2 ± 1.1	13.0 ± 8.8	<0.001
Mediana	3.6	10.7	
Rango	1.7 – 4.6	4.5 – 28.7	
HOMA-IR promedio ± DS	0.7 ± 0.2	3.2 ± 2.3	<0.001
Mediana	0.7	3.7	
Rango	0.3 – 1.0	0.9 – 8.0	
Colesterol total (mg/dL) promedio ± DS	164.0 ± 31.1	167.0 ± 39.1	0.88
Mediana	167	159	
Rango	120.1 – 215.0	114.2 – 236.6	
LDL-C (mg/dL) promedio ± DS	85.9 ± 31.4	108.9 ± 34.4	0.19
Mediana	81.5	112.7	
Rango	32.0 – 137.8	60.6 – 157.3	
HDL-C (mg/dL) promedio ± DS	42.2 ± 8.9	33.0 ± 9.9	<0.02
Mediana	41.9	30.8	
Rango	29.1 – 57.9	18.7 – 52.2	
Triglicéridos (mg/dL) promedio ± DS	89.4 ± 37.8	191.0 ± 102.1	<0.001

	Mediana	77.1	159.8	
	Rango	38.1 – 130.0	79.2 – 454.1	
Índice TG/HDL-C promedio ± DS		2.2 ± 1.1	6.7 ± 5.9	<0.02
	Mediana	1.96	5.5	
	Rango	0.8 – 4.6	2.5 – 24.3	

§ Valores de referencia: PA sistólica <120 mm Hg, PA diastólica < 80 mm Hg, glucosa <100 mg/dl, colesterol total <200 mg/dl, HDL-C >40 mg/dl, LDL-C <100 mg/dl, TG <150 mg/dl, índice TG/HDL < 3.0 (14) HOMA-IR <2.5 (15).

MARCADORES INFLAMATORIOS‡

Leucocitos (x 10 ³ /mm ³) promedio ± DS		5.7 ± 0.87	8.1 ± 1.9	<0.005
	Mediana	5.4	8.6	
	Rango	4.4 – 7.2	4.5 – 10.1	
VSE (mm/h) promedio ± DS		6 ± 4	18 ± 12	<0.001
	Mediana	5	19	
	Rango	2 – 15	1 - 37	
IL-6 (pg/ml) promedio ± DS		0.9 ± 0.9	2.2 ± 3.6	0.63
	Mediana	0.93	0.90	
	Rango	0.01 – 1.7	0.1 – 12.3	
IL-8 (pg/ml) promedio ± DS		0.9 ± 0.6	2.7 ± 3.0	0.71
	Mediana	0.64	1.1	
	Rango	0.64 – 2.50	0.4 – 9.8	
TNF-α (pg/ml) promedio ± DS		1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.9	0.75
	Mediana	1.7	1.9	
	Rango	0.6 – 2.6	0.7 – 3.6	
IL-10 (pg/ml) promedio ± DS		2.9 ± 4.8	4.0 ± 5.5	0.66
	Mediana	1.2	1.6	
	Rango	0.06 – 13.8	0.3 – 17.5	
TGF-β (ng/ml) promedio ± DS		5.2 ± 4.5	4.0 ± 4.2	0.63
	Mediana	3.4	2.5	
	Rango	1.8 – 17.2	0.8 – 15.3	
Leptina (ng/ml) promedio ± DS		9.6 ± 7.0	35.5 ± 25.4	<0.01
	Mediana	8.3	23.3	
	Rango	1.0 – 26.9	8.2 – 77.7	
Adiponectina (µg/ml) promedio ± DS		7.5 ± 2.5	4.5 ± 1.7	<0.05
	Mediana	7.3	4.1	
	Rango	4.7 – 11.0	2.2 – 7.3	
Índice A/L promedio ± DS		1.6 ± 2.1	0.3 ± 0.3	<0.05
	Mediana	0.8	0.2	
	Rango	0.3 – 7.4	0.1 – 0.8	

‡ Valores de referencia: leucocitos < 10.0x10³/mm³, VSE <20 mm/h, leptina <15.7 ng/ml (17) índice A/L >1.0 (18)

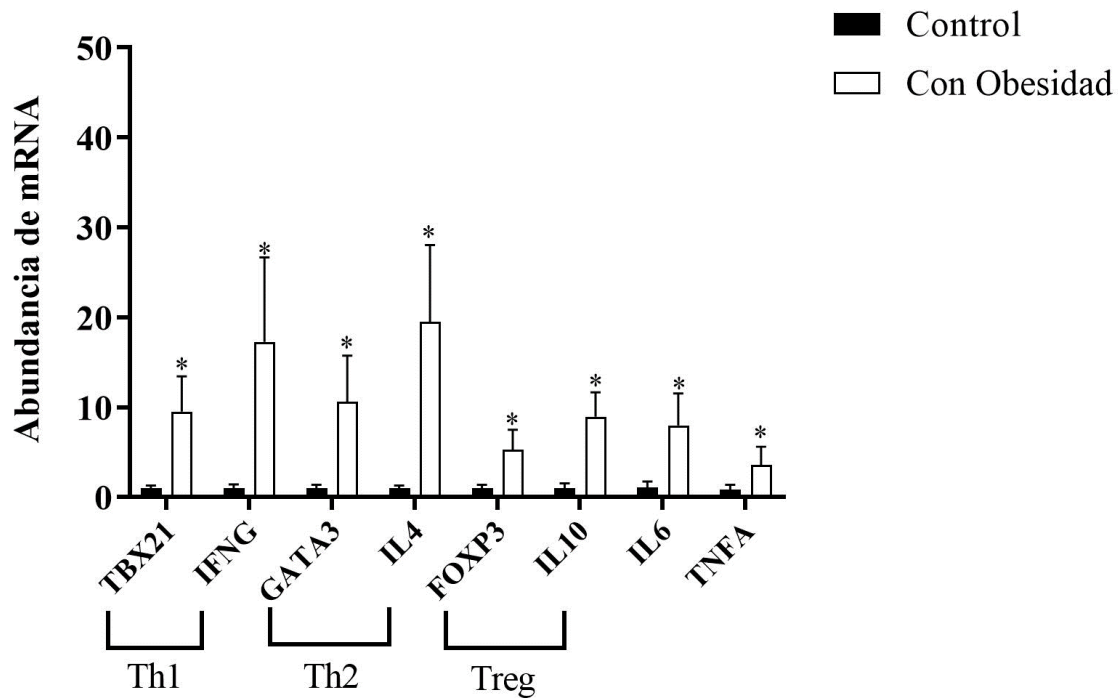


Figura 7. Expresión de mRNA de genes de linfocitos T CD4+ en participantes con y sin obesidad al inicio. Los datos se muestran en promedio \pm DS. * $p < 0.05$. Datos correspondientes al ensayo clínico-1

Asimismo, se observó mayor expresión de marcadores de linfocitos Th1 (TBX21 e IFN- γ), de linfocitos Th2 (GATA3 e IL4), de Treg (FOXP3 e IL-10) y TNFA e IL6 como marcadores de inflamación en sujetos con obesidad al comparar con el grupo control (**Figura 7**). De forma interesante, a partir del primer mes de tratamiento, durante los 3 meses de suplementación y un mes después de haber concluido, la expresión de estos marcadores se redujo significativamente en el grupo de pacientes con obesidad (**Figura 8**). Estos datos sugieren que la suplementación con ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) podría modular a los linfocitos T CD4+ en sujetos con obesidad.

De forma interesante, la expresión de los marcadores de Linfocitos T CD4+ en el grupo control, no cambió durante el curso de la intervención con AG omega-3, ni un mes sin intervención (**Figura 9**).

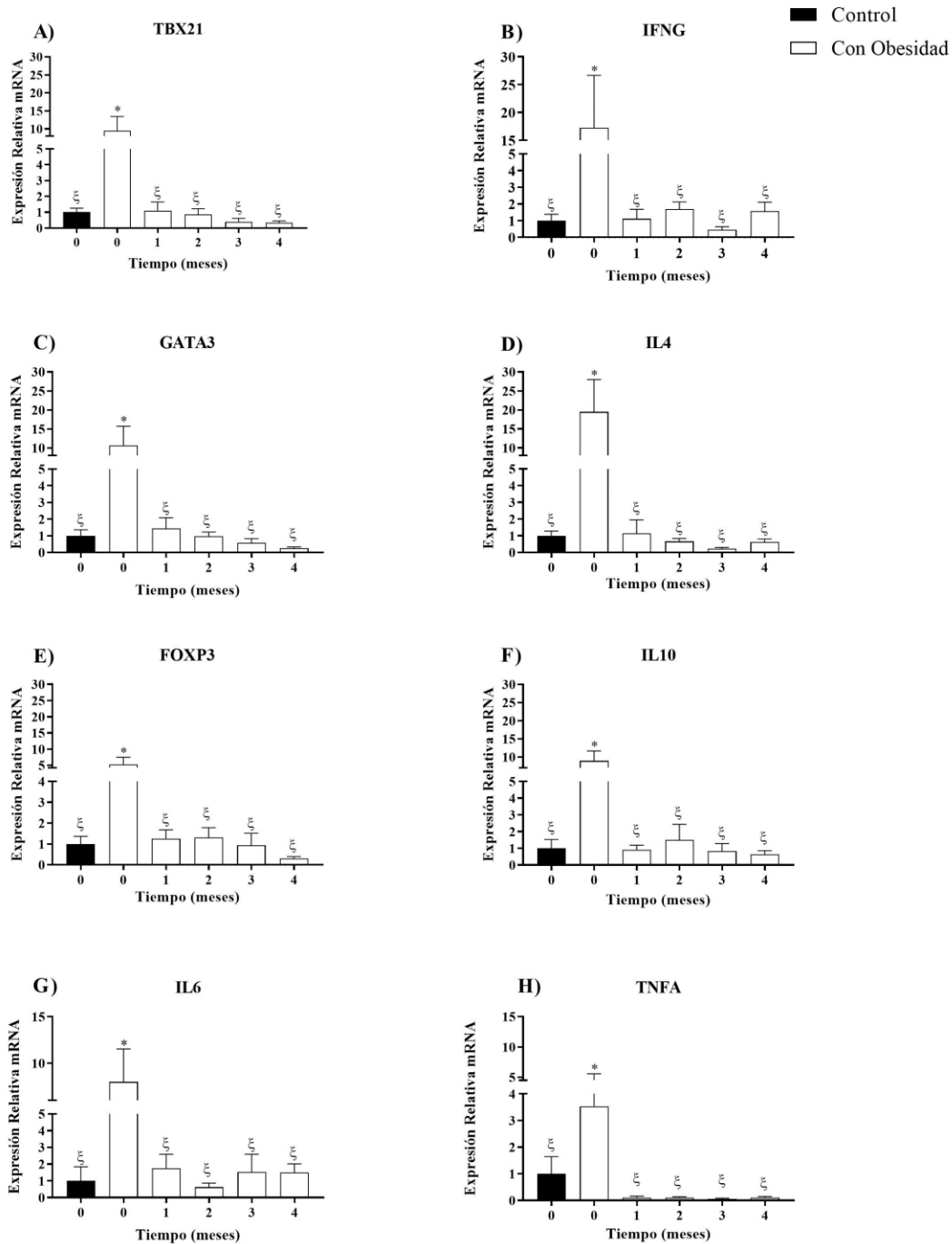


Figura 8. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la expresión de marcadores de linfocitos T CD4+ en pacientes con obesidad. **A)** La expresión de TBX21 e **B)** IFNG marcadores de linfocitos Th1 disminuye durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. **C)** La expresión de GATA3 e **D)** IL4, marcadores de linfocitos Th2, disminuye durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. **E)** La expresión de FOXP3 e **F)** IL10, marcadores de linfocitos Treg, disminuye durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. **G)** La expresión de IL6 y **H)** TNFA, marcadores de inflamación en general, disminuye durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. Los datos se muestran en promedio \pm DS. * $p < 0.05$. Las barras blancas corresponden al grupo con obesidad. Datos correspondientes al Ensayo clínico-1

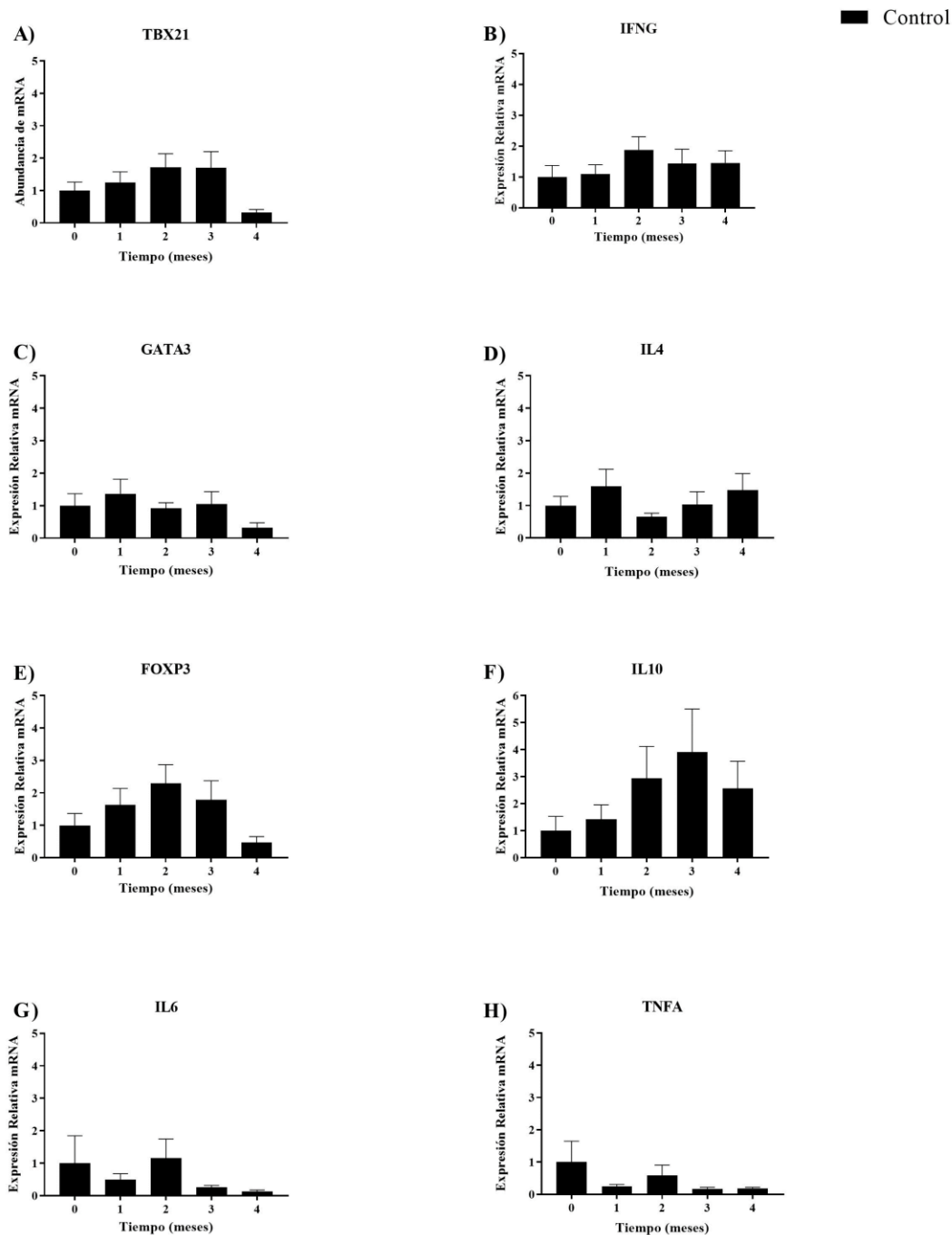


Figura 9. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la expresión de marcadores de linfocitos T CD4⁺ en el grupo control. **A)** La expresión de TBX21 y **B)** IFNG marcadores de linfocitos Th1 no cambió durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. **C)** La expresión de GATA3 y **D)** IL4, marcadores de linfocitos Th2, no cambió durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. **E)** La expresión de FOXP3 e **F)** IL10, marcadores de linfocitos Treg, no cambia durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. **G)** La expresión de IL6 y **H)** TNFA, marcadores de inflamación en general, no cambia durante el tratamiento y un mes después de terminarlo. Los datos se muestran en promedio \pm DS. Datos correspondientes al ensayo clínico-1

5.1.2. Efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre parámetros inflamatorios y metabólicos

El efecto de la suplementación con EPA y DHA sobre los marcadores inflamatorios en plasma se describen en la **Tabla 5**, se observó un efecto antiinflamatorio de la suplementación en ambos grupos a través de la disminución de TNF- α , dicho efecto se mantuvo durante los 3 meses de tratamiento en el grupo de voluntarios sin obesidad, mientras que en el grupo con obesidad este efecto se observó durante el primer y segundo mes de tratamiento. Se observó una tendencia de disminución en la concentración plasmática de IL-6 y leptina en el grupo con obesidad, así mismo, se observó una tendencia de aumento en la concentración plasmática de IL-10 y TGF- β (citocinas que sintetizan los linfocitos Treg) en el grupo con obesidad. Por su parte, en el grupo control, se observó la tendencia de incremento de adiponectina y el índice A/L, mientras que también, se observó una tendencia de disminución de IL-6 y leptina.

Se evaluó la concentración de la resolvina RvE1 en plasma al tiempo 0 y tiempo 1 en ambos grupos. No se detectó RvE1 en el grupo control, mientras que en el grupo con obesidad se detectó en 3 participantes al inicio del estudio. La suplementación generó una tendencia de incremento en la concentración de RvE1 en ambos grupos, sin embargo, este incremento se ve de forma más pronunciada en el grupo con obesidad (**Figura 10**).

Tabla 5. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA+DHA) en parámetros inflamatorios y metabólicos en plasma de sujetos con y sin obesidad, durante el curso del estudio.

		Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	<i>p</i> valor [†]
ANTROPOMETRÍA Y COMPOSICIÓN CORPORAL							
Peso (kg)	Control	56.3 ± 9.0	—	—	57.2 ± 5.7	—	0.11
	Con obesidad	102.1 ± 15.4	—	—	102.6 ± 14.4	—	
IMC (kg/m ²)	Control	21.7 ± 2.2	—	—	21.6 ± 2.2	—	0.10
	Con obesidad	39.8 ± 5.5	—	—	39.7 ± 5.4	—	
Masa grasa (kg)	Control	15.0 ± 3.9	—	—	15.8 ± 3.3	—	0.19
	Con obesidad	42.7 ± 7.8	—	—	41.7 ± 7.4	—	
Masa grasa (%)	Control	25.5 ± 5.1	—	—	26.7 ± 4.4	—	0.19
	Con obesidad	41.9 ± 3.6	—	—	40.9 ± 3.9	—	
	Control	41.8 ± 3.6	—	—	43.6 ± 7.9	—	0.89

Masa libre de grasa (kg)	Con obesidad	59.3 ± 9.8	—	—	60.3 ± 10.8	—	
Masa libre de grasa (%)	Control	74.4 ± 5.3	—	—	73.3 ± 7.2	—	0.90
	Con obesidad	58.1 ± 3.6	—	—	59.1 ± 4.9	—	
MARCADORES METABÓLICOS							
Glucosa (mg/dL)	Control	82.4 ± 7.5	82.0 ± 8.0	74.4 ± 15.7	83.3 ± 7.8	82.5 ± 8.1	0.33
	Con obesidad	93.3 ± 11.8	88.9 ± 10.8	92.4 ± 7.7	91.9 ± 8.7	86.2 ± 8.0	
Insulina (mU/L)	Control	3.2 ± 1.1	1.7 ± 1.1	2.4 ± 1.3	2.2 ± 2.1	2.5 ± 1.5	0.01*
	Con obesidad	13.0 ± 8.8	6.9 ± 3.4*	7.1 ± 3.9*	8.4 ± 4.5	7.4 ± 2.8*	
HOMA-IR	Control	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.01
	Con obesidad	3.2 ± 2.3	1.5 ± 0.9*	1.5 ± 1.0*	1.8 ± 1.1	1.5 ± 0.7*	
Colesterol total (mg/dL)	Control	164.0 ± 31.1	150.3 ± 30.3	137.3 ± 32.1	152.4 ± 25.5	148.2 ± 31.4	0.11
	Con obesidad	167.0 ± 39.1	165.7 ± 28.3	160.9 ± 33.0	166.9 ± 31.2	173.9 ± 46.7	
LDL-C (mg/dL)	Control	85.9 ± 31.4	94.1 ± 35.8	82.2 ± 29.8	88.0 ± 33.9	95.2 ± 37.9	0.24
	Con obesidad	108.9 ± 34.4	115.7 ± 27.8	112.6 ± 31.8	117.9 ± 32.3	112.3 ± 40.9	
HDL-C (mg/dL)	Control	42.2 ± 8.9	50.5 ± 12.7	49.8 ± 18.1	57.2 ± 19.8	47.9 ± 13.2	0.08
	Con obesidad	33.0 ± 9.9	36.8 ± 9.1	33.9 ± 10.3	36.6 ± 14.0	36.4 ± 12.3	
Triglicéridos (mg/dL)	Control	89.4 ± 37.8	74.4 ± 29.1	78.2 ± 46.2	83.2 ± 45.1	86.5 ± 42.9	0.24
	Con obesidad	191.0 ± 102.1	148.4 ± 58.7	149.2 ± 76.6	146.1 ± 60.4	208.2 ± 125.1	
Índice TG/HDL-C	Control	2.2 ± 1.1	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.9	1.7 ± 1.1	2.0 ± 1.2	0.37
	Con obesidad	6.7 ± 5.9	4.3 ± 2.1	4.7 ± 3.6	4.7 ± 3.3	6.6 ± 5.8	
MARCADORES INFLAMATORIOS							
Leucocitos (x10 ³ /mm ³)	Control	5.7 ± 0.8	5.7 ± 1.4	6.3 ± 1.9	5.8 ± 1.7	5.3 ± 1.3	0.84
	Con obesidad	8.1 ± 1.9	8.1 ± 1.5	8.1 ± 1.7	7.9 ± 1.8	7.5 ± 1.4	
VSE (mm/h)	Control	6 ± 4	9 ± 7	6 ± 4	9 ± 9	10 ± 6	0.45
	Con obesidad	16 ± 12	17 ± 11	17 ± 11	19 ± 14	22 ± 13	
IL-6 (pg/ml)	Control	0.9 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.3	1.0 ± 1.1	0.47
	Con obesidad	2.2 ± 3.6	1.0 ± 1.3	1.5 ± 2.1	1.6 ± 2.9	1.9 ± 1.9	
IL-8 (pg/ml)	Control	0.9 ± 0.6	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.4	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.6	0.38
	Con obesidad	2.7 ± 3.0	2.4 ± 1.9	2.4 ± 2.7	3.8 ± 2.7	2.6 ± 1.3	
TNF-α (pg/ml)	Control	1.7 ± 0.5	0.8 ± 0.6 *	0.9 ± 0.6 *	1.0 ± 0.4*	1.8 ± 0.9	0.01
	Con obesidad	1.9 ± 0.9	1.1 ± 0.5 *	1.3 ± 0.7 *	1.7 ± 1.0	1.8 ± 0.8	
IL-10 (pg/ml)	Control	2.9 ± 4.8	2.1 ± 1.8	2.7 ± 2.4	3.1 ± 3.2	2.7 ± 2.9	0.90
	Con obesidad	4.0 ± 5.5	9.0 ± 14.8	5.2 ± 8.0	7.4 ± 10.6	9.4 ± 14.7	
TGF-β (ng/ml)	Control	5.2 ± 4.5	4.2 ± 2.8	5.6 ± 6.4	5.6 ± 5.0	4.2 ± 3.6	0.06
	Con obesidad	4.0 ± 4.2	5.0 ± 2.5	6.6 ± 4.5	7.4 ± 8.8	2.7 ± 2.4	
Leptina (ng/ml)	Control	9.6 ± 7.0	4.1 ± 3.5	5.8 ± 5.1	5.7 ± 6.2	5.8 ± 4.8	0.53
	Con obesidad	35.5 ± 25.4	19.2 ± 5.3	19.9 ± 9.5	25.2 ± 16.1	20.7 ± 20.0	
Adiponectina (μg/ml)	Control	7.5 ± 2.5	8.5 ± 2.2	7.2 ± 2.4	8.5 ± 3.1	—	0.07
	Con obesidad	4.5 ± 1.7	4.7 ± 2.6	4.2 ± 1.9	4.6 ± 2.6	—	
Índice A/L	Control	1.6 ± 2.1	3.9 ± 3.9	6.6 ± 13.7	3.3 ± 2.8	—	0.62
	Con obesidad	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	—	

Promedio ± DS. ANOVA de dos vías para medidas repetidas.

† Factor tiempo (comparaciones intragrupo vs time 0).

* Significancia estadística $p < 0.05$.

— : no determinado.

Índice TG/HDL-C: Índice Triglicéridos sobre colesterol de alta densidad, VSE: velocidad de sedimentación eritrocítica, Índice A/L: índice adiponectina sobre leptina.

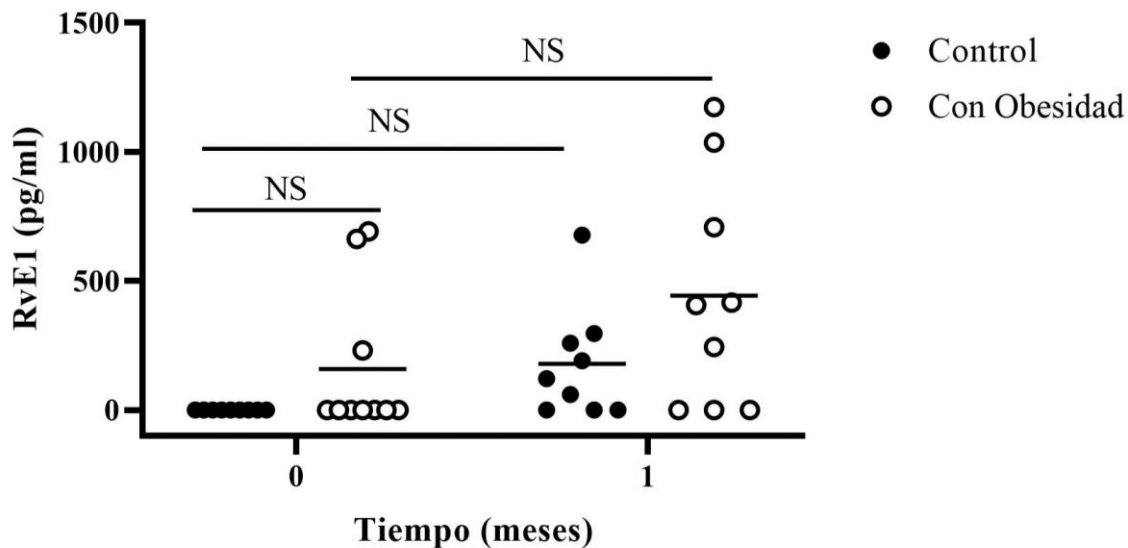


Figura 10. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre los niveles de RvE1 en plasma del grupo con obesidad y control. La raya horizontal corresponde al promedio de los datos. Estos datos corresponden al Ensayo clínico-1.

A nivel metabólico, la suplementación con AG omega-3, disminuyó los niveles de insulina, el índice HOMA-IR (el cual, en promedio, disminuyó a niveles normales). Por otra parte, se encontró una tendencia de disminución en los niveles de triglicéridos en el grupo de pacientes con obesidad, mientras que en el grupo control se observó una tendencia de incremento en la concentración de HDL-C (**Tabla 5**).

5.1.3. Apego y consumo del suplemento de EPA y DHA

El apego se evaluó con la concentración de ácidos grasos en plasma durante el tiempo del estudio (**Tabla 6**) y mediante el índice AA/EPA, el cual se ha relacionado con parámetros inflamatorios, sin embargo, no fue el caso del presente estudio, en donde no se encontró relación del índice ARA/EPA con citocinas inflamatorias en plasma (datos no mostrados), sin embargo, éste índice se utilizó como indicador de consumo y apego al tratamiento. Tanto el grupo con obesidad como el grupo control, presentaron un índice AA/EPA elevado al inicio del estudio, sin existir diferencias entre ellos. La suplementación con EPA y DHA generó la disminución significativa del índice AA/EPA desde el primer mes y durante los 3 meses de

tratamiento en ambos grupos. De forma interesante, en el grupo con obesidad regresa a niveles basales, mientras que en el grupo control se mantiene más bajo un mes después de haber terminado la suplementación (**Figura 11**).

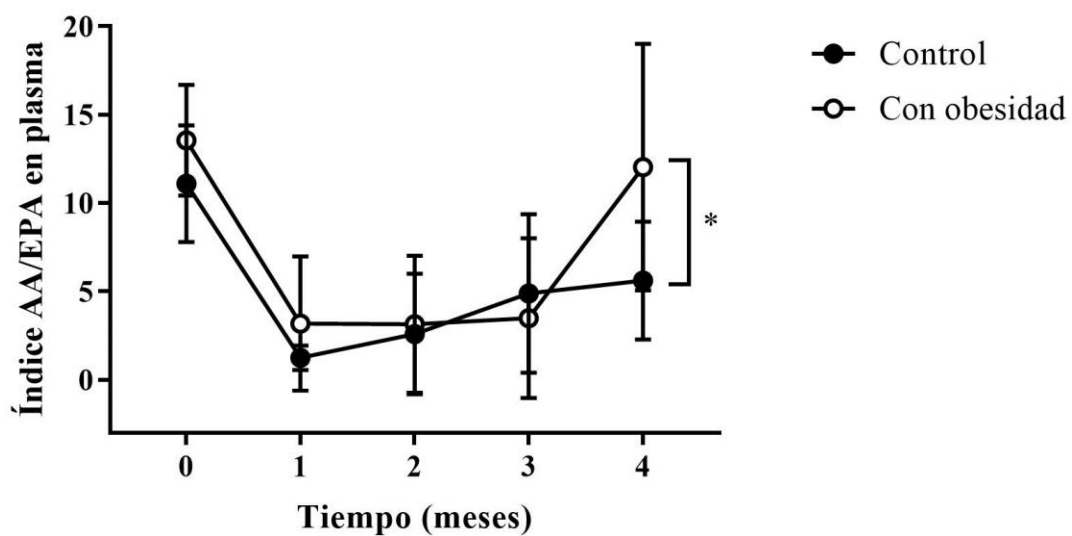


Figura 11. Índice AA/EPA como marcador de apego al tratamiento. La suplementación con EPA y DHA disminuyó el índice AA/EPA durante el periodo de suplementación. Promedio \pm DS. Datos correspondientes al Ensayo clínico-1.

Tabla 6. Concentración de ácidos grasos en plasma de sujetos con y sin obesidad durante el curso del estudio.

		Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	<i>p</i> valor [†]
Ácido Láurico (12:0) (mM)	Control	0.1 ± 0.1	0.08 ± 0.06	0.05 ± 0.04	0.04 ± 0.05	0.1 ± 0.07	0.07
	Con obesidad	0.05 ± 0.07	0.03 ± 0.02	0.1 ± 0.1	0.02 ± 0.03	0.05 ± 0.08	
Ácido Mirístico (14:0) (mM)	Control	1.4 ± 1.6	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.60
	Con obesidad	1.0 ± 1.1	1.0 ± 1.5	1.2 ± 2.0	1.0 ± 1.4	0.7 ± 0.6	
Ácido Palmítico (16:0) (mM)	Control	33.3 ± 42.7	10.5 ± 2.7	8.9 ± 1.9	9.1 ± 3.8	12.5 ± 4.3	0.14
	Con obesidad	27.5 ± 37.8	27.3 ± 40.3	28.9 ± 48.6	26.0 ± 45.0	13.0 ± 9.8	
Ácido Esteárico (18:0) (mM)	Control	23.2 ± 30.4	8.0 ± 2.1	8.4 ± 4.8	6.5 ± 1.9	8.8 ± 2.3	0.26
	Con obesidad	18.6 ± 27.6	17.1 ± 24.1	17.5 ± 27.5	16.2 ± 25.1	8.6 ± 11.0	
Ácido Palmitoléico (16:1 n-7) (mM)	Control	2.3 ± 3.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.053
	Con obesidad	2.5 ± 3.5	2.2 ± 3.6	2.4 ± 5.0	1.8 ± 2.9	1.2 ± 0.4	
Ácido Oléico (18:1 n-9) (mM)	Control	22.9 ± 28.8	6.9 ± 2.2	5.8 ± 1.5	6.5 ± 4.0	8.8 ± 3.0	0.10
	Con obesidad	22.7 ± 32.7	19.1 ± 27.6	21.2 ± 35.6	22.4 ± 43.7	9.6 ± 4.8	
Ácido Linoléico (18:2 n-6) (mM)	Control	36.7 ± 50.5	9.1 ± 2.2	8.0 ± 2.1	8.8 ± 3.2	11.7 ± 3.0	0.16
	Con obesidad	28.7 ± 40.6	30.3 ± 47.0	32.6 ± 57.2	26.6 ± 52.8	10.2 ± 4.7	
Ácido α- Linolénico (18:2 n-3) (mM)	Control	0.7 ± 1.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.06
	Con obesidad	0.7 ± 0.8	0.8 ± 1.2	0.8 ± 1.3	0.7 ± 1.3	0.2 ± 0.2	
Ácido Araquidónico (20:4 n-6) (mM)	Control	6.2 ± 8.8	1.7 ± 0.8	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.7	1.9 ± 0.6	0.28
	Con obesidad	4.7 ± 6.6	5.6 ± 8.8	5.3 ± 8.2	3.7 ± 6.1	1.6 ± 0.6	
Ácido Eicosapentaenóico (20:5 n-3) (mM)	Control	0.5 ± 0.8	1.7 ± 0.6	3.4 ± 6.8	0.7 ± 0.6	1.2 ± 2.2	0.06
	Con obesidad	0.4 ± 0.5	4.3 ± 7.8	2.7 ± 3.2	1.5 ± 0.8	0.2 ± 0.3	
Ácido Docosahexaenóico (22:6 n-3) (mM)	Control	1.4 ± 2.0	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.8	0.55
	Con obesidad	0.9 ± 1.3	2.7 ± 4.1	2.3 ± 3.5	1.8 ± 2.7	0.5 ± 0.2	
Índice PUFA / SFA	Control	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.5	0.27
	Con obesidad	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.2	
Índice de aterogenicidad	Control	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.17
	Con obesidad	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	
Índice de trombogenicidad	Control	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.69
	Con obesidad	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.6	
Índice Omega-6/ Omega-3	Control	12.4 ± 4.2	3.7 ± 1.8*	4.4 ± 3.5*	6.5 ± 4.6*	7.6 ± 6.0*	0.001
	Con obesidad	10.3 ± 2.6	5.1 ± 2.3*	5.2 ± 2.6*	4.9 ± 2.4*	9.0 ± 1.8	
EPA + DHA	Control	1.9 ± 2.8	2.6 ± 1.0	4.1 ± 6.8	1.52 ± 0.7	2.5 ± 2.5	0.08
	Con obesidad	1.2 ± 1.8	6.8 ± 11.9	4.9 ± 6.7	2.2 ± 1.4	0.6 ± 0.4	

Promedio ± DS. ANOVA para dos vías de medidas repetidas.

† Factor tiempo (comparaciones intragrupo vs tiempo 0).

* Significancia estadística $p < 0.05$.

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados SFA: ácidos grasos saturados

5.2. Resultados del Ensayo clínico-2

5.2.1 Efecto de la suplementación con ácidos grasos omega-3 sobre la proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en pacientes con obesidad

Para continuar con el estudio del efecto de la suplementación con EPA y DHA *in vivo* en personas con obesidad y su efecto modulador de los linfocitos T CD4+, se evaluaron las subpoblaciones de éstos por citometría de flujo. En el ensayo clínico-2 solo se suplementó el grupo de participantes con obesidad, el grupo control no recibió suplementación tomando en cuenta los resultados previos en donde no se veían efecto de la suplementación sobre la expresión de marcadores de subpoblaciones de linfocitos T CD4+, que sugerían que dado que el grupo sin obesidad no cursa con un estado inflamatorio la suplementación no modula los linfocitos T CD4+, por lo tanto, este grupo se utilizó con fines de análisis para establecer valores de referencia y con fines comparativos.

Las características inflamatorias y metabólicas de la cohorte de participantes correspondiente al Ensayo clínico 2, se muestra en la **Tabla 7**. En primer lugar, se observó que en sujetos con obesidad existe un incremento en la proporción de linfocitos Th1, Th2, Th17 y de Treg al comparar con el grupo control (**Figura 12A, 12C, 12E, 12H, respectivamente**). La suplementación con EPA y DHA por un mes resultó en la disminución significativa de la proporción de linfocitos Th1, Th2 y Th17, no así de los linfocitos Treg en el grupo de pacientes con obesidad (**Figura 12B, 12D, 12F, 12G, respectivamente**).

TABLA 7. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS, INFLAMATORIOS Y METABÓLICAS ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMETACIÓN CON EPA Y DHA.

	Tiempo 0			AG omega-3		
	Control	Con obesidad	<i>p</i> valor	Con Obesidad Pre-EPA+DHA	Con Obesidad Post-EPA+DHA	<i>p</i> valor
CARACTERÍSTICAS GENERALES						
Edad (years), promedio ± DS	31.8 ± 6.1 30.0	34.2 ± 5.4 35	0.26	33.0 ± 4.9 33.0	33.0 ± 4.9 33.0	0.99
Mediana	24 – 43	26 – 45		26.0 – 41.0	26.0 – 41.0	
Rango						
PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS						
Peso (kg), promedio ± DS	57.8 ± 4.1	106.0 ± 15.4	0.000	106.0 ± 18.2	106.4 ± 17.8	0.96
Mediana	58.4	105.0	1	104.3	105.7	
Rango	50.3 – 64.3	80.1 – 136.9		80.1 – 136.9	80.0 – 136.9	
Masa grasa (kg), promedio ± DS	15.4 ± 3.1 15.4	52.4 ± 12.6 49.8	0.000 1	56.4 ± 13.1 54.6	56.1 ± 12.6 54.2	0.95
Mediana	8.3 – 20.6	36.4 – 75.6		36.4 – 75.6	36.4 – 75.6	
Rango						
Masa grasa (%), promedio ± DS	26.6 ± 4.4 27.5	49.2 ± 6.5 50.4	0.000 1	52.7 ± 3.8 53.1	52.9 ± 3.6 53.9	0.86
Mediana	15.0 – 30.0	36.5 – 58.1		45.5 – 58.1	45.0 – 55.8	
Rango						
Masa libre de grasa (kg), promedio ± DS	42.3 ± 3.0 43.3	53.5 ± 8.1 50.6	0.000 1	50.3 ± 5.3 49.7	50.5 ± 5.5 49.3	0.90
Mediana	36.0 – 47.1	43.7 – 70.5		43.7 – 61.3	43.7 – 61.3	
Rango						
Masa libre de grasa (%), promedio ± DS	73.4 ± 4.4 72.5	50.8 ± 6.5 49.6	0.000 1	47.8 ± 4.5 46.6	48.0 ± 4.8 46.0	0.91
Mediana	68.0 – 85.0	41.9 – 63.5		41.9 – 55.7	41.9 – 57.9	
Rango						
Estatura (m), promedio ± DS	1.60 ± 0.04	1.58 ± 0.07	0.40	1.57 ± 0.06	1.57 ± 0.06	0.99
Mediana	1.6	1.57		1.57	1.57	
Rango	1.5 – 1.7	1.47 – 1.75		1.47 – 1.70	1.47 – 1.70	
IMC (kg/m ²), promedio ± DS	22.4 ± 1.3 22.7	42.2 ± 5.7 41.0	0.000 1	43.1 ± 6.3 42.7	43.4 ± 6.1 44.1	0.91
Mediana	20.1 – 24.2	35.0 – 52.8		35.0 – 52.8	35.0 – 52.8	
Rango						
Índice de masa grasa (kg/m ²), promedio ± DS	6.0 ± 1.1 6.1	21.0 ± 4.9 21.0	0.000 1	22.9 ± 4.6 23.1	22.7 ± 4.5 23.4	0.95
Mediana	3.5 – 7.7	13.3 – 29.2		15.8 – 29.2	15.8 – 29.2	
Rango						
MARCADORES METABÓLICOS						
Glucosa (mg/dL), promedio ± DS	78.7 ± 8.8	89.9 ± 10.4	0.003	87.6 ± 9.4	89.1 ± 11.1	0.69
Mediana	75.5	86.0		85.8	88.0	
Rango	66.6 – 96.3	76.6 – 112.1		76.6 – 112.1	78.6 – 116.8	
Insulina (mU/L) promedio ± DS	3.6 ± 2.5 3.9	51.3 ± 37.7 48.6	0.000 2	66.4 ± 35.3 68.5	41.8 ± 28.1 28.6	0.01
Mediana	0.1 – 9.1	3.7 – 121.2		3.2 – 121.2	6.0 – 82.4	
Rango						
HOMA-IR, promedio ± DS	0.7 ± 0.5	12.4 ± 8.83	0.000	12.9 ± 8.5	8.0 ± 6.7	0.03

	Mediana	0.7	13.1	1	14.1	5.5	
	Rango	0.1 – 1.6	0.7 – 26.1		0.01 – 25.9	0.01 – 18.7	
Colesterol total (mg/dl), promedio ± DS		159.3 ± 25.8	170.5 ± 28.8	0.38	189.3 ± 33.1	181.7 ± 34.1	0.80
	Mediana	156.7	156.9		190.4	181.7	
	Rango	120 – 199	141.6 – 228.7		148.0 – 228.8	157.6 – 205.8	
LDL-C (mg/dl), promedio ± DS		97.5 ± 13.5	106.2 ± 24.5	0.28	112.6 ± 25.4	110.5 ± 26.3	0.73
	Mediana	80.0 – 127.3	60.6 – 163.5		87.0 – 163.5	83.2 – 160.2	
	Rango						
HDL-C (mg/dl), promedio ± DS		51.1 ± 11.5	29.1 ± 7.9	0.000	30.6 ± 10.2	32.6 ± 7.2	0.32
	Mediana	51.3	29.7	2	32.0	32.4	
	Rango	33.3 – 68.4	17.5 – 40.8		17.5 – 40.8	24.4 – 41.2	
Triglicéridos (mg/dL), promedio ± DS		95.6 ± 29.4	197.1 ± 102.2	0.003	209.0 ± 84.7	155.6 ± 50.6	0.005
	Mediana	95.0	155.9		182.9	145.9	
	Rango	46.1 – 152.4	79.2 – 454.1		107.0 – 345.7	86.7 – 244.4	
MARCADORES INFLAMATORIOS							
Leucocitos (x10 ³ /μL), promedio ± DS		5583 ± 1548	9499 ± 1970	0.000	9326 ± 2011	9026 ± 1320	0.57
	Mediana	5460	9500	1	9362	8475	
	Rango	3950 – 9225	5433 – 12600		5433 – 12130	7600 – 11400	
VSE (mm/h), promedio ± DS		9 ± 3	28 ± 11	0.000	30 ± 10	30 ± 11	0.93
	Mediana	9	30	1	33	29	
	Rango	6 – 13	6 – 47		16 – 47	10 – 50	
IL-1β (pg/ml), promedio ± DS		1.02 ± 0.9	0.5 ± 0.3	0.08	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.09
	Mediana	0.6	0.5		0.6	0.2	
	Rango	0.01 – 2.8	0.03 – 1.1		0.03 – 0.9	0.03 – 0.6	
IL-6 (pg/ml), promedio ± DS		1.2 ± 0.7	2.6 ± 1.8	0.03	2.9 ± 2	1.8 ± 0.7	0.03
	Mediana	1.2	2.1		2.3	1.7	
	Rango	0.3 – 2.3	0.5 – 6.9		0.7 – 6.9	1.0 – 3.0	
IL-8 (pg/ml), promedio ± DS		2.8 ± 1.6	4.1 ± 4.9	0.40	4.9 ± 5.8	4.4 ± 5.1	0.08
	Mediana	2.9	2.2		2.1	2.3	
	Rango	0.6 – 6.0	0.4 – 20.5		1.0 – 20.5	0.7 – 17.7	
TNF-α (pg/ml), promedio ± DS		1.3 ± 0.8	1.5 ± 0.9	0.63	1.5 ± 1.1	1.1 ± 0.6	0.23
	Mediana	1.4	1.3		1.3	1.0	
	Rango	0.3 – 2.6	0.6 – 4.6		0.6 – 4.6	0.2 – 2.5	
Leptina (ng/ml) promedio ± DS		4.9 ± 4.5	30.5 ± 18.9	0.000	33.3 ± 18.6	32.6 ± 17.0	0.74
	Mediana	4.1	25.8	1	29.3	35.9	
	Rango	0.1 – 12.7	7.6 – 69.7		7.6 – 69.7	13.0 – 66.9	

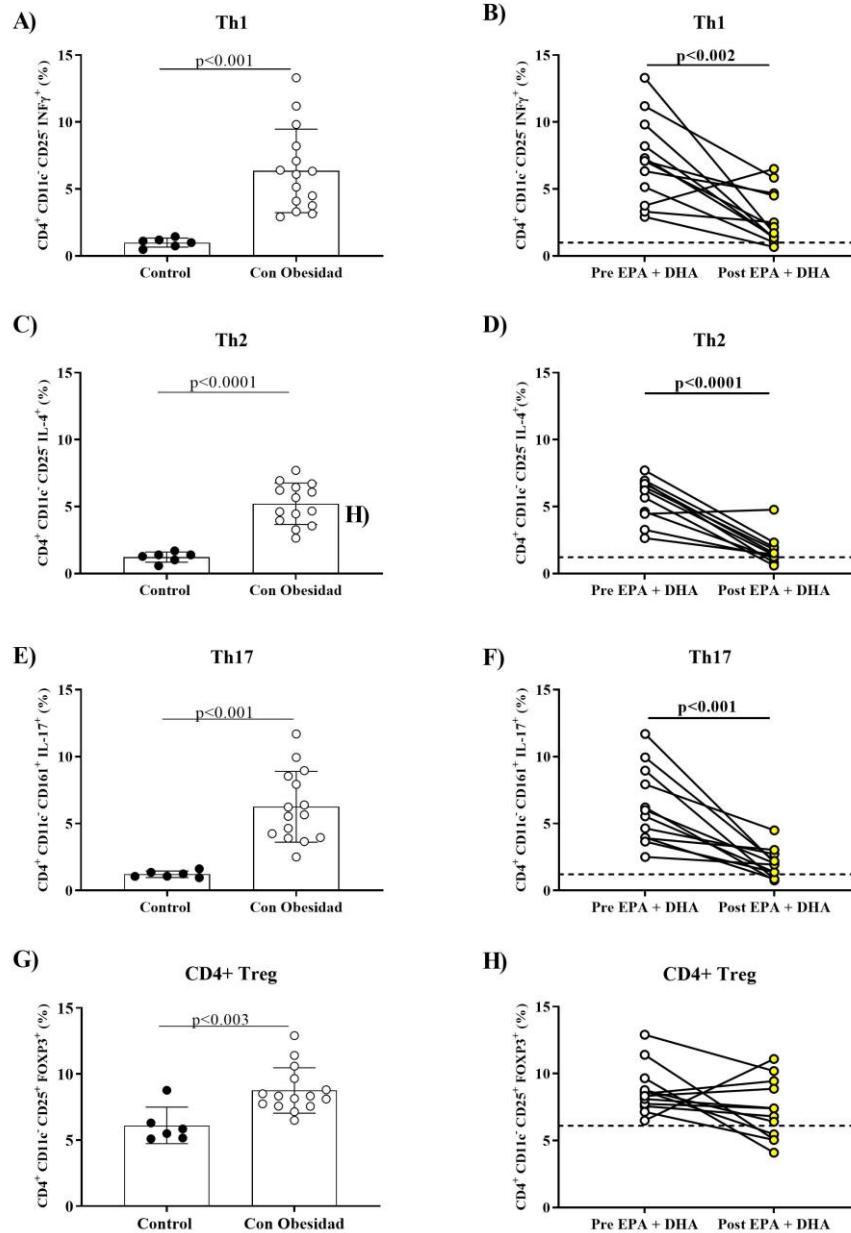


Figura 12. Proporción de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ en circulación y efecto de la suplementación con EPA y DHA. **A)** La proporción de linfocitos Th1 es mayor en el grupo con obesidad vs control. **B)** La proporción de linfocitos Th1 disminuyó significativamente después de un mes de suplementación con EPA y DHA en el grupo con obesidad. **C)** La proporción de linfocitos Th2 es mayor en el grupo con obesidad vs control. **D)** La proporción de linfocitos Th2 disminuyó significativamente después de un mes de suplementación con EPA y DHA en el grupo con obesidad. **E)** La proporción de linfocitos Th17 es mayor en el grupo con obesidad vs control. **F)** La proporción de linfocitos Th17 disminuyó significativamente después de un mes de suplementación con EPA y DHA en el grupo con obesidad. **G)** La proporción de linfocitos Treg es mayor en el grupo con obesidad vs control. **H)** La proporción de linfocitos Treg no cambió después de un mes de suplementación con EPA y DHA en el grupo con obesidad. **Promedio \pm DS. La línea punteada corresponde al valor promedio de la proporción de la subpoblación en el grupo control. Estos datos corresponden al Ensayo clínico-2 después de 1 mes de tratamiento.**

5.2.2. Efecto de la suplementación de AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la funcionalidad de los linfocitos Treg en pacientes con obesidad.

Al evaluar la supresión de la proliferación celular mediada por Treg, se observó que ésta fue significativamente menor en el grupo de participantes con obesidad, en cultivos con razón Tresp: Treg de 1:0.5 fue de $61.1 \pm 10.5\%$ vs $48.8 \pm 13.6\%$ en el grupo control vs con obesidad, respectivamente ($p < 0.04$). En cultivos con razón Tresp: Treg 1:1 la capacidad de supresión fue de 70.0 ± 23.1 vs $54.5 \pm 16.4\%$ en el grupo control vs con obesidad, respectivamente ($p < 0.001$) (Figura 13A, 13C). Estos datos sugieren que la función de los linfocitos Treg podría estar afectada durante la obesidad. La suplementación por dos meses con EPA y DHA resultó en una tendencia de incremento de la supresión de la proliferación celular en pacientes con obesidad (Figura 13B, 13D).

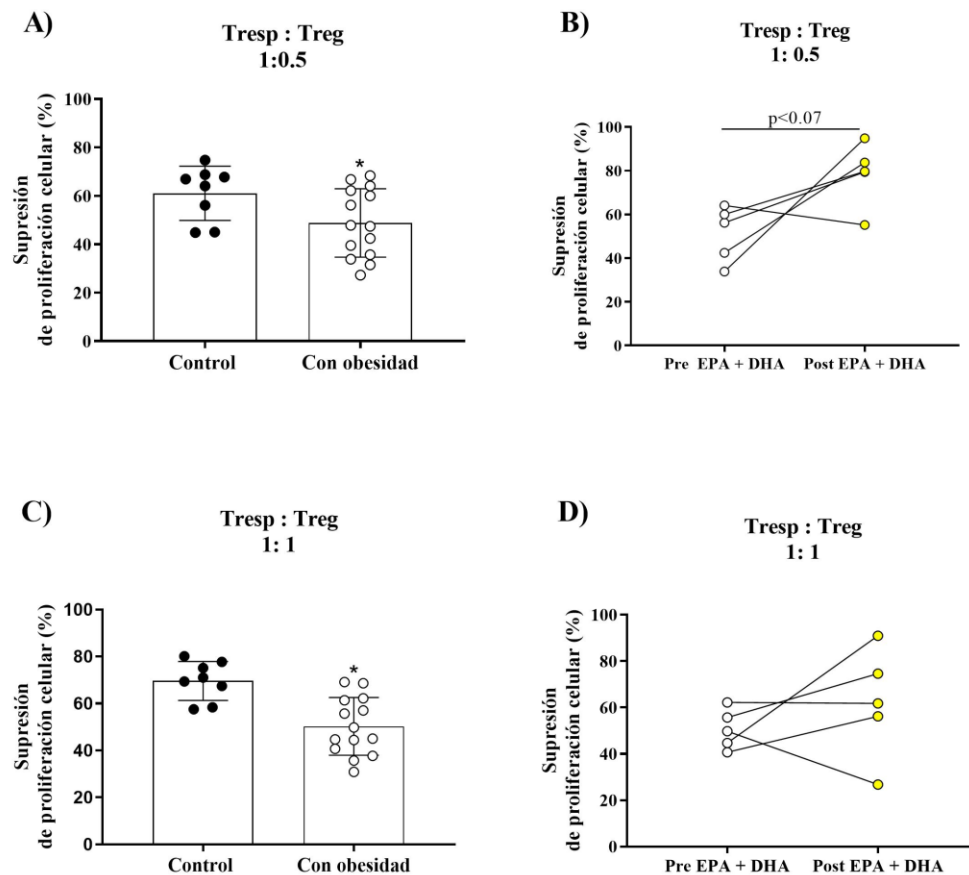


Figura 13. Supresión de la proliferación celular mediada por linfocitos y el efecto de la suplementación con EPA y DHA. **A)** Los linfocitos Treg suprimen la proliferación significativamente menos $p < 0.04$ en el grupo con obesidad vs control. **B)** La suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) por dos meses tuvo tendencia a incrementar la supresión de la proliferación celular en el grupo con obesidad **C)** Los linfocitos Treg suprimen

la proliferación significativamente menos en el grupo con obesidad vs sin obesidad. **D)** La suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) por dos meses tuvo tendencia a incrementar la supresión de la proliferación celular en el grupo con obesidad. Promedio \pm DS. Los datos corresponden al Ensayo clínico-2.

5.2.3. Efecto de la suplementación de AG omega-3 (EPA y DHA) sobre la bioenergética de los linfocitos Treg en pacientes con obesidad.

Por otra parte, se ha descrito que la función de los linfocitos T está determinada en gran parte por las vías metabólicas activas a través de las cuales la célula alcanza su requerimiento energético, por lo que también se determinó la bioenergética de los linfocitos Treg en sujetos con obesidad y en el grupo control. Se observó que no existe diferencia en el consumo de oxígeno basal entre ambos grupos. Sin embargo, una vez que se agregó un desacoplante de la cadena transportadora de electrones (FCCP) para poder evaluar la capacidad máxima de consumo de oxígeno de la célula, se observó que no existe diferencia en el consumo de oxígeno basal de los linfocitos Treg del grupo de participantes con obesidad al comparar con el grupo sin obesidad. Por el contrario, la capacidad de reserva se encontró significativamente disminuida en el grupo con obesidad al comparar con el control (**Figura 14A**). No se observaron diferencias en el consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP, fuga de protones y consumo de oxígeno no mitocondrial al comparar con el grupo sin obesidad (**Tabla 4**). Después de 2 meses de suplementación con EPA y DHA se observó que la capacidad de reserva de los linfocitos Treg incrementó significativamente y alcanza valores similares al grupo de participantes sin obesidad (**Figura 14B**).

Por otra parte, en cuanto a la tasa de acidificación extracelular, que indica metabolismo glicolítico activo, no se observaron diferencias entre el grupo con obesidad y control a nivel basal y posterior a la inyección de oligomicina, sin embargo, el grupo sin obesidad presentó niveles significativamente mayores de ECAR posterior a la inyección con FCCP y Rotenona/Antimicina-A al comparar con el grupo con obesidad (**Figura 15A**), la suplementación con EPA y DHA no tuvo efecto sobre los niveles de ECAR (**Figura 15B**).

Por lo que estos resultados sugieren que la suplementación con EPA y DHA restaura el metabolismo oxidativo por mecanismo desconocidos y posiblemente esto contribuye a mejorar la función supresora de las células Treg de pacientes con obesidad, lo cual puede ser parte del mecanismo antiinflamatorio de los ácidos grasos omega-3, la inducción de tolerancia inmunológica.

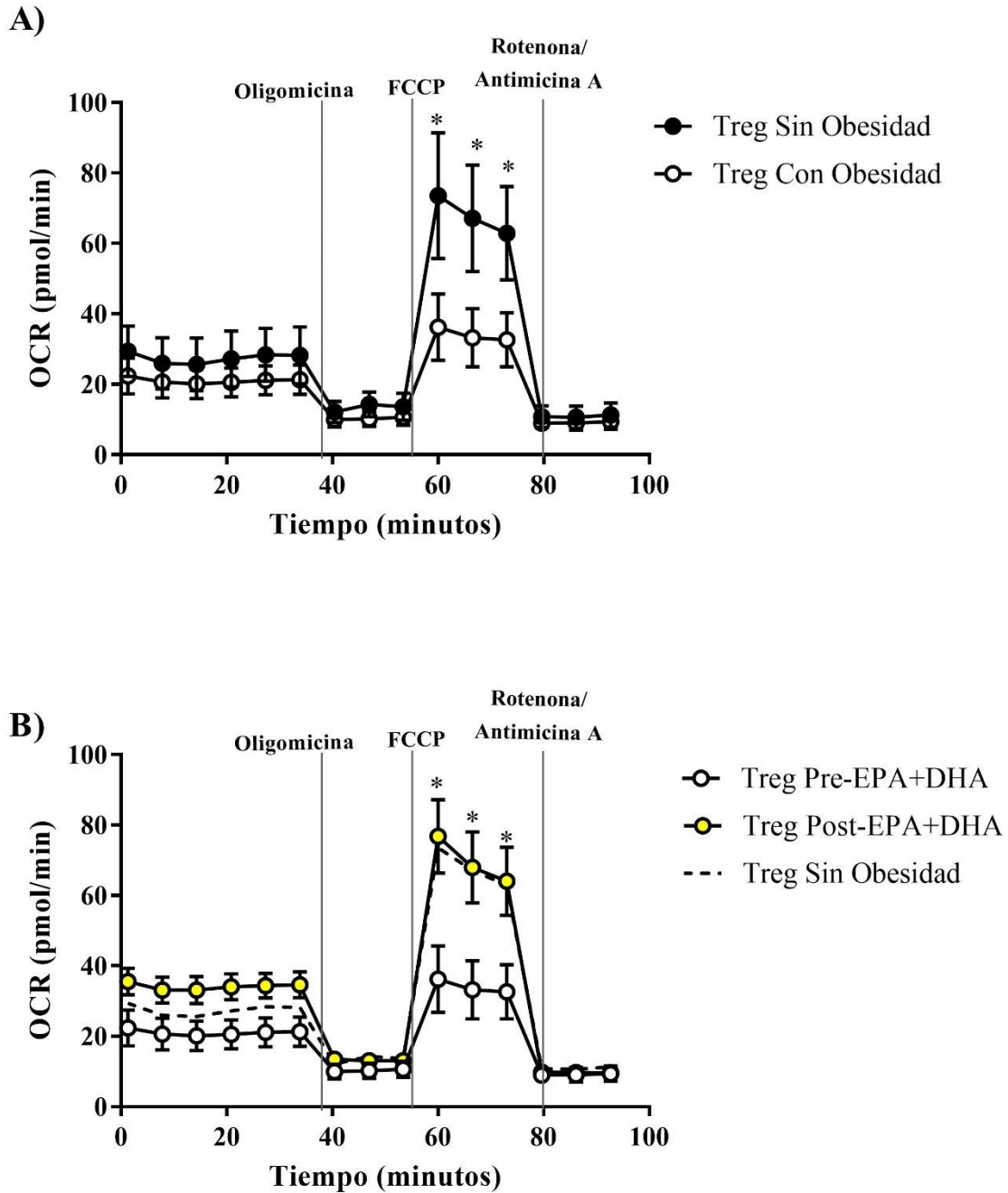
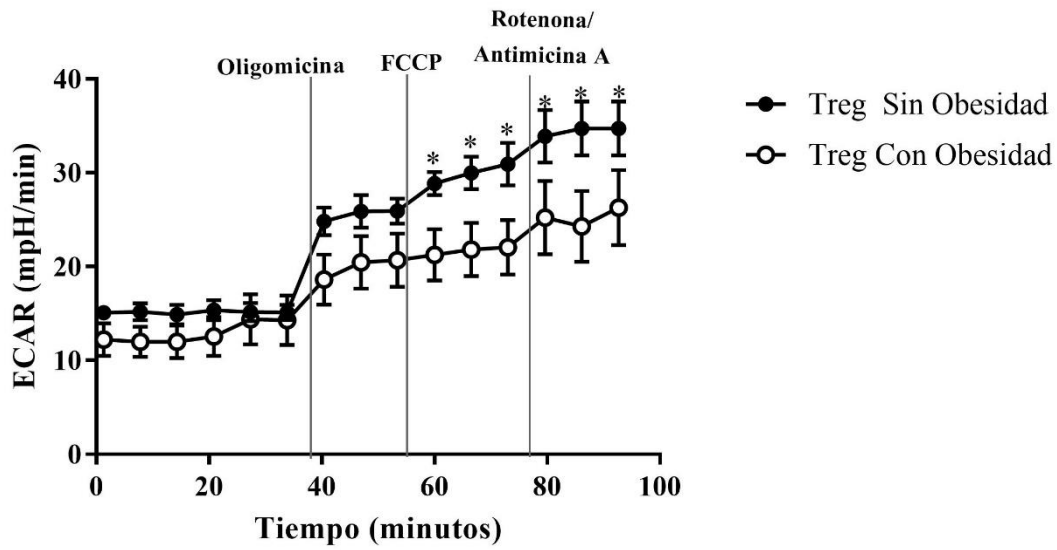


Figura 14. Bioenergética de linfocitos Treg de participantes con y sin obesidad y el efecto de la suplementación con EPA y DHA en pacientes con obesidad. **A)** Tasa de consumo de oxígeno (OCR) basal y posterior a la inyección de oligomicina, FCCP y Rotenona/Antimicina A. Posterior a la inyección con FCCP el OCR fue significativamente menor en el grupo con obesidad. **B)** La suplementación con EPA y DHA aumentó significativamente el OCR posterior a la inyección de FCCP. No cambió el OCR basal, y posterior a la inyección con oligomicina y Rotenona/Antimicina A. Datos mostrados en promedio \pm SEM.

A)



B)

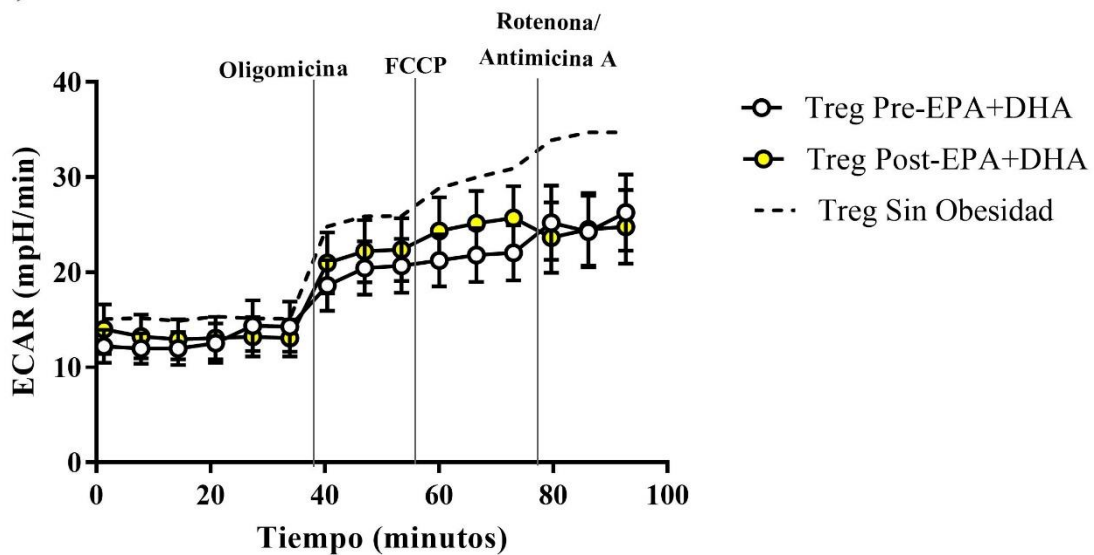


Figura 15. Glucólisis medida por la tasa de acidificación celular en linfocitos Treg de participantes con y sin obesidad y posterior a la suplementación con EPA y DHA. **A)** Los niveles de ECAR basales y posterior a la inyección con oligomicina no fueron diferentes entre grupos, los niveles de ECAR fueron significativamente mayores después de la inyección con FCCP y Rotenona/Antimicina A en el grupo sin obesidad. **B)** La suplementación con EPA y DHA no tuvo efecto sobre los niveles de ECAR.

6.0. DISCUSIÓN

En la obesidad existe un proceso inflamatorio de bajo grado caracterizado por el incremento de linfocitos T CD4+ efectores circulantes, así como de linfocitos Treg, en los que se observó la disminución de su función lo que se relacionó con alteraciones en su bioenergética. La suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) disminuyó la proporción y expresión de marcadores de linfocitos T CD4+ efectores y mejoró la función y la bioenergética de los linfocitos Treg en pacientes con obesidad.

Los resultados aquí presentados se refieren a mujeres con al menos obesidad grado 2, sin enfermedades crónicas, que se suplementaron con cápsulas de aceite de pescado que aportaron 72 kcal al día y que contenían 4.8 g/d (3.2 g de EPA y 1.6 g de DHA). Las participantes no perdieron peso ni presentaron cambios en la composición corporal, por lo que los resultados de este trabajo se deben principalmente al efecto de la suplementación con AG omega-3 y no a intervenciones adicionales.

6.1. Consumo del suplemento e indicadores de apego

Se ha descrito a nivel poblacional que el consumo promedio AG omega-3 en adultos mexicanos es de 0.3 g/d (Ramírez-Silva et al., 2011), lo cual se encuentra por debajo de la recomendación de la FAO que sugiere un consumo de 2.0 g/d de EPA y DHA (Burlingame et al., 2009). El bajo consumo de AG omega-3 en la población mexicana, independiente del estado nutricional, fue confirmado por un elevado índice AA/EPA para el grupo control y con obesidad. De acuerdo a nuestro conocimiento, no se ha reportado el índice AA/EPA en plasma en ninguna cohorte mexicana, los valores de AA/EPA aquí reportados (superiores a 10) son similares a los de EE.UU. Canadá, Grecia, Italia, España y los Países Bajos (Stark et al., 2016), que son países que consumen “dieta occidental”, la cual provoca la activación de células del sistema inmune por su aporte de azúcar, carnes rojas, alta densidad energética, lácteos ricos en grasa saturada y un bajo aporte de fibra, pescado y frutos secos (Christ et al., 2019). En otras regiones del mundo donde el consumo de pescado y productos pesqueros es alto, el índice AA/EPA es bajo (inferior a 5), como los Inuits canadienses, Alaska, Japón, Papua-Nueva Guinea, Corea, Rusia, Islandia y Noruega (Stark et al., 2016).

Después de la suplementación, el índice AA/EPA se redujo de forma significativa en ambos grupos a partir del primer mes de tratamiento y se mantuvo bajo durante el tratamiento. Un

mes después de haber concluido la suplementación, el índice AA/EPA en el grupo con obesidad volvió a su valor inicial, mientras que en el grupo control se mantuvo bajo, aunque no fue diferente de su valor inicial. Por otra parte, el índice omega-6/omega-3 disminuyó a niveles inferiores a 4 durante el tiempo de suplementación, el cual es el valor recomendado (Saini & Keum, 2018), sin embargo, volvió a los niveles iniciales un mes después de haber concluido el tratamiento.

En este estudio se evaluó la concentración de EPA y DHA en plasma como indicador que refleja la ingestión a corto plazo, la cual es dependiente de la dosis de consumo de éstos AG (Yee et al., 2010), mientras que, existen otros indicadores para detectar consumo crónico de estos AG como los eritrocitos. En este estudio se muestran resultados de la concentración de AG omega-3 en plasma para determinar cambios agudos que no podrían detectarse en eritrocitos (Hu et al., 2017). Los eritrocitos podrían ser mejores indicadores para periodos de suplementación más largos (más de 3 meses debido a su recambio celular que es de 120 días).

6.2. Resolvinas en plasma

Por otra parte, la síntesis de SPM a partir de EPA y DHA es parte del mecanismo antiinflamatorio de los AG omega-3. En el ensayo clínico-1 se cuantificó la concentración plasmática de RvE1 en los participantes de la primera fase del estudio, la cual no fue detectable en el grupo control, mientras que, en el grupo con obesidad, se detectó en 3 pacientes al inicio del estudio. Después de un mes de suplementación los niveles de RvE1 incrementaron en ambos grupos sin alcanzar significancia estadística. Es importante destacar que nuestros datos de RvE1 deben tomarse con cautela debido al método de cuantificación empleado, que podría no ser un método confiable para cuantificar de forma adecuada este indicador en plasma. La sensibilidad que se requiere para hacer la cuantificación de resolvinas de forma apropiada es mediante la cromatografía acoplada con espectrometría de masas (Schebb et al., 2022; Weylandt et al., 2023). Estos datos sugieren que la suplementación podría inducir la producción de estos mediadores resolutivos de la inflamación por los leucocitos, lo cual podría ser parte del mecanismo involucrado en inducir la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a fenotipo regulador y disminuir la diferenciación a los fenotipos efectores, lo anterior se ha sido descrito *ex vivo* utilizando RvE1 (Chiurchiù et al., 2016).

6.3. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre marcadores inflamatorios en plasma

Por otra parte, diferentes ensayos clínicos se han realizado para estudiar el efecto de la suplementación con AG omega-3 y los resultados han sido controversiales, esto podría deberse a la heterogeneidad de la metodología empleada en cada uno de los estudios, la dosis, grupo de estudio y tiempo de suplementación (Rangel-Huerta & Gil, 2018; Ridker et al., 2022). La mayoría de los estudios de suplementación que han mostrado efectos antiinflamatorios se realizaron con dosis superiores a 3 g/d (Rangel-Huerta & Gil, 2018), excepto en personas mayores de 45 años con hipercolesterolemia en los que una dosis alta no tuvo efecto (Ridker et al., 2022). En este estudio, se observó un efecto antiinflamatorio de una dosis superior a 3 g/d en mujeres con obesidad entre 18 y 45 años que no tenían ninguna complicación asociada a la obesidad.

De acuerdo a los marcadores inflamatorios en sangre total y en plasma que en este estudio se determinaron, se observó mayor número de leucocitos y en VSE al comparar con el grupo control, lo cual fue consistente en ambos ensayos clínicos. La inflamación se caracteriza por un incremento de leucocitos (Purdy & Shatzel, 2021). Cabe destacar que dicho incremento no sobrepasó los rangos de referencia, por lo que, esto dificulta la detección de la inflamación de bajo grado en la obesidad, es conveniente establecer rangos de referencia de leucocitos para inflamación de bajo grado. En una cohorte italiana se observó que la inflamación de bajo grado, caracterizada por presentar leucocitos a partir de 7.5 a $9.9 \times 10 \text{ mm}^3$, que se asoció con el incremento en el riesgo de mortalidad (Bonaccio et al., 2016), en este estudio, el promedio del grupo con obesidad se encuentra en este rango, indicando la presencia de inflamación de bajo grado, por lo que, con una prueba tan fácil y barata como lo es la cuenta de leucocitos, podríamos identificar inflamación de bajo grado a nivel clínico.

Por otra parte, de forma basal, la concentración de leptina fue significativamente mayor en el grupo con obesidad. Asimismo, se encontró una tendencia de incremento de IL-6 e IL-8 en el grupo con obesidad, lo cual fue consistente en los dos ensayos clínicos.

De forma interesante, la concentración plasmática basal de TNF- α , no fue diferente entre el grupo con obesidad al comparar con el grupo control, lo cual fue consistente en ambos ensayos clínicos. Esta similitud en la concentración plasmática de TNF- α , ya se había

reportado anteriormente (Kuo & Halpern, 2011), lo cual llama la atención, ya que TNF- α es una citocina inflamatoria sintetizada por las células del sistema inmune y por los adipocitos y se ha descrito que promueve la resistencia a la insulina mediante la alteración en la señalización del receptor de la insulina (Mohallem & Aryal, 2020), sin embargo, el grupo control no presentó resistencia a la insulina a pesar de tener niveles similares de TNF- α al grupo con obesidad. Un modelo murino mostró que la delección genética de TNF- α no mostró mejoras en la resistencia a la insulina (Aladhami et al., 2021). Por lo anterior, es posible que existan otros factores implicados en el desarrollo y evolución de la resistencia a la insulina aparte de TNF- α , que pueden incluir el desbalance en los niveles de leptina, adiponectina e IL-10, dicho desbalance también es parte del estado inflamatorio en obesidad.

Por otra parte, se encontró una tendencia de incremento de IL-6 en ambas cohortes, esta citocina es producida por muchos tipos de células (monocitos, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos) se ha descrito que más del 35% de la IL-6 circulante se debe a la síntesis de ésta por el tejido adiposo (Purdy & Shatzel, 2021), el incremento de IL-6 y TNF- α es importante porque participan en la inducción de vías inflamatorias a través de la activación del Factor nuclear *kappa* β (NF- κ B) produciendo un aumento de varias citocinas.

La suplementación con EPA y DHA disminuyó la concentración de citocinas inflamatorias en plasma, como TNF- α e IL-6, desde el primer mes de suplementación con EPA y DHA, en el grupo control y con obesidad. Así mismo, se observó que la suplementación con AG omega-3 disminuyó la expresión de mRNA de TNF- α y de IL-6 en PBMC de forma significativa. Estos efectos podrían explicarse por la interacción de EPA y DHA con el receptor acoplado a proteína G 120 (GPR120) (Oh et al., 2010), o a través de PPAR γ , ambas resultan en la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Chandra et al., 2017; Oh et al., 2010).

Un mes después de concluir el tratamiento, el nivel de transcripción de TNF- α en PBMC se mantuvo bajo, sin embargo, un mes después de haber concluido la suplementación con EPA y DHA, los niveles plasmáticos regresaron a los valores iniciales. Esto puede explicarse debido a que TNF- α es sintetizada por otras células aparte de las células del sistema inmune. Los resultados del ensayo clínico-1, que nos permiten ver el efecto un mes después de haber concluido la suplementación, sugieren que el efecto antiinflamatorio de EPA y DHA

mantiene en PBMC al menos un mes después de concluir el tratamiento. Esto concuerda con lo que se describió en un estudio previo en el que se incluyeron voluntarios sanos que consumieron 18g de aceite de pescado, equivalente a 4.6 g de EPA y DHA, redujo la síntesis de TNF-a e IL-1b *ex vivo* en PBMC, dicho efecto se observó incluso 10 semanas después de haber terminado la suplementación (Endres et al., 1989), esto podría deberse a la incorporación de EPA y DHA a las membranas celulares de PBMC (Mason et al., 2020) y al tiempo de recambio de las células linfoides (Sender & Milo, 2021).

6.4. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre los linfocitos T CD4+ circulantes

En el ensayo clínico-1, de forma basal, se observó elevada la transcripción de marcadores de Th1 (TBX21 e IFNG), Th2 (GATA3 e IL4) y de Treg (FOXP3 e IL10) en PBMC en el grupo con obesidad al comparar con el grupo control. Estos datos concuerdan con los resultados observados en tejido adiposo subcutáneo (Travers et al., 2015; Zeyda et al., 2011) y visceral de pacientes con obesidad mórbida (Zeyda et al., 2011). Por lo anterior, es posible que las PBMC pueden ser utilizadas como biomarcador de la inflamación en tejido adiposo (Pecht et al., 2014).

En el ensayo clínico-2, en donde se evaluaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ circulantes por citometría de flujo, se encontró que la proporción de Th1, Th2, Th17 y Treg fue mayor en sujetos con obesidad al comparar con el grupo control. Estos datos aportan evidencia que contribuye a describir el proceso inflamatorio crónico y sistémico de bajo grado en la obesidad. Nuestros resultados concuerdan con el incremento de Th2 y Treg circulantes observado en pacientes con obesidad mórbida (Gómez F, 2011; Van Der Weerd et al., 2012). En cuanto a los linfocitos Treg, no es concluyente el estado de éstos en la condición de obesidad (Bradley et al., 2022; Wagner et al., 2013). Llama la atención el incremento de Treg acompañado del incremento de linfocitos T CD4+ efectores, lo que sugiere que la función de las Treg podría estar afectada.

Como resultado de la suplementación con AG omega-3, la cantidad de leucocitos no se modificó en todo el curso del estudio, es posible que para evaluar el efecto antiinflamatorio de esta u otra intervención nutricional, los leucocitos no sean un marcador sensible para

detectarlo, ya que la suplementación tuvo efectos importantes en los niveles de expresión de mRNA de marcadores de Th1 (TBX21 y IFNG), Th2 (GATA3 e IL4) y Treg (FOXP3 y IL10).

La suplementación con EPA y DHA disminuyó la proporción de linfocitos Th1, Th2 y Th17, no así de Treg. Esta disminución de linfocitos T CD4+ efectores es consistente con otros reportes en los que se describe que los AG omega-3 modulan la activación, diferenciación y proliferación de subpoblaciones de linfocitos T CD4+, disminuyendo los linfocitos Th1 (Chiurchiù et al., 2016; Cucchi et al., 2020; Forsberg et al., 2020; Yang-Yi Fan, Natividad R. Fuentes, Tim Y. Hou, Rola Barhoumi et al., 2018), mediante la incorporación de EPA y DHA en los fosfolípidos de membranas, lo que incrementa la fluidez y afecta el reclutamiento de proteínas involucradas en la activación de los linfocitos T y la expansión (Yang-Yi Fan, Natividad R. Fuentes, Tim Y. Hou, Rola Barhoumi et al., 2018).

De forma importante, la inclusión del grupo sin obesidad nos permitió conocer el efecto de la suplementación en ausencia de un proceso inflamatorio activo, y se observó que la expresión de mRNA de marcadores de Th1, Th2 y Treg no se modificaron en todo el curso del tratamiento, con lo que podemos inferir que, en ausencia de inflamación, la suplementación no suprime la respuesta inmunológica. Por este motivo, no se suplementaron los participantes del grupo control en el ensayo clínico-2.

6.5. Efecto de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) sobre los linfocitos Treg (funcionalidad y bioenergética).

La proporción de linfocitos Treg se encontró incrementada en el grupo con obesidad al comparar con el grupo control. Después de 1 mes de suplementación con EPA y DHA en el grupo con obesidad, no se encontró cambio en la proporción de linfocitos Treg. La suplementación con AG omega-3 en un grupo de mujeres embarazadas no tuvo en efecto en la proporción de los linfocitos Treg (Forsberg et al., 2020). Sin embargo, en el presente estudio, al evaluar la capacidad supresora de los linfocitos Treg, que estaba disminuida en la obesidad, después de 2 meses de suplementación, se observó una tendencia a incrementar, es posible que no se encontrara significancia estadística debido al tamaño muestral, sin embargo, estos datos sugieren que si bien no hay un cambio en la proporción de Treg secundario al tratamiento con EPA y DHA, si lo hay a nivel de capacidad de supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ efectores.

Por otra parte, se observó que en el grupo con obesidad existen alteraciones en la bioenergética de los linfocitos Treg, la capacidad de reserva se encontró significativamente disminuida, este es indicador de la capacidad de las células para producir ATP por OXPHOS en una situación de incremento en la demanda energética (Desler et al., 2012).

En condiciones normales, FOXP3, factor de transcripción maestro de los linfocitos Treg, controla el metabolismo celular promoviendo la oxidación de ácidos grasos y limitando la glucólisis a través de la inhibición de mTORC2. La oxidación de ácidos grasos le permite a los linfocitos Treg presentar una óptima capacidad supresora (Georgiev et al., 2019). Bajo condiciones inflamatorias, señales de TLR1/2 promueven la glucólisis mediante la expresión de GLUT1 de forma dependiente de mTORC1 a través de la modulación de la expresión de FOXP3 en los linfocitos Treg (Georgiev et al., 2019).

La suplementación con EPA y DHA mejoró, específicamente la capacidad de reserva respiratoria, y también se observó una tendencia de incrementar la respiración basal y la respiración asociada a la producción de ATP. Previamente se ha descrito en otros tejidos que la administración de EPA y DHA puede inducir la biogénesis mitocondrial y mejorar la funcionalidad de la mitocondrial (Kalupahana et al., 2011; Lepretti et al., 2018), así mismo, se ha reportado en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática, que la administración de EPA y DHA disminuyó la fisión mitocondrial e incrementó la expresión de proteínas de fusión mitocondrial lo cual mejora la función de éstas (Zhang et al., 2011). En PBMC se mostró que SPM derivados de EPA como 18R-HEPE y Resolvina E1, disminuyen la disfunción mitocondrial al modular la fisión, lo que se relacionó con la disminución de la síntesis de citocinas inflamatorias (Hecker et al., 2018)

Por otra parte, es posible que parte del efecto antiinflamatorio de los AG omega-3 sea mediado por el incremento de la regulación inmunológica. En el ensayo clínico-1, se observó que la concentración de IL-10 y TGF- β en plasma, citocinas producidas en parte por las Treg, tuvieron una tendencia de incremento en el grupo con obesidad, y en el ensayo clínico-2, se observó una tendencia de incremento en la capacidad supresora de Treg, lo cual podría deberse, a la mejora del metabolismo oxidativo de los linfocitos Treg por mecanismos desconocidos y posiblemente, esto contribuye a mejorar la función supresora de las células

Treg de pacientes con obesidad, lo cual puede ser parte del mecanismo antiinflamatorio de los ácidos grasos omega-3, la inducción de tolerancia inmunológica.

6.6. Efecto de la suplementación con AG omega-3 sobre parámetros metabólicos

En cuanto al efecto de la suplementación con AG omega-3 a nivel metabólico, en ambos ensayos clínicos, se observó la disminución significativa de la concentración de insulina y de índice HOMA-IR (indicador de resistencia a la insulina) en sujetos con obesidad desde el primer mes de tratamiento y durante todo el curso del estudio, incluso un mes después de haber terminado la suplementación. De forma interesante, el valor de HOMA-IR disminuyó a niveles de referencia (< 2.5) (Tang et al., 2015). Estos datos son prometedores, sin embargo, se requieren otros estudios en los que se determine la sensibilidad a la insulina por otros métodos como el clamp euglicémico-hiperinsulinémico que es el “*gold standard*” para evaluar sensibilidad a la insulina, solo de esta manera se podrá corroborar el efecto de la suplementación con EPA y DHA en pacientes con obesidad. Es posible que los mecanismos que median el efecto la suplementación con EPA y DHA involucren la remodelación de la membrana incluyendo la membrana mitocondrial, lo cual puede relacionarse con el incremento de la expresión de proteínas de fusión mitocondrial, que se asocia con un incremento en la sensibilidad a la insulina y disminución de la inflamación (Sinha et al., 2023).

Por otra parte, la concentración de triglicéridos se redujo. En el ensayo clínico-1, encontramos que después de un mes de haber concluido la suplementación, los niveles de triglicéridos regresaban a niveles similar al basal, lo que sugiere que el efecto se mantiene mientras el paciente consuma el suplemento de aceite de pescado. La disminución de triglicéridos es uno de los efectos más reportados de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) por un mecanismo que no está completamente elucidado (Bornfeldt, 2021; Q. K. Liu, 2021).

La concentración de HDL-C tuvo una tendencia a incrementar en el grupo control y en el grupo con obesidad, sin embargo, este incremento podría tener relevancia clínica ya que se ha reportado que por cada 1 mg/dL de aumento en la concentración de HDL-C, el riesgo cardiovascular disminuye 6% (Singh et al., 2007).

El índice TG/HDL-C se ha utilizado como marcador predictor de resistencia a la insulina y se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Azarpazhooh et al., 2021), se encontró por arriba de 3 en el grupo con obesidad, y hubo una tendencia de disminución durante la intervención y un mes después de haber concluido la suplementación, volvió a su valor inicial.

Las mejoras en la inflamación y la resistencia a la insulina como resultado de una dosis alta de AG omega-3 *in vivo* en sujetos con obesidad que se reportan en esta investigación, podrían ser clínicamente importantes, ya que se ha reportado que la mortalidad temprana está relacionada con la presencia de inflamación y niveles elevados de insulina, no se encontró relación directa del IMC con la mortalidad (Wiebe et al., 2022).

Este estudio muestra los efectos de la suplementación con EPA y DHA *in vivo*, los resultados sugieren órganos y células blanco, entre ellos están las células del sistema inmune, específicamente células mononucleares y linfocitos T CD4+ en donde de acuerdo con la expresión de mRNA de marcadores, citocinas en plasma y porcentaje de linfocitos T CD4+ sugieren que EPA y DHA tiene un efecto antiinflamatorio. Por otra parte, el tejido adiposo podría ser órgano blanco de la suplementación con ácidos grasos omega-3, si bien se encontraron tendencias de cambio en los niveles de leptina y adiponectina, eso sugiere que, sin pérdida de peso, los AG omega-3 pueden tener efectos sobre la funcionalidad del tejido adiposo de personas con obesidad y normopeso. Así mismo, de acuerdo con los resultados en los niveles de HOMA-IR, insulina, es posible que el músculo y páncreas sean órganos blanco de la suplementación, ya que incrementó la sensibilidad a la insulina lo cual generó una disminución de insulina en ayuno. A nivel hepático es posible que también haya efectos secundarios a la suplementación con AG omega-3, ya que se encontró una disminución de triglicéridos en plasma (**Figura 16**). Sería conveniente continuar con estudios que contribuyan a elucidar el mecanismo de estos efectos secundarios a la suplementación con EPA y DHA. Los mecanismos podrían incluir la remodelación de la membrana celular y de organelos como la mitocondria, así como la modulación de factores de transcripción que permitan la expresión de genes asociados a los efectos observados, entre ellos se encuentran PPAR- γ , PPAR- α , NF-kB, PGC1- α , entre otros. Es importante considerar que estos mecanismos posiblemente no son excluyentes.

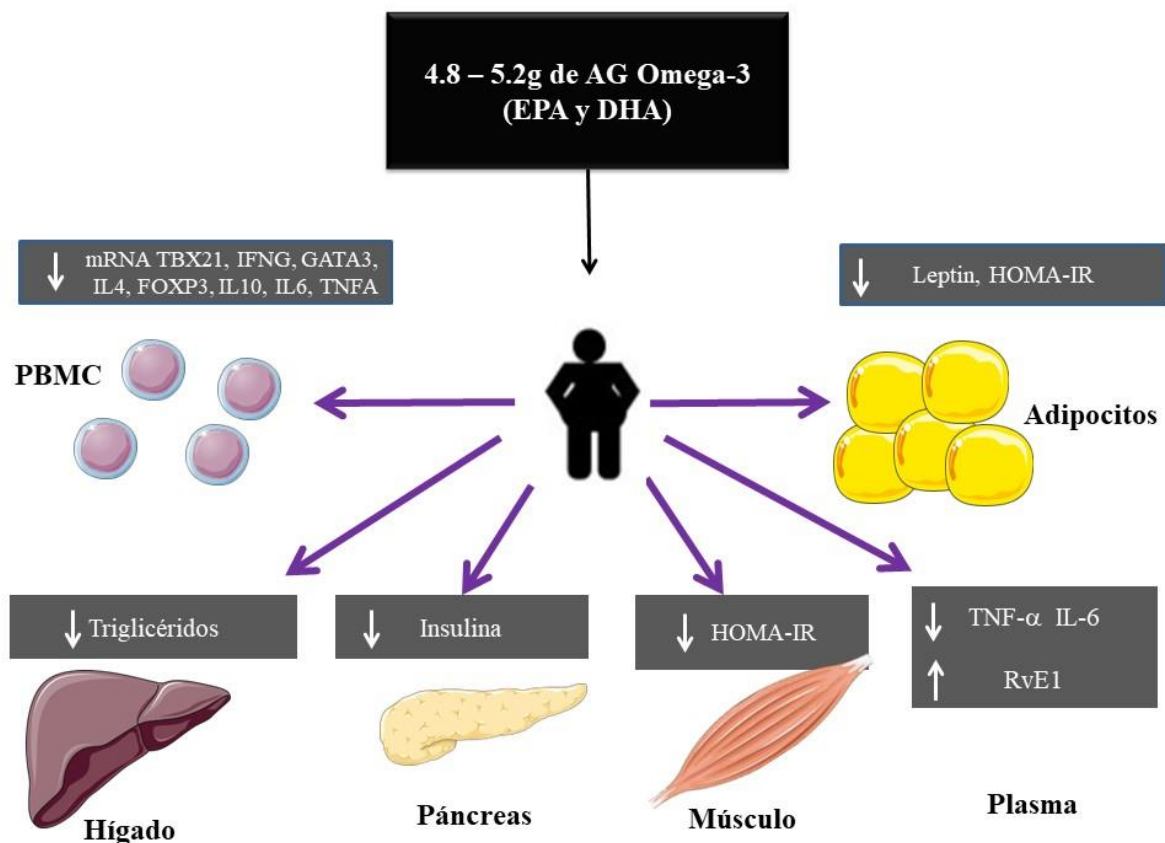


Figura 16. Posibles órganos blanco de la suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) en personas con obesidad.

Las fortalezas de este estudio abarcan el desarrollo de 2 ensayos clínicos en el que se evaluó el efecto de la suplementación. En el ensayo clínico-1 se estudió la suplementación con dosis altas por tres meses (de forma mensual para identificar a partir de qué mes se observan cambios) y un mes después de haber terminado la suplementación, para estudiar el efecto a largo plazo de la suplementación sobre parámetros inflamatorios y metabólicos. Otra fortaleza fue que, en el ensayo clínico-1, se incluyeron participantes sanos con el objetivo de utilizarlo como grupo de referencia y para contrastar las diferencias en los marcadores inflamatorios y metabólicos con el grupo con obesidad, es decir, se estudiaron fenotipos extremos (Sin Obesidad vs Con obesidad).

Una limitación fue la falta de un grupo placebo, sin embargo, se decidió que no era conveniente incluir un grupo placebo debido al efecto inmunomodulador de otros ácidos grasos, lo cual podría no mostrar el efecto real de la suplementación, por lo que se optó por

hacer un diseño de estudio no cegado, en el que cada individuo fuera su propio control. Otra limitación fue que en el ensayo clínico-2 el grupo control no recibió suplementación, sin embargo, esto fue debido a que en el ensayo clínico-1 no se observó cambio en la expresión de marcadores de linfocitos T CD4+. Así mismo, una limitante más de esta investigación es la falta de datos de consumo de ácidos grasos omega-3, en específico EPA y DHA. Y por último, otra limitación fue la falta de biopsias para analizar los linfocitos T CD4+ en tejido adiposo.

7.0. CONCLUSIÓN

En la obesidad existe un proceso inflamatorio de bajo grado caracterizado por el incremento de linfocitos T CD4+ efectores circulantes, así como de linfocitos Treg, los cuales tienen disminuida la capacidad supresora de proliferación celular, lo cual se relacionó con alteraciones en su bioenergética. La suplementación con AG omega-3 (EPA y DHA) disminuyó la proporción y expresión de marcadores de linfocitos T CD4+ efectores y mejoró su capacidad supresora de proliferación celular y la bioenergética de los linfocitos Treg en pacientes con obesidad.

8.0 PERSPECTIVAS

- Estudiar la composición lipídica de membranas celulares de linfocitos T CD4+ y de mitocondrias como posible mecanismo mediador de inflamación.
- Evaluar otros marcadores a nivel genómico, como PPAR- γ en linfocitos T CD4+.
- Estudiar otros mecanismos de activación de los linfocitos T CD4+ en la condición de obesidad: adiponectina, leptina y sus receptores.

9.0. REFERENCIAS

- Ahmed B, Sultana R, Greene MW. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>
- Aladhani AK, Unger CA, Ennis SL, Altomare D, Ji H, Hope MC, Velázquez KT, Enos RT. (2021). Macrophage tumor necrosis factor-alpha deletion does not protect against obesity-associated metabolic dysfunction. *The FASEB Journal*, 35. <https://doi.org/10.1096/fj.202100543RR>
- Artemniak-Wojtowicz D, Kucharska AM, Stelmaszczyk-Emmel A, Majcher A, Pyrzak B. (2022). Changes of Peripheral Th17 Cells Subset in Overweight and Obese Children After Body Weight Reduction. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.917402>
- Azarpazhooh MR, Najafi F, Darbandi M, Kiarasi S, Oduyemi T, Spence JD. (2021). Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio: A Clue to Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, and Severe Atherosclerosis. *Lipids*, 56: 405–412. <https://doi.org/10.1002/lipd.12302>
- Baixauli F, Acín-Pérez R, Villarroya-Beltrí C, Mazzeo C, Nuñez-Andrade N, Gabandé-Rodríguez E, Ledesma MD, Blázquez A, Martín MA, Falcón-Pérez JM, Redondo JM, Enríquez JA, Mittelbrunn M. (2015). Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory t cell responses. *Cell Metabolism*, 22: 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.020>
- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59: 566–573. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01440.x>
- Bonaccio M, Di Castelnuovo A, Pounis G, De Curtis A, Costanzo S, Persichillo M, Cerletti C, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. (2016). A score of low-grade inflammation and risk of mortality: prospective findings from the Moli-sani study. *Haematologica*, 101: 1434–1441. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144055>
- Bornfeldt KE. (2021). Triglyceride lowering by omega-3 fatty acids: a mechanism mediated by N-acyl taurines. *Journal of Clinical Investigation*, 131. <https://doi.org/10.1172/JCI147558>
- Borraro G. (2018). Tg/Hdl-C Ratio as Cardio-Metabolic Biomarker even in Normal Weight Women. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 14: 261–267. <https://doi.org/10.4183/aeb.2018.261>
- Bradley D, Smith AJ, Blaszcak A, Shantaram D, Bergin SM, Jalilvand A, Wright V, Wyne KL, Dewal RS, Baer LA, Wright KR, Stanford KI, Needleman B, Brethauer S, Noria S, Renton D, Joseph JJ, Lovett-Racke A, Liu J, Hsueh WA. (2022). Interferon gamma mediates the reduction of adipose tissue regulatory T cells in human obesity. *Nature Communications*, 13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33067-5>
- Breda CN, Davanzo GG, Basso PJ, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PM. (2019). Mitochondria as central hub of the immune system. In *Redox Biology*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101255>
- Burlingame B, Nishida C, Uauy R, Weisell R. (2009). Fats and fatty acids in human nutrition: Introduction. In *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55. <https://doi.org/10.1159/000228993>
- Carlsson JA, Wold AE, Sandberg AS, Östman SM. (2015). The Polyunsaturated Fatty Acids Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid Induce Mouse Dendritic Cells Maturation but Reduce T-Cell Responses In Vitro. *PLOS ONE*, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143741>
- Chandra M, Miriyala S, Panchatcharam M. (2017). PPAR γ and Its Role in Cardiovascular Diseases. *PPAR Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6404638>

- Chen X, Wu Y, Wang L. (2013). Fat-Resident Tregs: An Emerging Guard Protecting From Obesity-Associated Metabolic Disorders. *Obesity Reviews*, 14. <https://doi.org/10.1111/obr.12033>
- Chiang N, Serhan CN. (2020). Specialized pro-resolving mediator network: an update on production and actions. *Essays in Biochemistry*, 64: 443–462. <https://doi.org/10.1042/EBC20200018>
- Chiurchiù V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, MaCarrone M, Serhan CN. (2016). Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Science Translational Medicine*, 8: 1–24. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf7483>
- Christ A, Lauterbach M, Latz E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51: 794–811. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>
- Cucchi D, Camacho-Muñoz D, Certo M, Niven J, Smith J, Nicolaou A, Mauro C. (2020). Omega-3 polyunsaturated fatty acids impinge on CD4+ T cell motility and adipose tissue distribution via direct and lipid mediator-dependent effects. *Cardiovascular Research*, 116. 1006–1020. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz208>
- Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. (2012). Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? *Journal of Aging Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/192503>
- Eggers LF, Schwudke D. (2016). Liquid Extraction: Folch. In *Encyclopedia of Lipidomics*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_89-1
- Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. (2017). Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. *Archives of Medical Science*, 13: 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
- Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC, Schaefer EJ, Wolff SM, Dinarello CA. (1989). The Effect of Dietary Supplementation with n—3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Synthesis of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by Mononuclear Cells. *New England Journal of Medicine*, 320: 265–271. <https://doi.org/10.1056/nejm198902023200501>
- Faas MM, de Vos P. (2020). Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165845>
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, 15: 930–939. <https://doi.org/10.1038/nm.2002>
- Forsberg A, Abrahamsson TR, Nilsson L, Ernerudh J, Duchén K, Jenmalm MC. (2020). Changes in peripheral immune populations during pregnancy and modulation by probiotics and ω -3 fatty acids. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75312-1>
- Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Ramírez B, Becerril S, Salvador J, Colina I, Gómez-Ambrosi J. (2019). Adiponectin-leptin Ratio is a Functional Biomarker of Adipose Tissue Inflammation. *Nutrients*, 11. <https://doi.org/10.3390/nu11020454>
- Georgiev P, Charbonnier LM, Chatila TA. (2019). Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *Journal of Clinical Immunology*, 39: 623–640. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00684-7>
- Gijón-Conde T, Graciani A, Guallar-Castillón P, Aguilera MT, Rodríguez-Artalejo F, Banegas JR. (2015). Leptin Reference Values and Cutoffs for Identifying Cardiometabolic Abnormalities in the Spanish Population. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 68: 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2014.08.015>

- Gómez F, Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Llorente L, Nunez M, Sosa-Alvarado C, et al. (2011). Peripheral blood T cell populations are altered in morbidly obese patients. *Ann Nutr Metab*, 1: 197.
- Grievink HW, Luisman T, Klufft C, Moerland M, Malone KE. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14: 410–415. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0104>
- Han JM, Levings MK. (2013). Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation. *The Journal of Immunology*, 191: 527–532. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301035>
- Hecker M, Sommer N, Foch S, Hecker A, Hackstein H, Witzenrath M, Weissmann N, Seeger W, Mayer K. (2018). Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863: 1016–1028. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.06.011>
- Howie D, Cobbold SP, Adams E, Ten Bokum A, Necula AS, Zhang W, Huang H, Roberts DJ, Thomas B, Hester SS, Vaux DJ, Betz AG, Waldmann H. (2017). Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 2. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89160>
- Hu XF, Sandhu SK, Harris WS, Chan HM. (2017). Conversion ratios of *n*-3 fatty acids between plasma and erythrocytes: a systematic review and meta-regression. *British Journal of Nutrition*, 117: 1162–1173. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001052>
- Iwami D, Nonomura K, Shirasugi N, Niimi M. (2011). Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *International Immunopharmacology*, 11: 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.11.035>
- Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (2011). (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: Mechanistic insights. *Advances in Nutrition*, 2: 304–316. <https://doi.org/10.3945/an.111.000505>
- Kavyani Z, Musazadeh V, Fathi S, Hossein Faghfour A, Dehghan P, Sarmadi B. (2022). Efficacy of the omega-3 fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: An umbrella meta-analysis. *International Immunopharmacology*, 111. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109104>
- Kim W, Lee H. (2013). Advances in Nutritional Research on Regulatory T-Cells. *Nutrients*, 5: 4305–4315. <https://doi.org/10.3390/nu5114305>
- Kris-Etherton PM, Richter CK, Bowen KJ, Skulas-Ray AC, Jackson KH, Petersen KS, Harris WS. (2019). Recent Clinical Trials Shed New Light on the Cardiovascular Benefits of Omega-3 Fatty Acids. In *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 15: 171–178. <https://doi.org/10.14797/mdcj-15-3-171>
- Kuo SM, Halpern MM. (2011). Lack of association between body mass index and plasma adiponectin levels in healthy adults. *International Journal of Obesity*, 35: 1487–1494. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.20>
- Lalia A, Lanza I. (2016). Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids: Lost in Translation? *Nutrients*, 8. <https://doi.org/10.3390/nu8060329>
- Lee J, Choi YR, Kim M, Park JM, Kang M, Oh J, Lee CJ, Park S, Kang SM, Manabe I, Ann SJ, Lee SH. (2021). Common and differential effects of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on helper T-cell responses and associated pathways. *BMB Reports*, 54: 278–283. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.5.267>
- Lepretti M, Martucciello S, Aceves MA, Putti R, Lionetti L. (2018). Omega-3 fatty acids and insulin resistance: focus on the regulation of mitochondria and endoplasmic reticulum stress. *Nutrients*, 10. <https://doi.org/10.3390/nu10030350>

- Li K, Huang T, Zheng J, Wu K, Li D. (2014). Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : A meta-analysis. *PLoS ONE*, 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088103>
- Lian M, Luo W, Sui Y, Li Z, Hua J. (2015). Dietary n-3 PUFA protects mice from Con a induced liver injury by modulating regulatory T cells and PPAR- γ expression. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132741>
- Liu QK. (2021). Triglyceride-lowering and anti-inflammatory mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids for atherosclerotic cardiovascular risk reduction. *Journal of Clinical Lipidology*, 15: 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2021.05.007>
- Liu YX, Yu JH, Sun JH, Ma WQ, Wang JJ, Sun GJ. (2023). Effects of Omega-3 Fatty Acids Supplementation on Serum Lipid Profile and Blood Pressure in Patients with Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Foods*, 12. <https://doi.org/10.3390/foods12040725>
- Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. (2016). Metabolic inflammation-differential modulation by dietary constituents. *Nutrients*, 8. <https://doi.org/10.3390/nu8050247>
- Mason RP, Libby P, Bhatt DL. (2020). Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40: 1135–1147. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313286>
- Mohallem R, Aryal UK. (2020). Regulators of TNF α mediated insulin resistance elucidated by quantitative proteomics. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77914-1>
- Newton R, Priyadarshini B, Turka LA. (2016). Immunometabolism of regulatory T cells. *Nature Immunology*, 17: 618–625. <https://doi.org/10.1038/ni.3466>
- Nyambuya TM, Dlundla PV, Mxinwa V, Nkambule BB. (2019). Obesity-induced inflammation and insulin resistance: A mini-review on T-cells. *Metabolism Open*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.metop.2019.100015>
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. (2010). GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, 142: 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>
- O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, 16: 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
- Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N, Crowe SM. (2015). Glucose Metabolism Regulates T Cell Activation, Differentiation, and Functions. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00001>
- Pecht T, Gutman-Tirosh A, Bashan N, Rudich A. (2014). Peripheral blood leucocyte subclasses as potential biomarkers of adipose tissue inflammation and obesity subphenotypes in humans. *Obesity Reviews*, 15: 322–337. <https://doi.org/10.1111/obr.12133>
- Purdy JC, Shatzel JJ. (2021). The hematologic consequences of obesity. *European Journal of Haematology*, 106: 306–319. <https://doi.org/10.1111/ejh.13560>
- Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. (2015). Diet impact on Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics. *Frontiers in Physiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00109>
- Ramírez-Silva I, Villalpando S, Moreno-Saracho JE, Bernal-Medina D. (2011). Fatty acids intake in the Mexican population. Results of the National Nutrition Survey 2006. *Nutrition and Metabolism*, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-33>

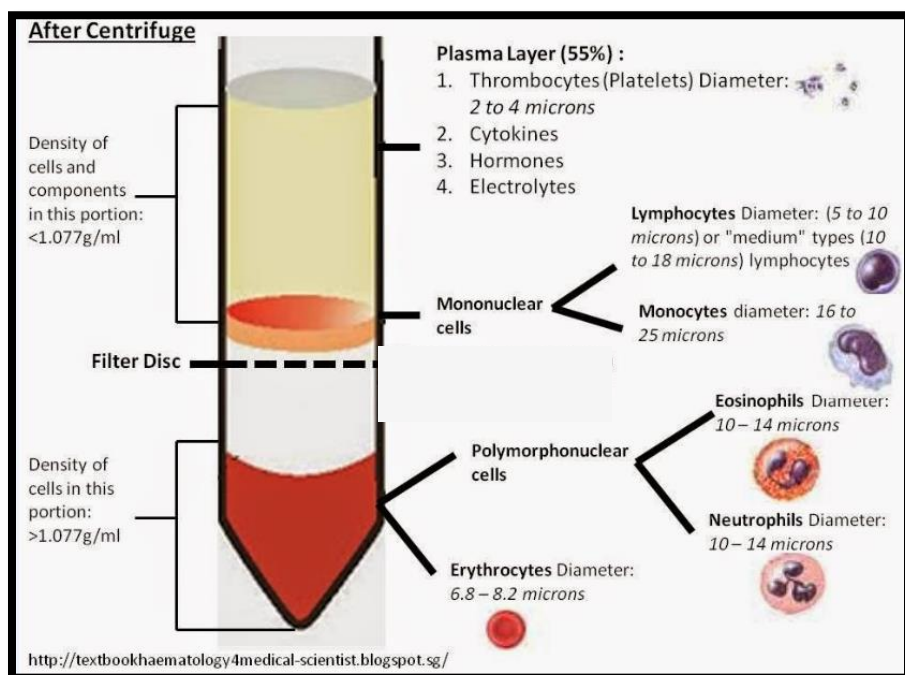
- Rangel-Huerta OD, Gil A. (2018). Omega 3 fatty acids in cardiovascular disease risk factors: An updated systematic review of randomised clinical trials. *Clinical Nutrition*, 37: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.05.015>
- Ridker PM, Rifai N, MacFadyen J, Glynn RJ, Jiao L, Steg G, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Tardif JC, Ballantyne CM, Mason RP, Bhatt DL. (2022). Effects of Randomized Treatment With Icosapent Ethyl and a Mineral Oil Comparator on Interleukin-1 β , Interleukin-6, C-Reactive Protein, Oxidized Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Homocysteine, Lipoprotein(a), and Lipoprotein-Associated Phospholipase A2: A REDUCE-IT Biomarker Substudy. *Circulation*, 146: 372–379. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.059410>
- Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 1. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Saini RK, Keum YS. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, 203: 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>
- Schebb NH, Kühn H, Kahnt AS, Rund KM, O'Donnell VB, Flamand N, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Weylandt KH, Rohwer N, Murphy RC, Geisslinger G, FitzGerald GA, Hanson J, Dahlgren C, Alnouri MW, Offermanns S, Steinhilber D. (2022). Formation, Signaling and Occurrence of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators—What is the Evidence so far? *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.838782>
- Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. (2012). Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>
- Schweitzer GR, Rios I, Gonçalves V, Magalhães KG, Pizato N. (2021). Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake on the eicosanoid profile in individuals with obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Journal of Nutritional Science*, 10. <https://doi.org/10.1017/jns.2021.46>
- Sekikawa A, Steingrimsdottir L, Ueshima H, Shin C, David Curb J, Evans RW, Hauksdottir AM, Kadota A, Choo J, Masaki K, Thorsson B, Launer LJ, Garcia ME, Maegawa H, Willcox BJ, Eiriksdottir G, Fujiyoshi A, Miura K, Harris TB, Gudnason V. (2012). Serum levels of marine-derived n-3 fatty acids in Icelanders, Japanese, Koreans, and Americans-A descriptive epidemiologic study. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 87: 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.04.010>
- Sender R, Milo R. (2021). The distribution of cellular turnover in the human body. *Nature Medicine*, 27: 45–48. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01182-9>
- Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. (2007) *High-Density Lipoprotein as a Therapeutic Target A Systematic Review*. JAMA, 298. <http://jama.jamanetwork.com/>
- Sinha S, Haque M, Lugova H, Kumar S. (2023). The Effect of Omega-3 Fatty Acids on Insulin Resistance. *Life*, 13. <https://doi.org/10.3390/life13061322>
- Skulas-Ray AC, Wilson P, Harris WS, Brinton EA, Kris-Etherton PM, Richter CK, Jacobson TA, Engler MB, Miller M, Robinson JG, Blum CB, Rodriguez-Leyva D, de Ferranti SD, Welty FK. (2019). Omega-3 Fatty Acids for the Management of Hypertriglyceridemia: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, 140. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000709>
- Stark KD, Van Elswyk ME, Higgins MR, Weatherford CA, Salem N. (2016). Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. In *Progress in Lipid Research*, 63: 132–152. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.001>

- Tang Q, Li X, Song P, Xu L. (2015). Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 9: 380–385. <https://doi.org/10.5582/ddt.2015.01207>
- Travers RL, Motta AC, Betts JA, Bouloumié A, Thompson D. (2015). The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans. *International Journal of Obesity*, 39: 762–769. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.195>
- Van Der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, Kiewiet RM, Van Aken MO, Van Huisstede A, Van Dongen J, Van Der Lelij AJ, Staal F, Van Hagen PM. (2012). Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4 + T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes*, 61: 401–408. <https://doi.org/10.2337/db11-1065>
- Wagner NM, Brandhorst G, Czepluch F, Lankeit M, Eberle C, Herzberg S, Faustin V, Riggert J, Oellerich M, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer, K. (2013). Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity*, 21: 461–468. <https://doi.org/10.1002/oby.20087>
- Weylandt KH, Karber M, Xiao Y, Zhang IW, Pevny S, Blüthner E, von Schacky C, Rothe M, Schunck WH, Pape UF. (2023). Impact of intravenous fish oil on omega-3 fatty acids and their derived lipid metabolites in patients with parenteral nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 47: 287–300. <https://doi.org/10.1002/jpen.2448>
- WHO. (2018). WHO_Europe_Nutrition - Body mass index - BMI. In *World Health Organization*.
- Wiebe N, Muntner P, Tonelli M. (2022). Associations of body mass index, fasting insulin, and inflammation with mortality: a prospective cohort study. *International Journal of Obesity*, 46. <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01211-2>
- Yang-Yi F, Fuentes NR, Hou TH, Barhoumi R, Deutz N, Engelen M, McMurray D, Chapkin S. (2018). Remodelling of primary human CD4+ T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. *British Journal of Nutrition*, 119: 163–175. <https://doi.org/doi:10.1017/S0007114517003385>.
- Yee LD, Lester JL, Cole RM, Richardson JR, Hsu JC, Li Y, Lehman A, Belury MA, Clinton SK. (2010). ω -3 fatty acid supplements in women at high risk of breast cancer have dose-dependent effects on breast adipose tissue fatty acid composition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91: 1185–1194. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.29036>
- Yin M, O'Neill LA. (2021). The role of the electron transport chain in immunity. *The FASEB Journal*, 35. <https://doi.org/10.1096/fj.202101161R>
- Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM. (2011). Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity*, 19: 743–748. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.123>
- Zhang Y, Jiang L, Hu W, Zheng Q, Xiang W. (2011). Mitochondrial dysfunction during in vitro hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60: 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.07.026>

ANEXO 1

Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por gradiente de densidad

1. Diluir 12ml de sangre (obtenida con tubos Vacutainer K2 EDTA® de 6ml) con 12ml de PBS o solución salina y se homogenizan en un tubo estéril de 50ml (Falcon).
2. En otro tubo plástico estéril de 50ml (Falcon) se colocan 12 ml de Lymphoprep (densidad 1.077 g/ml) humedeciendo las paredes del tubo. La sangre diluida con solución salina se coloca lentamente sobre las paredes de otro tubo estéril para no romper el gradiente.
3. La sangre estratificada sobre el Lymphoprep se centrifuga a 800xg por 20 minutos a 4°C.
4. Se obtiene el anillo de PBMC (Figura 1) y se coloca en un tubo estéril de 15ml; posteriormente se agregan 10ml de PBS o solución salina.
5. Centrifuga a 800 xg por 10 minutos, se decanta la muestra y se resuspende en 1 a 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640, en solución salina.



ANEXO 2

Tinción de células para fenotipificación de linfocitos T CD4+ y monocitos

1. Se coloca 10^6 células mononucleares de sangre periférica en tubos para citómetro (BD Falcon 5ml Polystyrene round – bottom tube de 12x75mm style 352054) (se coloca 10^6 células por tubo para cada subpoblación a estudiar).
2. Se utilizan fluorocromos acoplados a un anticuerpo.

Linfocitos Th1	Linfocitos Th2	Linfocitos Th17	Linfocitos Treg
2ul de CD4- FITC	2ul de CD4- FITC	2ul de CD4- FITC	2ul de CD4- FITC
4ul de CD11c – PerCyP	4ul de CD11c – PerCyP	4ul de CD11c – PerCyP	4ul de CD11c – PerCyP
4ul de CD25 – APC	4ul de CD25 – APC	4ul de CD161 - APC	4ul de CD25 – APC
5ul de *INFg - PE	5ul de * IL-4 - PE	5ul de * IL-17 PE	5ul de * FOXP3 - PE
Marca BD Biosciences, San Jose, CA; TONBO * Tinción intracelular.			

3. Las células mononucleares de sangre periférica se incuban con los fluorocromos descritos en el punto 2, excepto los intracelulares (marcados con *) por 20 min a temperatura ambiente protegiéndolos de la luz.
4. Se agrega 1 ml de solución salina y se agita en vortex.

5. Las muestras se centrifugan a 1600 rpm durante 12 min.
6. Se descarta el sobrenadante.
7. Se agregan 200 μ L de solución para permeabilizar y se fijan las células (Cytotfix/CytopermTM 554722, BD Biosciences) a cada tubo. Se dejan incubar en hielo por 90 min en agitación orbital protegiéndolas de la luz.
8. Se agrega 1 mL de solución de Perm Wash 1X (BD Perm/Wash TM Buffer 554723) y se centrifugan a 1600 rpm durante 12 min. El sobrenadante se descarta.
9. La tinción intracelular se lleva a cabo con la incubación de la muestra con los anticuerpos acoplados a fluorocromos descritos en el punto 2 y marcados con *, mediante la incubación por 30 min en hielo y agitación orbital, protegidos de la luz.
10. Repetir el paso número 8.
11. Se re-suspenden las muestras en 300 μ L de paraformaldehído al 1%.
12. Finalmente, un total de 500,000–1,000,000 de eventos se adquieren de cada muestra en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizan con el programa FlowJo 10.0 Software (Tree Star, Inc.).

Como control de isotipo se emplea una mezcla de anticuerpos monoclonales de tipo IgG_{1,k}-FITC/IgG₁-PE/CD45-PeCy5 (BD TritestTM, BD Biosciences).

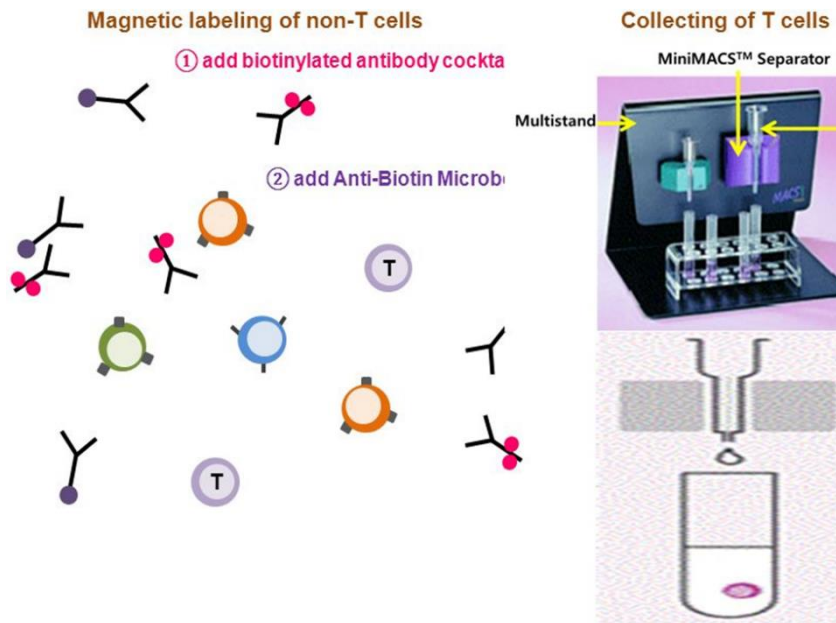
Como control se utilizan células mononucleares de sangre periférica sin teñir para medir la autofluorescencia de las células.

ANEXO 3

Separación de las células T reguladoras con perlas magnéticas (CD4+CD25+ Regulatory T cell isolation kit human, MACS Miltenyi Biotec, No. Cat. 130-091-301)

1. Determinar el número de células mononucleares obtenidas.
2. Centrifugar la suspensión celular a 300xg por 10 minutos y se aspira el sobrenadante.
3. Resuspender las células en 90 µl de Buffer IMag 1X por cada 10⁷ CMSP.
 - a. Buffer IMag (BD No. Catálogo: 552362): solución de buffer acuoso que contiene albúmina de suero bovino y ≤0.09% azida de sodio, EDTA en buffer salino de fosfato (PBS) (BD IMag™ Buffer 10X)
4. Se adicionan 10 µl del coctel de anticuerpos (Coctel de anticuerpos biotinilados CD4+ T cells) para un total de 10⁷ células.
 - a. El Coctel de anticuerpos biotinilados CD4+ T cells: Contiene anticuerpos biotinilados contra CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ, CD235a (glicoforina a)
5. Se agita la muestra con vórtex y protegiéndola de la luz se coloca en hielo por 10 min en agitación orbital.
6. Se agregan 20ul de anticuerpos Anti-biotina y posteriormente se colocan las muestras en hielo por 15 minutos en agitación orbital protegiéndolas de la luz.
7. Se lleva a cabo la separación utilizando una columna LS para un máximo de 10⁸ células (No. Cat. 130-042-401) la cual debe haberse resguardado a 4°C al menos 1 hora antes de la separación. Se hidrata la columna con 1ml de Buffer y se filtra la suspensión celular utilizando una malla de naylon (Cell Strainer 100um Nylon 229485) para evitar aglomeraciones de células. Posteriormente se agrega 1 ml más de Buffer IMag 1X. Las células que pasen por la columna unida al magneto son las células separadas por selección negativa; para recuperar las células separadas por selección positiva se remueve la columna del magneto y utilizando otro tubo se recolectan las células que se quedaron adheridas al mismo, adicionando 3 ml de amortiguador Buffer IMag 1X y empleando el émbolo de la columna para liberar las células de la misma.
8. Se obtienen los linfocitos T CD4+ por selección negativa, los cuales se centrifugan a 300 xg por 10 minutos. Las demás células mononucleares separadas por selección positiva se colocan en un tubo de plástico estéril de 15ml y se lavan con 10ml de PBS o solución salina centrifugando a 300 xg por 10 min.

9. Por cada 10^7 células T CD4⁺ se colocan 10 μ l de Anti-CD25; posteriormente se colocan las muestras en hielo por 20 minutos en agitación orbital protegiéndolas de la luz.
10. Se realiza una segunda separación por columnas, tal cual se indica en el paso número 7.
11. Las células obtenidas por selección positiva corresponden a las células T reguladoras, las cuales se centrifugan con 10ml de PBS o solución salina a 300 \times g por 10 minutos.



ANEXO 4

Ensayo de Supresión de la proliferación celular mediado por células T reguladoras

- 1.- Obtener de 25 a 30ml de sangre
- 2.- Separar células mononucleares de sangre periférica
- 3.- Una vez que se realiza la separación de células T reguladoras y T respondedoras (Linfocitos T CD4+) por perlas magnéticas (técnica previamente descrita)
- 4.- Contar las células T reguladoras y T efectores
- 5.- Los linfocitos T efectores se tiñen con CFSE:
 - a) Preparar la solución 5 μ M de CFSE (1ul de CFSE y 999 μ l de solución salina) calentar en baño a 37°C.
 - b) Separar en un tubo Falcon de 15ml, 5 x10⁶ células T respondedoras y centrifugar (5 min a 1200 rpm). Retirar el sobrenadante
 - c) Agregar la solución de CFSE 5 μ M
 - d) Incubar 15 min a 37°C con movimiento orbital 100rpm protegido de la luz con aluminio.
 - e) Agregar de 3 a 5 veces el volumen inicial (5ml) de Medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de piruvato 100 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico y antimetabólico
 - f) Centrifugar 5 min a 1200 rpm
 - g) Resuspender en 3 – 5ml de Medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de piruvato 100 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico y antimetabólico
 - h) Incubar por 20 min a 37°C con movimiento orbital 100rpm protegido de la luz con aluminio
 - i) Centrifugar 5 min a 1200 rpm
 - j) Resuspender en RPMI sin suplementar o con solución salina a 37°C
 - k) Llevar a una densidad celular de 1000 células por μ l.

6.- Preparar los medios de cultivo

	50 ml	5ml
Piruvato (100 mM) (1%)	500 µl	50 µl
Suero Fetal bovino (10%)	5 ml	500 µl
Antibiótico y antimicótico (50 U/ml penicilina, 50µg/ml de estreptomicina) (1%)	500 µl	50 µl
Aminoácidos no esenciales (1%)	500 µl	50 µl
Medio RPMI 1640 previamente suplementado con 0.58g de glutamina	43.5 ml	4.4 ml

7.- Montar el ensayo en la placa. Se colocan distintas proporciones de células respondedoras: células T reguladoras en placa de 96 pozos con fondo en U (NEST 0330A).

	Proporción Respondedoras: Reguladoras					
	Sin teñir	Sin estímulo	1:0	2:1	1:1	Treg
Células Respondedoras	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (50 µl)	
Células T Reguladoras	0	0	0	25,000 células (25 µl)	50,000 células (50 µl)	50,000 células (100 µl)
Perlas con Anti-CD3, Anti-CD28	0	0	2 µl + 8 µl de medio	2 µl + 8 µl de medio	2 µl + 8 µl de medio	
Medio de cultivo	150 µl	150 µl	140 µl	115 µl	90 µl	150 µl
Volumen final	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
<p>*Las células sin teñir no deberán estar marcadas con CFSE. *Lo anterior se hace por duplicado. Se utiliza el kit de activación de células T humanas (MACS Miltenyi Biotec, 130-091-441).</p>						

Para la tinción con CFSE se utiliza el reactivo CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen C34554) (Se prepara con 500 µl de perlas + 100 µl de Anti-CD28 + 100 µl de Anti-CD3, que se incuban por 1hr girando a 4°C)

1. Las células se incuban por 4 días a 37°C con 5% de CO₂. Posterior al tiempo de incubación se recuperan y se centrifugan con solución salina a 1600 rpm por 5 minutos para retirar el medio.
2. Marcar los tubos de citometría y de ser el caso almacenar con 50 µl + 50 µl de solución salina con paraformaldehído al 1%.
3. Llevar las muestras al citómetro.
4. Los datos de proliferación se obtienen utilizando el citómetro ACCURI C6 (BD). Los datos se analizan en el programa FlowJo 10.0.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Pablo Pelegrin,
Biomedical Research Institute of Murcia (IMIB),
Spain

REVIEWED BY
Karsten H. Weylandt,
Brandenburg Medical School Theodor Fontane,
Germany
Ling Zhao,
The University of Tennessee,
Knoxville, United States

*CORRESPONDENCE
F. Enrique Gómez
✉ francisco.gomez@incmmsz.mx

RECEIVED 02 February 2023
ACCEPTED 18 April 2023
PUBLISHED 05 May 2023

CITATION
Borja-Magno A, Guevara-Cruz M,
Flores-López A, Carrillo-Domínguez S,
Granados J, Arias C, Perry M, Sears B,
Bourges H and Gómez FE (2023) Differential
effects of high dose omega-3 fatty acids on
metabolism and inflammation in patients with
obesity: eicosapentaenoic and
docosahexaenoic acid supplementation.
Front. Nutr. 10:1156995.
doi: 10.3389/fnut.2023.1156995

COPYRIGHT
© 2023 Borja-Magno, Guevara-Cruz, Flores-
López, Carrillo-Domínguez, Granados, Arias,
Perry, Sears, Bourges and Gómez. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Differential effects of high dose omega-3 fatty acids on metabolism and inflammation in patients with obesity: eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation

Angélica Borja-Magno¹, Martha Guevara-Cruz¹,
Adriana Flores-López², Silvia Carrillo-Domínguez³,
Julio Granados⁴, Clorinda Arias⁵, Mary Perry⁶, Barry Sears⁶,
Hector Bourges⁷ and F. Enrique Gómez^{1*}

¹Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ²Servicio de Nutriología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ³Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ⁴Departamento de Trasplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ⁵Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁶Inflammation Research Foundation, Peabody, MA, United States, ⁷Dirección de Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Background: Obesity is complicated by low-grade chronic inflammation characterised by increases in inflammatory proteins and cells in peripheral blood. It has been known that omega-3 fatty acids (FA) like eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) could modulate the inflammatory process and improve metabolic markers.

Objective: This study aimed to determine the effect of high-dose omega-3 FA on metabolic and inflammatory markers among patients with obesity and healthy volunteers.

Methods: This prospective study included 12 women with obesity (body mass index [BMI] ≥ 35.0 kg/m²) and 12 healthy women (BMI < 24.0 kg/m²) who were supplemented with a dose of 4.8g/day (3.2g EPA plus 1.6g DHA) for 3 months followed by no treatment for 1 month. Plasma metabolic and inflammatory markers and levels of mRNA transcripts of CD4⁺ T lymphocyte subsets were determined monthly.

Results: None of the participants exhibited changes in weight or body composition after study completion. EPA and DHA supplementation improved metabolic [insulin, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR), triglyceride [TG]/high-density lipoprotein [HDL] ratio, TG, and arachidonic acid [AA]/EPA ratio] and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Moreover, the levels of mRNA transcripts of T CD4⁺ lymphocyte subsets (TBX21, IFNG, GATA-3, interleukin [IL]-4, FOXP3, IL-10, IL-6, and TNF- α), were down-regulated during the intervention phase. After 1 month without supplementation, only insulin,

HOMA-IR and the mRNA transcripts remained low, whereas all other markers returned to their levels before supplementation.

Conclusion: Supplementation with high-dose omega-3 FAs could modulate metabolism and inflammation in patients with obesity without weight loss or changes in body composition. However, these modulatory effects were ephemeral and with clear differential effects: short-duration on metabolism and long-lasting on inflammation.

KEYWORDS

obesity, inflammation, metabolism, omega-3 fatty acids, eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), nutrition

Introduction

Obesity has been described to be associated with a chronic state of low-grade inflammation characterised by high levels of inflammatory proteins like leptin, interleukin (IL)-6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) among others (1). In addition, mild increases have been reported in total white blood cells (leukocytosis) mostly of the T cell lineage, partially due to the T CD4+ helper (Th) lymphocyte subsets. These cells are important regulators of the inflammatory process: Th2 and regulatory T cells (Treg) have anti-inflammatory activities, whereas the Th1 and Th17 cells have pro-inflammatory function (2, 3). Altogether, these inflammatory proteins and cells play an important role in the development of insulin resistance, diabetes mellitus and metabolic syndromes (4).

Nutrients including omega-3 fatty acids (FAs) such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids have shown anti-inflammatory effects (5, 6). Evidence-based findings have shown that omega-3 FAs could attenuate CD4+ T lymphocyte activation (7) and migration to adipose tissue (8). *In vitro* studies showed that T cells treated with EPA and DHA manifested lower cytokine synthesis and reduced Th1 differentiation (9). However, the effects of omega-3 FA supplementations on inflammatory markers remain controversial. The anti-inflammatory effect has been shown in human plasma levels of TNF- α , IL-6, and C-reactive protein (CRP) (5, 10). However, other reports showed no anti-inflammatory effects (11) or reduction in cardiovascular events (12). To date, studies on the effects of EPA and DHA *in vivo* on CD4+ T cell subsets in patients with obesity are scarce (8, 9).

Therefore, we evaluated the effects of supplementation with high-dose omega-3 FA, EPA plus DHA, for 3 months and 1 month without supplementation on metabolic and inflammatory markers in patients with obesity and healthy volunteers.

Participants and methods

We evaluated 24 Mexican women between 25 and 45 years of age: 12 women with a body mass index [BMI] ≥ 35.0 (obesity) and 12 healthy volunteers with BMI < 24.0 (control). The exclusion criteria were presence of diabetes mellitus, hypertension, liver or kidney diseases, or pregnancy or receiving any medication or dietary supplements. This study was approved by the Ethics Committee of the INCMNSZ and all participants signed an

informed consent. This study is registered at Clinical trials with the ID NCT05219890.

Study design

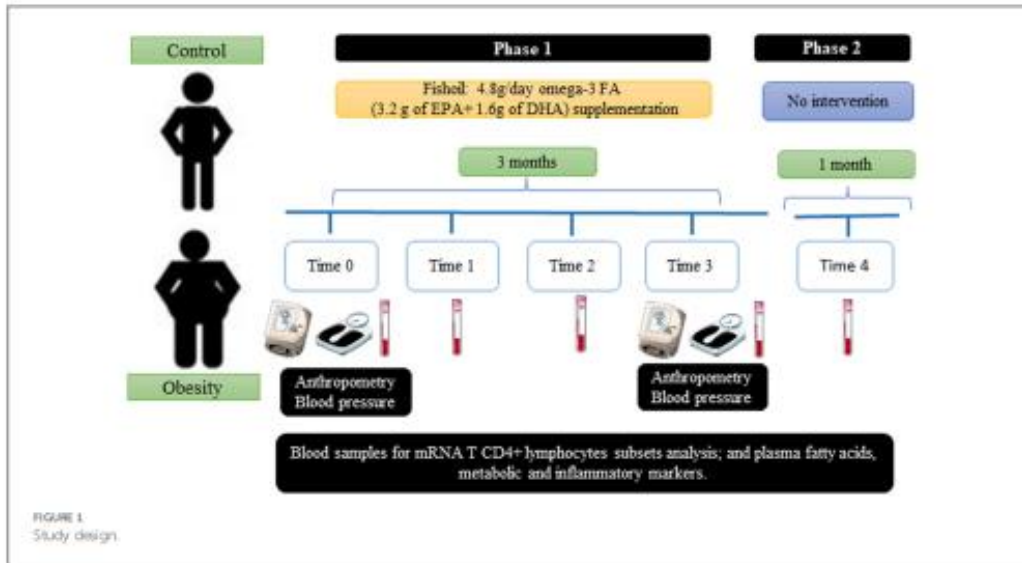
This was a prospective, experimental, open-label (non-blinded), and comparative study to evaluate the effects of omega-3 FAs (EPA and DHA) supplementation on metabolic and inflammatory markers. The study comprised two phases: the first phase consisted of a 3 month supplementation with fish oil (times 0, 1, 2, and 3) and the second one included one month without supplementation (time 4) (Figure 1). At times 0 and 3, blood pressure and anthropometric measurements were registered. None of the participants were asked to change their diet or daily physical activity (increase or decrease). Furthermore, none of the participants received nutritional advice of any type.

Fish oil supplement

Omega-3 FA supplementation was performed using fish oil capsules provided by the Inflammation Research Foundation (Peabody, MA, United States). Each 1 gram capsule contained 0.6 g of omega-3 FA (0.4 g of EPA and 0.2 g of DHA). Therefore, to provide 4.8 g of omega-3 FA, each participant received 8 capsules per day, distributed as follows: 2 capsules at breakfast, 4 capsules supplemented with the main meal, and 2 capsules at dinner. This dose selection was based on previous research revealing increases in plasma concentration of EPA and DHA at maximum level, similar to doses up to 7 g/day (13).

Each participant received 2 bottles (120 capsules per bottle, a total of 240 capsules enough to cover the dosage for 1 month) of fish oil supplement at the time of recruitment (time 0). After 1 month (time 1), 2 new bottles of supplement were provided for the following month (time 2). This was repeated for the last month (time 3). To determine the duration of the lasting effects of the fish oil, we included a 1 month period without supplementation (time 4).

Compliance was determined by requesting all participants to bring the bottles of supplement at the end each month, with the remaining capsules (if any). The study staff always kept in touch with the participants by phone messages for monitoring tolerance to the supplement.



Anthropometry, body composition, and blood pressure

Height and weight were used to calculate BMI using the formula [weight (kg)/height (m)²] (14). Body composition was determined by electric bioimpedance using a Full Body Composition X-Contact 356 Analyzer (Jawon Medical, Seoul, South Korea), to quantify the fat and fat-free (lean) masses, which was performed at times 0 and 3.

Plasma metabolic and inflammatory markers

Peripheral blood samples were collected in the morning after 10 h of fasting, in vacutainer tubes with EDTA-K₂ anticoagulant. Total leukocytes were counted using Neubauer chambers. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured by a standard method. Blood plasma obtained after centrifugation of a small sample was stored at -80°C until assayed.

Plasma glucose, total cholesterol, high density cholesterol (HDL-C), low density cholesterol (LDL-C), and triglycerides (TG) levels were quantified using a Cobas c111 analyzer (Roche, Indianapolis, IN, United States). The TG/HDL-C ratio (reference value <3.0) was calculated (15). Insulin levels were determined using an ELISA kit (ALPCO, Salem, NH, United States). The HOMA-IR index (reference value < 2.5) was used as an indicator of insulin resistance (16).

Plasma fatty acids were extracted with chloroform/methanol and derivatised to their methyl esters (FAME) with methanol in boron trichloride. The FAMES were quantified with a Varian 3400 gas chromatograph using tridecanoic acid (13:0) as internal standard (17).

The following proteins were quantified by multiplexed immunoassay using the MAGPIX luminometer (Luminex, Austin,

Texas, United States): leptin (L; reference value ≤ 15.7 ng/mL) (18) TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 and transforming grow factor-beta (TGF-β). Total adiponectin (A) was quantified using an ELISA kit (ALPCO, Salem, NH, United States) and the A/L ratio calculated (reference value > 1.0) (19). Plasma resolvin E1 (RvE1) was quantified using a competitive ELISA kit (MyBiosource, San Diego, CA, United States).

mRNA expression in the CD4⁺ T lymphocyte subsets (Th1, Th2, and Treg cells)

The level of transcription of genes expressed in T lymphocyte subsets (Th1, Th2, and Treg) was determined by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). First, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Lymphoprep™ density gradient centrifugation (Stemcell technologies, Vancouver, Canada). Total RNA was extracted from the PBMC (without further separation of monocytes or T cell subsets) with the TRIZOL reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, United States) and isopropanol precipitation (20). RNA integrity was determined in 1% agarose gel recipe by electrophoresis. Additionally, RNA concentration was measured by ultraviolet absorbance spectrophotometry at 260 nm. Complementary DNA (cDNA) was synthesised from 1 μg of total RNA with Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, United States), oligo-dT₁₈ primer (Invitrogen, Groningen, Holland), RNase inhibitor (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom), a mixture of dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, California, United States), 5X RT-buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), and nuclease-free water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) (20, 21). The relative expression of the mRNA was determined by RT-PCR in 2 μL of cDNA with 10 μL of 2X SYBR green Master mix (Roche

Diagnostics, Lewis, United Kingdom) and 2 μ L of the forward and reverse mixture of primers at 10 mM final concentration in a RotorGene Q thermocycler (QIAGEN, Germany). The level of transcription of IL-6, TNF- α was measured. In addition, the level of transcription of the following genes of the CD4⁺ T lymphocyte subsets was determined: T-box transcription factor 21 (TBX21) and IFNG in Th1 cells, GATA3 and IL-4 in Th2 cells, and forkhead box P3 (FOXP3) and IL-10 in Treg cells. Furthermore, 18S-ribosomal rRNA was used as the housekeeping gene (23) (Supplementary Table S1). The level of transcription of the mRNAs was determined with the $\Delta\Delta C_t$ method (23).

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The difference between groups at time 0 were analyzed using Student's *t*-test for independent groups. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for the analysis of gene expression pattern over time. Analysis of plasma metabolic and inflammatory markers was performed by two-way ANOVA for repeated measures to compare the effect of omega-3 FA supplementation between the groups and time. The Bonferroni post-hoc test was used to identify significant differences between times. Data was analyzed using Statistical Package for Social Science, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, United States) and GraphPad Prism 8. Statistical significance was set to $p < 0.05$.

Results

Population study

A flowchart is shown in Figure 2. All anthropometric measurements, except for height, were significantly higher ($p < 0.001$) in the group with obesity: weight, BMI, fat mass, and lean body mass. Regarding metabolic markers, the group with obesity showed significantly elevated blood pressure (BP; systolic ($p < 0.001$) and diastolic ($p < 0.02$)); higher glucose ($p < 0.02$), insulin ($p < 0.001$), HOMA-IR ($p < 0.001$), TG ($p < 0.001$), and TG/HDL-C ratio ($p < 0.02$); and lower levels of HDL-C ($p < 0.02$) (Table 1) compared with the control. Regarding inflammatory markers, the group with obesity had significantly higher total leukocytes ($p < 0.005$), ESR ($p < 0.001$), and leptin ($p < 0.01$) and lower total adiponectin and A/L ratio ($p < 0.05$) (Table 1) compared with the healthy participants. The following metabolic and inflammatory markers were different between the groups, without reaching statistical significance: LDL-C, IL-6, IL-8, and IL-10 were higher, whereas TGF- β was lower (Table 1). Total cholesterol and TNF- α were identical between both groups at baseline.

The AA/EPA ratio in the control and obesity groups was 11.1 and 13.6, respectively (Figure 3). In addition, omega-6/omega-3 ratio in the control and obesity groups was 12.4 and 10.3 (Supplementary Table S3), respectively, which indicated low consumption of omega-3 FA.

Plasma RvE1, a specialised pro-resolving mediator derived from EPA, was undetectable in the control group (the assay sensitivity was

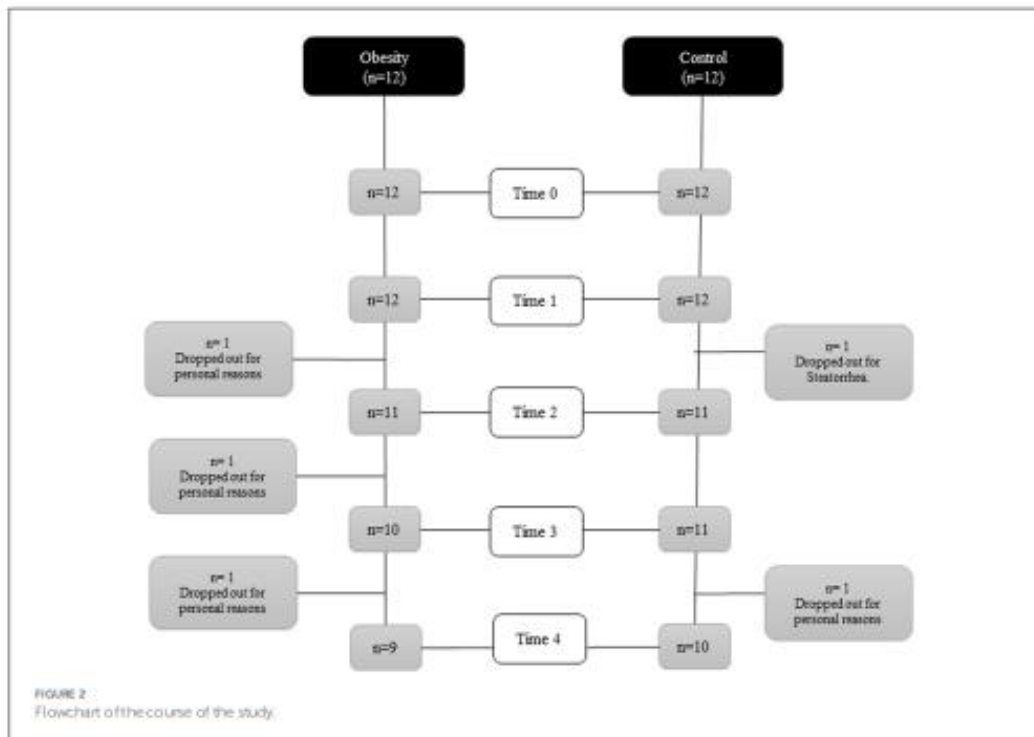


TABLE 1 Anthropometric, metabolic and inflammatory characteristics of the participants at the beginning of the study (Time 0).

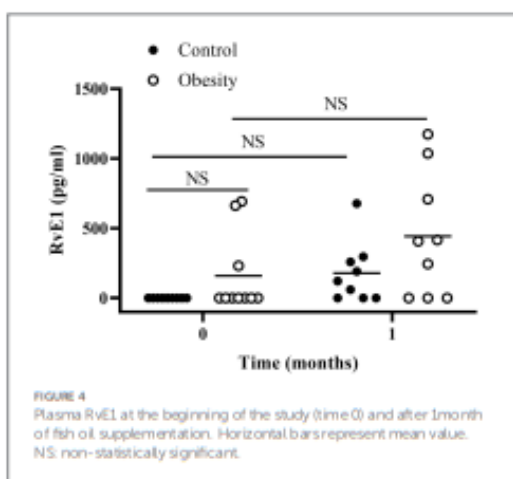
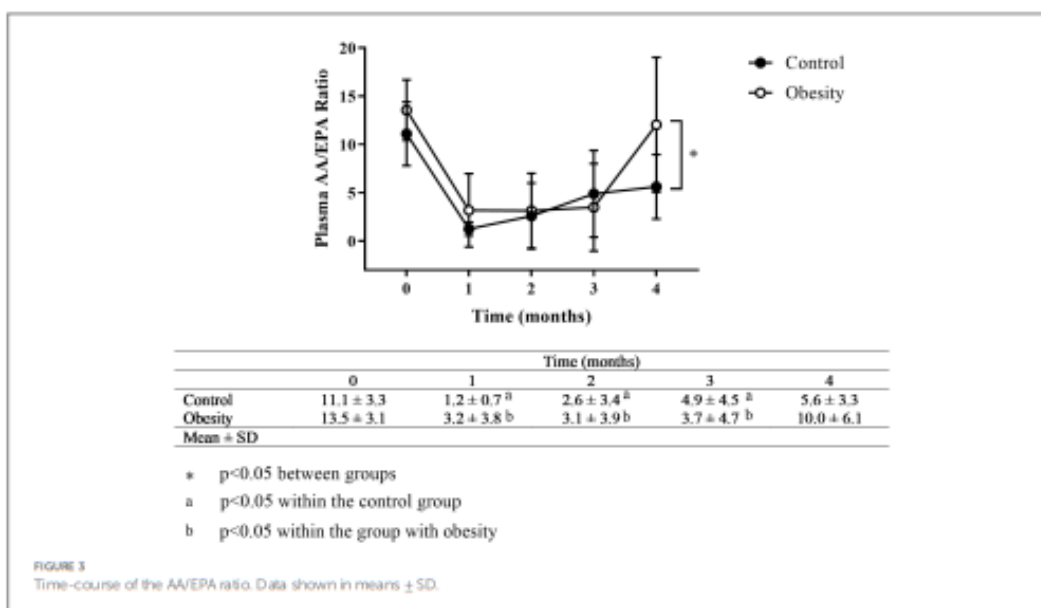
	Control (n=12)	Obesity (n=12)	p value
Anthropometry and body composition			
Age (years) mean \pm SD	31.7 \pm 6.7	38.1 \pm 6.0	<0.05
Median	29.5	39	
Range	24–43	27–45	
Height (m) mean \pm SD	1.62 \pm 0.05	1.60 \pm 0.08	0.18
Median	1.63	1.56	
Range	1.55–1.70	1.51–1.75	
Weight (kg) mean \pm SD	56.3 \pm 9.0	102.1 \pm 15.4	<0.001
Median	55.7	103.3	
Range	49.1–63.6	82.7–131.0	
BMI (kg/m ²) mean \pm SD	21.7 \pm 2.2	39.8 \pm 5.5	<0.001
Median	21.4	36.7	
Range	17.8–23.9	35.0–52.7	
Fit mass (kg) mean \pm SD	15.0 \pm 3.9	42.7 \pm 7.8	<0.001
Median	15.1	39.6	
Range	8.3–20.8	34.5–60.4	
Fit mass (%) mean \pm SD	25.5 \pm 5.1	41.9 \pm 3.6	<0.001
Median	24.3	42.6	
Range	15.0–34.9	36.5–47.6	
Lean body mass (kg) mean \pm SD	41.8 \pm 3.6	59.3 \pm 9.8	<0.001
Median	41.4	57.9	
Range	37.5–49	46.8–76.6	
Lean body mass (%) mean \pm SD	74.4 \pm 5.3	58.1 \pm 3.6	<0.001
Median	76.2	57.1	
Range	65.1–85.0	52.4–63.5	
Metabolic markers¹			
Systolic BP (mm Hg) mean \pm SD	106 \pm 8	123 \pm 8	<0.001
Median	107	126	
Range	95–125	109–136	
Diastolic BP (mm Hg) mean \pm SD	67 \pm 6	78 \pm 9	<0.02
Median	65	79	
Range	58–82	63–92	
Glucose (mg/dL) mean \pm SD	82.4 \pm 7.5	93.3 \pm 11.8	<0.02
Median	81.7	89.5	
Range	73.1–99.2	80.8–112.6	
Insulin (mU/L) mean \pm SD	3.2 \pm 1.1	13.0 \pm 8.8	<0.001
Median	3.6	10.7	
Range	1.7–4.6	4.5–28.7	
HOMA-1R mean \pm SD	0.7 \pm 0.2	3.2 \pm 2.3	<0.001
Median	0.7	3.7	
Range	0.3–1.0	0.9–8.0	
Total cholesterol (mg/dL) mean \pm SD	164.0 \pm 31.1	167.0 \pm 39.1	0.88
Median	167	159	
Range	120.1–215.0	114.2–236.6	

(Continued)

TABLE 1 (Continued)

	Control (n=12)	Obesity (n=12)	p value
LDL-C (mg/dL) mean ± SD	85.9 ± 31.4	108.9 ± 34.4	0.19
Median	81.5	112.7	
Range	32.0–137.8	60.6–157.3	
HDL-C (mg/dL) mean ± SD	42.2 ± 8.9	33.0 ± 9.9	0.02
Median	41.9	30.8	
Range	28.1–57.9	18.7–52.2	
Triglycerides (mg/dL) mean ± SD	89.4 ± 37.8	191.0 ± 102.1	<0.001
Median	77.1	159.8	
Range	38.1–130.0	79.2–454.1	
TG/HDL-C ratio mean ± SD	2.2 ± 1.1	6.7 ± 5.9	0.02
Median	1.96	5.5	
Range	0.8–4.6	2.5–24.3	
Inflammatory markers¹			
Leukocytes (x10 ⁹ /mm ³) mean ± SD	5.7 ± 0.87	8.1 ± 1.9	<0.005
Median	5.4	8.6	
Range	4.4–7.2	4.5–10.1	
ESR (mm/h) mean ± SD	6 ± 4	18 ± 12	<0.001
Median	5	19	
Range	2–15	3–37	
IL-6 (pg/ml) mean ± SD	0.9 ± 0.9	2.2 ± 3.6	0.63
Median	0.93	0.9	
Range	0.01–1.7	0.1–12.3	
IL-8 (pg/ml) mean ± SD	0.9 ± 0.6	2.7 ± 3.0	0.71
Median	0.64	1.1	
Range	0.64–2.90	0.4–9.8	
TNF-α (pg/ml) mean ± SD	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.9	0.75
Median	1.7	1.9	
Range	0.6–2.6	0.7–3.6	
IL-10 (pg/mL) mean ± SD	2.9 ± 4.8	4.0 ± 5.5	0.66
Median	1.2	1.6	
Range	0.06–13.8	0.3–17.5	
TGF-β (ng/mL) mean ± SD	5.2 ± 4.5	4.0 ± 4.2	0.63
Median	3.4	2.5	
Range	1.8–17.2	0.8–15.3	
Leptin (ng/mL) mean ± SD	9.6 ± 7.0	35.5 ± 25.4	0.01
Median	8.3	23.3	
Range	1.0–26.9	8.2–77.7	
Adiponectin (μg/mL) mean ± SD	7.5 ± 2.5	4.5 ± 1.7	0.05
Median	7.3	4.1	
Range	4.7–11.0	2.2–7.3	
A/L ratio mean ± SD	1.6 ± 2.1	0.3 ± 0.3	0.05
Median	0.8	0.2	
Range	0.3–7.4	0.1–0.8	

¹Reference values: systolic BP < 120 mm Hg, diastolic BP < 80 mm Hg, glucose < 100 mg/dL, total cholesterol < 200 mg/dL, HDL-C > 40 mg/dL, LDL-C < 100 mg/dL, TG < 150 mg/dL, TG/HDL ratio < 3.0 (14), HOMA-IR < 2.5 (15), insulin < 25 mU/L. Reference values: leukocytes < 10.0 × 10⁹/mm³, ESR < 20 mm/h, leptin < 15.7 ng/mL (17) A/L ratio > 1.0 (18). Mean ± SD Student's *t*-test for independent groups. Statistical significance: *p* < 0.05. BP, blood pressure; TG/HDL-C ratio, triglycerides to high density lipoprotein cholesterol ratio; ESR, erythrocyte sedimentation rate; A/L ratio, adiponectin to leptin ratio.



1 pg/mL). However, it was detected only in three patients in the group with obesity (average of 159 pg/mL) at baseline (Figure 4).

Effect of omega-3 FA supplementation on metabolic and inflammatory markers

Regardless of their nutritional status, none of the participants exhibited changes in body weight or body composition after the 3 months of supplementation (Supplementary Table S2).

Therefore, the effects of fish oil supplementation, reported here, were only due to the effect of omega-3 FA. For clarity, the main effects

of omega-3 FA supplementation on metabolic and inflammatory markers are described in each group.

Control group

At the beginning of the study all metabolic and inflammatory markers were within normal and healthy values (Table 1). Omega-3 FA supplementation resulted in changes in some of the markers as early as 1 month of supplementation, and always towards a better health status. Of note, the metabolism of glucose and lipids improved as fasting insulin and HOMA-IR significantly decreased, whereas total cholesterol and TG decreased, and HDL-C increased without statistical significance (Table 2). Similarly, TNF- α decreased with supplementation. However IL-6 and leptin non-significantly decreased (Table 2). Markers of wellness including AA/EPA (Figure 3) and omega-6/omega-3 ratios (Supplementary Table S3) improved during the intervention. Other markers of wellness such as A/L and TG/HDL-C (Table 2) decreased without statistical significance. Moreover, plasma RvE1, which was undetectable at time 0, non-significantly increased to an average of 179 pg/mL after supplementation (median: 122 pg/mL) (Figure 4).

Group with obesity

After one month of supplementation, insulin ($p < 0.01$), HOMA-IR ($p < 0.01$), and TNF- α ($p < 0.01$), were significantly decreased, and remained low within the duration of the study, except for TNF- α which returned to its initial value at time 3 (Table 2). On the other hand, there were non-significant reductions in TG, leptin, or IL-6 levels, with non-significant increases in IL-10 and TGF- β . None of the following markers changed during supplementation: systolic and diastolic BP, glucose, cholesterol, HDL-C, LDL-C, total leukocytes, ESR, and IL-8 (Table 2). Markers of wellness such as AA/EPA (Figure 3) and omega-6/

TABLE 2 Time-course effect of omega-3 fatty acid supplementation (EPA and DHA) on metabolic and inflammatory markers.

		Time 0	Time 1	Time 2	Time 3	Time 4	p value ¹	p value ²	p value ³
Metabolic markers									
Glucose (mg/dL)	Control	82.4 ± 7.5	82.0 ± 8.0	74.4 ± 13.7	83.3 ± 7.8	82.5 ± 8.1	0.33	0.08	0.02
	Obesity	93.3 ± 11.8	88.9 ± 10.8	92.4 ± 7.7	91.9 ± 8.7	86.2 ± 8.0			
Insulin (mU/L)	Control	3.2 ± 1.1	1.7 ± 1.1	2.4 ± 1.3	2.2 ± 2.1	2.5 ± 1.5	0.01	0.001	0.07
	Obesity	13.0 ± 8.8	6.9 ± 3.4*	7.1 ± 3.9*	8.4 ± 4.5	7.4 ± 2.8*			
HOMA-1R	Control	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.01	0.001	0.01
	Obesity	3.2 ± 2.3	1.5 ± 0.9*	1.5 ± 1.0*	1.8 ± 1.1	1.5 ± 0.7*			
Total cholesterol (mg/dL)	Control	164.0 ± 31.1	150.3 ± 30.3	137.3 ± 32.1	152.4 ± 25.5	148.2 ± 31.4	0.11	0.26	0.56
	Obesity	167.0 ± 39.1	165.7 ± 28.3	160.9 ± 33.0	166.9 ± 31.2	173.9 ± 46.7			
LDL-C (mg/dL)	Control	85.9 ± 31.4	94.1 ± 35.8	82.2 ± 29.8	88.0 ± 33.9	95.2 ± 37.9	0.24	0.11	0.62
	Obesity	108.9 ± 34.4	115.7 ± 27.8	112.6 ± 31.8	117.9 ± 32.3	112.3 ± 40.9			
HDL-C (mg/dL)	Control	42.2 ± 8.9	30.5 ± 12.7	49.8 ± 18.1	37.2 ± 19.8	47.9 ± 13.2	0.08	0.01	0.17
	Obesity	33.0 ± 9.9	36.8 ± 9.1	33.9 ± 10.3	36.6 ± 14.0	36.4 ± 12.3			
Triglycerides (mg/dL)	Control	89.4 ± 37.8	74.4 ± 29.1	78.2 ± 46.2	83.2 ± 45.1	86.5 ± 42.9	0.24	0.01	0.09
	Obesity	191.0 ± 102.1	148.4 ± 58.7	149.2 ± 76.6	146.1 ± 60.4	208.2 ± 125.1			
TG/HDL-C ratio	Control	2.2 ± 1.1	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.9	1.7 ± 1.1	2.0 ± 1.2	0.37	0.001	0.20
	Obesity	6.7 ± 5.9	4.3 ± 2.1	4.7 ± 3.6	4.7 ± 3.3	6.6 ± 5.8			
Inflammatory markers									
Leukocytes (x10 ⁹ /mm ³)	Control	5.7 ± 0.8	5.7 ± 1.4	6.3 ± 1.9	5.8 ± 1.7	5.3 ± 1.3	0.84	0.001	0.97
	Obesity	8.1 ± 1.9	8.1 ± 1.5	8.1 ± 1.7	7.9 ± 1.8	7.5 ± 1.4			
ESR (mm/h)	Control	6 ± 4	9 ± 7	6 ± 4	9 ± 9	10 ± 6	0.45	0.001	0.93
	Obesity	16 ± 12	17 ± 11	17 ± 11	19 ± 14	22 ± 13			
IL-6 (pg/mL)	Control	0.9 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.3	1.0 ± 1.1	0.47	0.07	0.72
	Obesity	2.2 ± 3.6	1.0 ± 1.3	1.5 ± 2.1	1.6 ± 2.9	1.9 ± 1.9			
IL-8 (pg/mL)	Control	0.9 ± 0.6	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.4	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.6	0.38	0.01	0.27
	Obesity	2.7 ± 3.0	2.4 ± 1.9	2.4 ± 2.7	3.8 ± 2.7	2.6 ± 1.3			
TNF-α (pg/mL)	Control	1.7 ± 0.5	0.8 ± 0.6*	0.9 ± 0.6*	1.0 ± 0.4*	1.8 ± 0.9	0.01	0.24	0.32
	Obesity	1.9 ± 0.9	1.1 ± 0.5*	1.3 ± 0.7*	1.7 ± 1.0	1.8 ± 0.8			
IL-10 (pg/mL)	Control	2.9 ± 4.8	2.1 ± 1.8	2.7 ± 2.4	3.1 ± 3.2	2.7 ± 2.9	0.90	0.25	0.45
	Obesity	4.0 ± 5.5	9.0 ± 14.8	5.2 ± 8.0	7.4 ± 10.6	9.4 ± 14.7			
TGF-β (ng/mL)	Control	5.2 ± 4.5	4.2 ± 2.8	5.6 ± 6.4	5.6 ± 5.0	4.2 ± 3.6	0.06	0.43	0.99
	Obesity	4.0 ± 4.2	5.0 ± 2.5	6.6 ± 4.5	7.4 ± 8.8	2.7 ± 2.4			
Leptin (ng/mL)	Control	9.6 ± 7.0	4.1 ± 3.5	5.8 ± 5.1	5.7 ± 6.2	5.8 ± 4.8	0.53	0.03	0.02
	Obesity	35.5 ± 25.4	19.2 ± 5.3	19.9 ± 9.5	25.2 ± 16.1	20.7 ± 20.0			
Adiponectin (μg/mL)	Control	7.5 ± 2.5	8.5 ± 2.2	7.2 ± 2.4	8.5 ± 3.1	—	0.07	0.057	0.08
	Obesity	4.5 ± 1.7	4.7 ± 2.6	4.2 ± 1.9	4.6 ± 2.6	—			
A/L ratio	Control	1.6 ± 2.1	3.9 ± 3.9	6.6 ± 13.7	3.3 ± 2.8	—	0.62	0.002	0.49
	Obesity	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	—			

Mean ± SD. Two-way ANOVA. ¹ Time factor (comparisons within groups vs. time 0). ² Group factor (comparisons between groups obesity vs control). ³ Interaction (effect of group and time on the metabolic or inflammatory marker). * Statistical significance p < 0.05. — not determined. TG/HDL-C ratio, triglycerides to high density lipoprotein cholesterol ratio; ESR, erythrocyte sedimentation rate; A/L, adiponectin to leptin ratio.

omega-3 ratios (Supplementary Table S3) decreased. However, the TG/HDL-C ratio decreased without statistical significance during the supplementation period, without change in the A/L ratio (Table 2) with supplementation. No changes were observed in RvE1 levels after supplementation, from 159 pg/mL at time 0 to 443 pg/mL (Figure 4).

Effect of omega-3 FA supplementation on mRNA of CD4+ T lymphocyte subsets (Th1, Th2, and Treg cells)

We analyzed IL-6 and TNF-α as markers for overall inflammation and, in each of the T CD4+ lymphocyte subsets, one "master"

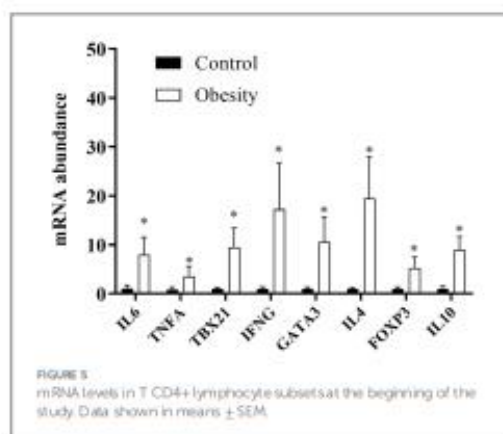


FIGURE 5
mRNA levels in T CD4+ lymphocyte subsets at the beginning of the study. Data shown in means \pm SEM.

transcription factor and one signature cytokine: TBX21 and IFNG in Th1; GATA3 and IL-4 in Th2; and FOXP3, and IL-10 in Treg cells. At time 0, the level of transcription (mRNA) of all genes analyzed were higher in the group with obesity compared with the control group, ranging between 3.5-times of TNF- α and 18.7-times of IL-4 (Figure 5). Importantly, the mRNA levels of all these genes did not change in the control group during or after supplementation (data not shown). Therefore, for comparison purposes, the level of transcription of each gene was normalized against time 0 in the control group. In the group with obesity, the mRNA levels of all genes studied decreased to levels comparable to the healthy group after the first month of supplementation and remained low within the entire duration of the study, even 30 days after cessation (Figure 6).

Discussion

In this study we assessed the effect of high-dose omega-3 FA, supplementation, 4.8g/day (3.2 g of EPA plus 1.6 g of DHA), for 3 months in the form of fish oil capsules, on metabolic and inflammatory markers in Mexican patients with obesity and healthy volunteers. The main results are summarized in Figure 7.

This study has several strengths. First, all participants were carefully selected, particularly the patients with obesity. Therefore the results reported here pertain to patients without chronic diseases associated with obesity. Second, the inclusion of clinically healthy volunteers (control group) instead of a placebo group was a point of strength, because they were reference to contrast the differences in metabolic and inflammatory markers against the group with obesity: extreme phenotypes (healthy versus obese). Lastly, we included a 1 month period without treatment to determine the long-term effect of supplementation on the metabolic and inflammatory markers in both groups.

The fish oil supplement used as source of EPA and DHA, provided extra 72kcal per day (8grams, 1 gram/capsule), it was well accepted with a high compliance (over 92 percent). As previously stated, regardless of their nutritional status, none of the participants presented with changes in body weight or composition (fat mass and lean mass) during the duration of the study (Supplementary Table S2).

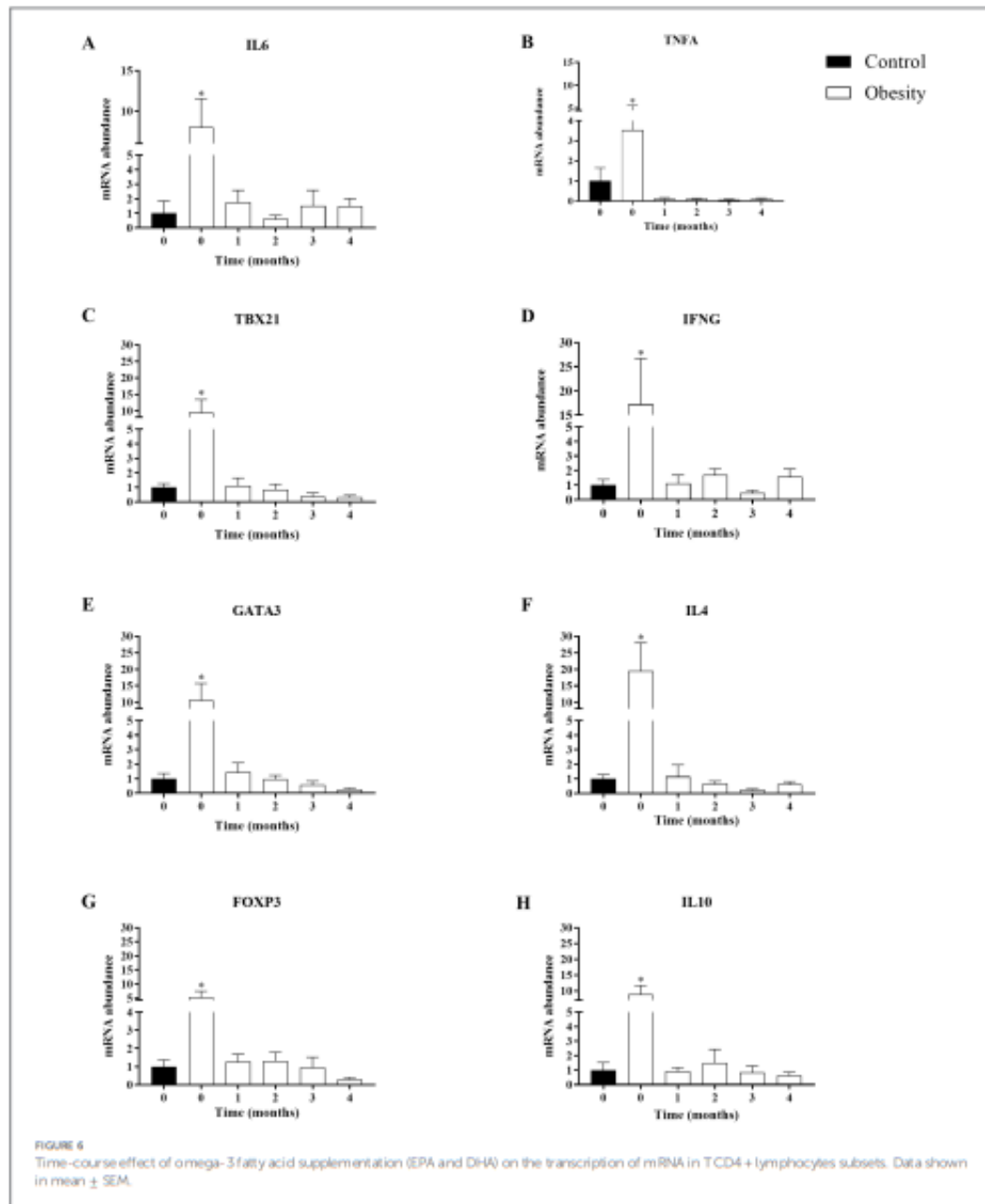
Of note, there were differences between the group with obesity and control group at baseline. The group with obesity showed higher values of metabolic and inflammatory markers. However most of these values were within normal range or slightly higher, except for TG, HDL-C, HOMA-IR, leptin, and A/L ratio which were not within the normal range. However, it is important to mention that these values did not indicate presence of type 2 diabetes mellitus, hypertension, or other diseases.

In Mexico, the total daily intake of omega-3 FA has been estimated to be 0.3 grams per day in adults (24), which is very low compared with the suggested 2.0grams per day of EPA plus DHA set by the Food and Agriculture Organization for adults worldwide (25). It has been shown that plasma levels of EPA and DHA reflected a short-term and dose-dependent intake (13), whereas erythrocytes fatty acids composition indicated chronic consumption. However, erythrocytes might be better indicators for longer periods of supplementation (longer than 3 months due to their turnover period). In this study, we evaluated plasma concentration of fatty acids to determine acute changes (26).

The low intake of omega-3 FA by the Mexican population, regardless of their nutritional or inflammatory status, was confirmed by a high omega-3/omega-6 ratio with values of 12.4 and 10.3 and AA/EPA ratio with values of 11.1 and 13.6 in the control and obesity groups, respectively, at time 0 (Supplementary Table S3 and Figure 5). To our best knowledge, this is the first time that the AA/EPA ratio in plasma to be reported in a Mexican cohort. The AA/EPA values reported in this study (above 10), are similar to those reported in United States, Canada, Greece, Italy, Spain, and the Netherlands regarding individuals who consumed "westernised diets." These diets might activate the immune system, because they are high in energy-dense nutrients and refined sugars, red meat, high-fat dairy products, together with low amounts of vegetables, fruits, whole grains, fish, or nuts (27). In other regions of the world where the consumption of fish and fish products is high, the AA/EPA ratio is low (below 5), like Canadian Imuits, US-Alaskans, Japan, Papua-New Guinea, Korea, Russia, Iceland, and Norway, just to mention a few (28).

In our study, the AA/EPA ratio was reduced in both groups after the first month of supplementation to values of 1.2 and 3.2 in the control and obesity groups, respectively (Figure 3) and remained low for the duration of the treatment. A previous study has shown that the reduction in AA/EPA ratio was dose-dependent (13). After supplementation cessation (time 4), the AA/EPA ratio in the group with obesity returned to its initial value, whereas in the control group remained low, without significant difference from its starting value. Although the omega-6/omega-3 decreased to levels lower than 4 during the supplementation period, which is the recommended value, it returned to basal levels at time 4 (29).

In this study, we observed that, in the control group, no RvE1 was detectable in plasma. In contrast, the group with obesity included three participants with detectable levels at time 0. In addition, after one-month supplementation, the RvE1 levels non-significantly increased in both groups. Importantly, our data of RvE1 need to be taken with caution due to the quantification method used in this study, which might not be a reliable method for quantifying this pro-resolving mediator. The required sensitivity and selectivity for these types of mediators apparently could only be achieved using chromatography coupled with mass spectrometry (30, 31).

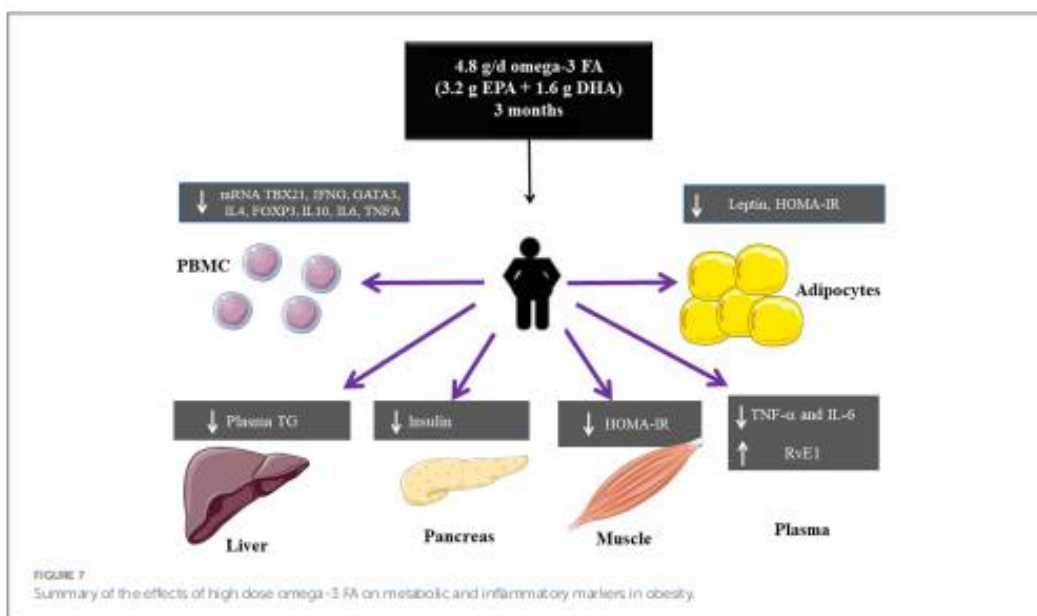


Effect of the omega-3 FA supplementation on the metabolism of glucose and lipids

Regardless of the nutritional status, a dose of 4.8g/d of EPA plus DHA in the form of fish oil supplement revealed beneficial effects on the metabolism of glucose in all participants. These effects pertain

only to insulin, due to a reduction in its concentration (fasting levels) and resistance (lower HOMA-IR values), but not in serum glucose.

The clinical impact of these effects was more significant in the group of patients with obesity. Because, despite their glucose levels were higher (but still within the normal range) and did not change with supplementation, the fasting levels of insulin and the HOMA-IR values



indicated reductions in insulin resistance and, more importantly HOMA-IR reached values below the cut-off point of 2.5 (16). Moreover, both insulin and HOMA-IR decreased in the entire duration of the study and remained low even 1 month after supplementation cessation. Despite promising, these results warrant further studies, for instance oral-glucose tolerance test to determine the glycemic and insulinemic responses or hyperinsulinemic-euglycemic clamp, the "gold standard" to assess insulin action. Only these tests would provide unequivocal data on the real effect of omega-3 FA supplementation on glucose metabolism in patients with obesity.

Our results also showed improvements in some parameters of lipid metabolism: LDL-C did not change with supplementation, whereas HDL-C and TG did. Although differences in the levels HDL-C and TG did not reach statistical significance, there was a tendency of an increase in HDL-C concentration in both groups. This increase might have clinical relevance, because even a small increase of 1 mg/dL in HDL-C has been found to be associated with a 6 percent decrease in cardiovascular risk (32).

Reduction in serum and liver TG is the best-known action of EPA and DHA, by a mechanism still not completely explained (33, 34). In our study, we also observed that the supplement of fish oil caused a (not significantly) reduction in serum TG in both groups during supplementation, which returned to its initial levels after cessation. This is particularly relevant in the group with obesity, since TG levels decreased from an average of 191 mg/dL to 148 mg/dL, which was within the normal range and associated with reduced cardiovascular events. The TG/HDL-C has been used as a predictable marker for insulin resistance and has been associated with higher risk of cardiovascular diseases (35). In the study, we observed a very high TG/HDL-C ratio in the group with obesity, which non-statistically decreased during the intervention phase and returned to its initial value after cessation.

Effect of the omega-3 FA supplementation on the inflammatory status

Omega-3 FA supplementation decreased TNF- α levels in both groups, other inflammatory markers improved after supplementation without statistical difference (IL-6, IL-10, and TGF- β). However, leukocytes, ESR, IL-8, adiponectin (total and its isoforms), and A/L ratio remained unaltered.

TNF- α is an inflammatory protein synthesised by immune and adipose cells and promotes insulin resistance by alterations in the insulin receptor signaling pathway (36). In addition, TNF- α induces inflammation via the NF- κ B pathway producing an increase in several cytokines including IL-6 and others. IL-6 is produced by many cell types (monocytes, fibroblasts, endothelial) and together with TNF- α acts on different tissues causing inflammation.

In the present study, omega-3 FA supplementation decreased plasma levels of TNF- α in both groups (Table 2) and mRNA of TNF- α and IL-6 (Figure 6) in PBMC. These effects could be explained by the interactions of omega-3 FA with the surface receptor FFAR4 (GPR120) (37), or their interactions with PPAR γ , which result in NF- κ B signaling inhibition (37, 38).

Of note, although plasma TNF- α was identical in both groups at baseline (Table 1) as previously described (39), there was no insulin resistance in the control group. In a previous study, mice models with TNF- α genetic deletion did not show improvement in insulin resistance (40). Therefore, we suggest that, besides TNF- α , there should be other factors in the group with obesity involved in insulin resistance, like high levels of leptin, along with low levels of adiponectin and IL-10, which may interfere with inflammation control and insulin sensitivity. The significant reduction in plasma TNF- α in both groups, was not paralleled with its mRNA transcript at time 4, the latter remained downregulated even 1 month after

cessation. A previous study including healthy volunteers reported that consumption of 18 grams of fish oil (4.6 g of EPA plus DHA) reduced the synthesis *in vivo* of TNF- α and IL-1 β in PBMC even 10 weeks after cessation (41). This result is similar to our findings regarding mRNA transcripts in PBMC and may be partially explained by the incorporation of EPA and DHA into cell membranes (42) and to the longer turnover of lymphoid cells (43). The return of plasma TNF- α to its initial levels after supplementation cessation could also be the result of its production by other cells.

One of the most common features of inflammation is leukocytosis (2). We also observed mild leukocytosis in the group with obesity which was still within the normal range. This increase in leukocytes could be partly due to increases in CD4⁺ T lymphocytes, including Treg cells that we (44) and others (45) have previously reported. The higher transcription of mRNA FOXP3 and IL-10 (Treg markers), accompanied by a high transcription of TBX21 and IFNG (Th1 markers), GATA3 and IL-4 (Th2 markers) (Figure 5) indicated the inflammatory status in the group with obesity and an altered Treg function. However, Treg functionality has not been assessed in individuals with obesity. Of note, our results in PBMC are similar to those reported in subcutaneous (46, 47) and visceral (47) adipose tissue in patients with obesity. These findings also revealed that PBMC could be used as a biomarker of adipose tissue inflammation (48).

The fish oil supplement did not lead to changes in total leukocytes. However, it had profound effects on mRNA transcript levels of CD4⁺ T lymphocyte subsets, TBX21 and IFNG in Th1 cells, GATA3 and IL-4 in Th2 cells and FOXP3, and IL-10 in Treg cells. This downregulation was observed during the entire supplementation phase and remained even 1 month after cessation (Figure 6). These results indicated that a high dose of omega-3 FA may could modulate T CD4⁺ lymphocyte subsets activation, differentiation, and proliferation (7, 9, 49).

On the other hand, increments in the levels of IL-10 and TGF- β , cytokines synthesized by Treg and monocytes M2 might be a part of the modulatory and anti-inflammatory effect of omega-3 FA.

Controversial effects have been reported after omega-3 FA supplementation. This might be explained by the heterogeneity in the methodology used in different studies including supplementation dose, study group, and time of supplementation (6, 11). Most of the studies of omega-3 FA supplementation, which showed anti-inflammatory effects, used doses over 3 g/d (6). In our study, an anti-inflammatory effect of high-dose omega-3 FA was observed. However, a high-dose of EPA (4 g/d) in individuals above 45 years of age with hypercholesterolemia has shown no important effects on inflammatory markers (11). In our study we found an anti-inflammatory effect using a high-dose omega-3 FA (4.8 g/d). However, the population in this present study included women between 18–45 years of age, with obesity and without other chronic diseases.

One of the limitations of this study was the sample size. However the statistical power of the sample was 82%. Although the lack of a placebo group is another limitation, each participant was evaluated versus a control. Therefore, whether the results of this study can be applied to other groups remains unexplored. Another limitation of the study was the lack of biopsies to analyze CD4⁺ T cells in adipose tissue.

Improvements in inflammation and insulin resistance by a high-dose omega-3 FA *in vivo* in the participants with obesity,

observed in this study, could be clinically important because overall mortality is more related to inflammation and hyperinsulinemia rather than to obesity (50). Therefore, omega-3 FA supplementation should be an adjuvant therapy in inflammatory conditions like obesity.

Conclusion

Supplementation with a high dose of omega-3 FA could modulate metabolic alterations and inflammation in patients with obesity. There were differential effects of the omega-3 FA supplementation between inflammatory and metabolic markers. The beneficial effects were ephemeral regarding most metabolic markers. In contrast, most changes in inflammatory markers remained reduced after cessation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary files, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved. This study was approved by the Ethics Committee of the INCMNSZ. This study is registered at Clinical trials with the ID NCT05219890. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

AB-M participated in the recruitment, follow-up of the participants during treatment, evaluated mRNA expression of interest genes, inflammatory markers, and wrote the manuscript. MG-C and A-F-L quantified metabolic markers. SC-D quantified fatty acids in plasma. JG, CA, and HB participated in the design of the study. MP was the Inflammation Research Foundation contact and provided the EPA and DHA supplement. BS was the Inflammation Research Foundation contact and provided the EPA and DHA supplements and participated in the design of the study. FEG conceived the study, participated in its design and coordination, obtained funds, and wrote and reviewed the final version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was partially funded by CONACYT (grant CF-191983 to FEG). Angelica Borja-Magno is a doctoral student in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACYT fellowship 607487.

Acknowledgments

The authors thank Marina Núñez-Durán, and Rosa M. Castillo-Domínguez, for their help.

Conflict of interest

MP and BS are employees of Zone Labs, Inc., a medical food company that produces omega-3 fatty acid products.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Elhala MS, Fatimah I, Khama' H, Rahmat A, Abed Y. Obesity & inflammation: the linking mechanism & the complications. *Arch Med Sci*. (2017) 11:3851–63. doi: 10.5114/aoms.2016.58928
2. Ptaszyk JC, Szatol J. The hematologic consequences of obesity. *Eur J Haematol*. (2021) 106:306–19. doi: 10.1111/ejh.13560
3. Nyumbaya TM, Dhadia PV, Mataru V, Nkambule BB. Obesity-induced inflammation and insulin resistance: a mini-review on T-cells. *Metabol Open*. (2019) 3:100015. doi: 10.1016/j.metop.2019.100015
4. Ahmed R, Sultan R. Genetic MW adipose tissue and insulin resistance in obese. *BioMedicine and Pharmacotherapy*. (2021) 137: 137:11315. doi: 10.1016/j.biopha.2021.11315
5. Kavyani Z, Mousadeh V, Jishi S, Hossein Faghfouri A, Dofghon P, Sarmadi B. Efficacy of the omega-3 fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: An umbrella meta-analysis. *International Immunopharmacology*. (2022) 111:109104. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109104
6. Rangel-Jalisco OD, Gil A. Omega-3 fatty acids in cardiovascular disease risk factors: an updated systematic review of randomised clinical trials. *Glyc Natr*. (2018) 37:72–7. doi: 10.1016/j.glyna.2017.05.015
7. Fan Y-Y, Fuentes NR, Hsu TY, Rola Barozoni XCL, Deutz NER, Engelen MPKJ, et al. Remodelling of primary human CD4+ T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. *Br J Nutr*. (2018) 119:63–75. doi: 10.1017/S0007114517003385
8. Cacchi D, Carrasco-Muñoz D, Certo M, Niven J, Smith J, Nicolussi A, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids impinge on CD4+ T cell motility and adipose tissue distribution via direct and lipid mediator-dependent effects. *Gastrovasc Res*. (2020) 116:1006–20. doi: 10.1093/gvr/cvz018
9. Lee J, Choi YK, Kim M, Park JM, Kang M, Oh L, et al. Common and differential effects of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on helper T-cell responses and associated pathways. *BMB Rep*. (2021) 54:78–83. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.5.267
10. Li K, Huang T, Zheng J, Wu K, Li D. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : a meta-analysis. *BMC Res*. (2014) 9:e88103. doi: 10.1371/journal.pone.0088103
11. Ridker PM, Rifkin N, MacFadyen J, Glynn RJ, Jao L, Steg PG, et al. Effects of randomized treatment with icosapent ethyl and a mineral oil comparator on interleukin-1 β , interleukin-6, C-reactive protein, oxidized low-density lipoprotein cholesterol, homocysteine, lipoprotein(a), and lipoprotein-associated phospholipase A2: a REDUCE-IT biomarker substudy. *Circulation*. (2022) 146:372–9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.099410
12. Atang T, Halsey J, Kromhout D, Genstein HC, Marchioli R, Tavazzi L, et al. Associations of Omega-3 fatty acid supplement use with cardiovascular disease risks. *JAMA Geriatr*. (2018) 3:225–34. doi: 10.1001/jamageriatrics.2017.5205
13. Yee LD, Lester JL, Cole RM, Richardson JR, Hou JC, Li Y, et al. n-3 fatty acid supplements in women at high risk of breast cancer have dose-dependent effects on breast adipose tissue fatty acid composition. *Am J Clin Nutr*. (2010) 91:1185–94. doi: 10.3945/ajcn.2009.29036
14. Lyons IK, Robinson D, Rudek R. "Nutrition in weight management," in *Krause and Mahler's Food & the Nutrition Care Process*. 10th edition, eds. R. Janice and K. Morrow (St. Louis, Missouri, USA: Elsevier), (2018) 413–440.
15. Borjao G. TG/HDL-C ratio as cardio-metabolic biomarker even in Normal weight women. *Acta Endocrinologica*. (2018) 14:261–7. doi: 10.4183/act.2018.261
16. Tang Q, Li X, Song P, Xu L. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening developments in research and prospects for the future. *Drug Discov Ther*. (2015) 9:300–5. doi: 10.5582/ddt.2015.01207

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2023.1156995/full#supplementary-material>

17. Ren J, Mozurkewich EL, Sen A, Valentin AM, Ferrari TG, Morse AN, et al. Total serum fatty acid analysis by GC-MS: Assay validation and serum sample stability. *Curr Pharm Anal*. (2013) 9:331–9. doi: 10.2174/1573412911310004002
18. Gijón-Corral T, Gradini A, Gualter-Castellón P, Aguilar MT, Rodríguez-Antalejo J, Banegas JR. Leptin reference values and cutoffs for identifying cardiometabolic abnormalities in the Spanish population. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. (2015) 68:672–9. doi: 10.1016/j.rec.2014.08.015
19. Frühlbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Ramírez R, Becerra S, Salvador J, et al. Adiponectin-leptin ratio is a functional biomarker of adipose tissue inflammation. *Neurosci*. (2019) 11:454. doi: 10.3390/nu11020454
20. Rio DC, Ares M, Hanson GJ, Nilzen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Gold Spring Harb Protoc*. (2010) 2010:5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439
21. Haddad F, Baldwin KM. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods Mol Biol*. (2010) 630:261. doi: 10.1007/978-1-60761-629-0_17
22. Bai A, Fuschberg G, Hammanström S, Hammanström ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*. (2004) 59:566–73. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01440.x
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. (2001) 25:402–4. doi: 10.1006/meth.2001.1262
24. Ramírez-Silva I, Villalpando S, Moreno-Sánchez JE, Bernal-Molina D. Fatty acids intake in the Mexican population. *Res Nutr Mex*. (2006) *Nutr Metab (Lond) [Internet]*. (2011);8(1):133. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC301173/>
25. Burlingame R, Nishida C, Uney R, Weisell R. Fats and fatty acids in human nutrition: introduction. *Ann Nutr Metab*. (2009) 55:5–7. doi: 10.1159/00028993
26. Hu XF, Sandhu SK, Harris WS, Chan HM. Conversion ratios of n-3 fatty acids between plasma and erythrocytes: a systematic review and meta-regression. *Br J Nutr*. (2017) 117:1162–73. doi: 10.1017/S0007114517001010
27. Christ A, Lusterbach M, Lutz E. Western diet and the immune system: An inflammatory connection. *Immunity*. (2019) 51:794–811.
28. Steuk KD, van Elwyk ME, Higgins MR, Weatherford CA, Salem N. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research*. (2016) 63:132–52.
29. Saini RK, Keum YS. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: dietary sources, metabolism, and significance—a review. *Life Sci*. (2018) 203:255–67. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049
30. Scheeb NH, Kühn H, Kahnt AS, Rand KM, O'Donnell VB, Flammend N, et al. Formation, signaling and occurrence of specialized pro-resolving lipid mediators—what is the evidence so far? *Front Immunol*. (2022) 2:13.
31. Weylandt KH, Kaber M, Xiao Y, Zhang JW, Perry S, Blüthner E, et al. Impact of intravenous fish oil on omega-3 fatty acids and their deriv of lipid metabolites in patients with parenteral nutrition. *J Parenter Enter Nutr*. (2023) 47:287–301. doi: 10.1002/jpen.2448
32. Singh IM, Shikhebor MH, Ansel BJ. High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review [Internet]. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/>
33. Bornfeldt KE. Triglyceride lowering by omega-3 fatty acids: a mechanism mediated by N-acyltaurines. *J Clin Invest*. (2021) 131:e147538. doi: 10.1172/JCI147538
34. Liu QK. Triglyceride-lowering and anti-inflammatory mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids for atherosclerotic cardiovascular risk reduction. *J Clin Lipidol*. (2021) 15:556–68.

35. Azarpourhoob MR, Najafi F, Darbandi M, Kiarasi S, Odayemi T, Spence JD. Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio: a clue to metabolic syndrome, insulin resistance, and severe atherosclerosis. *Lipids*. (2021) 56:405–12. doi: 10.1002/lipd.12302
36. Mohallem R, Aryal UK. Regulation of TNF α mediated insulin resistance elucidated by quantitative proteomics. *Sci Rep*. (2020) 10:20878. doi: 10.1038/s41598-020-77914-1
37. Oh DY, Talukdar S, Bae EL, Inamura T, Morimoto H, Fan W, et al. GPR120 is an Omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cells*. (2010) 1:42:687–98. doi: 10.1016/j.cel.2010.07.041
38. Chandra M, Miriyah S, Banachannan M. PPAR γ and its role in cardiovascular diseases. *PPAR Res*. (2017) 2017:1–10. doi: 10.1155/2017/6404638
39. Kuo SM, Halpern MM. Lack of association between body mass index and plasma adiponectin levels in healthy adults. *Int J Obes*. (2011) 35:1487–94. doi: 10.1038/ijo.2011.20
40. Aladami AK, Unger CA, Emis SL, Altomare D, Ji H, Hege MC, et al. Macrophage tumor necrosis factor- α deletion does not protect against obesity-associated metabolic dysfunction. *FASEB J*. (2021) 35:e21665. doi: 10.1096/fj.202101543RR
41. Endres S, Gharbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JWM, et al. The effect of dietary supplementation with ω -3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*. (1989) 320:265–71. doi: 10.1056/NEJM19890202300501
42. Mason RP, Libby P, Bhatt DL. Emerging mechanisms of cardiovascular protection for the Omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Lippincott Williams and Wilkins*. (2020) 40:1135–47. doi: 10.1161/ATVRAHA.119.313286
43. Sender R, Milo R. The distribution of cellular turnover in the human body. *Nat Med*. (2021) 27:45–8. doi: 10.1038/s41591-020-01182-9
44. Günter F, Futzanowa-Carballo J, Lima G, Llorente L, Nunez M, Sosa-Alvarado C, et al. Peripheral blood T cell populations are altered in morbidly obese patients. *Ann Nutr Metab Ann Nutr Metab*. (2011) 1:197–7.
45. van der Weerd K, Dek WA, Schrijver R, Schwitzer DH, Langrak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4 $^{+}$ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes*. (2012) 61:401–8. doi: 10.2337/db11-1065
46. Tyrum RL, Motta AC, Bets JA, Boulaizmi A, Thompson D. The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans. *Int J Obes*. (2015) 39:762–9. doi: 10.1038/ijo.2014.195
47. Zeyda M, Huber J, Panger G, Stalnik TM. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity*. (2011) 19:743–8. doi: 10.1038/oby.2010.123
48. Pecht T, Gutman-Tirosh A, Bahan N, Radich A. Peripheral blood leucocyte subclasses as potential biomarkers of adipose tissue inflammation and obesity subphenotypes in humans. *Obes Rev*. (2014) 15:322–37. doi: 10.1111/obc.12133
49. Chiaruttini V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, McCarrone M, et al. Proresolving lipid mediators resolvins D1, resolvins D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med*. (2016) 8:1–24. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf7483
50. Wiebe N, Mantner P, Tonelli M. Associations of body mass index, fasting insulin, and inflammation with mortality: a prospective cohort study. *Int J Obes*. (2022) 46:2107–13. doi: 10.1038/s41366-022-01211-2



RESEARCH PAPER

Supplementation with EPA and DHA omega-3 fatty acids improves peripheral immune cell mitochondrial dysfunction and inflammation in subjects with obesity

Angélica I. Borja-Magno^a, Janette Furuzawa-Carballeda^b, Martha Guevara-Cruz^a, Clorinda Arias^c,
Julio Granados^d, Hector Bourges^e, Armando R. Tovar^a, Barry Sears^f, Lilia G. Noriega^{a,*},
Francisco Enrique Gómez^{a,*}

^a Department of Nutritional Physiology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Talpan, Ciudad de México, Mexico

^b Department of Experimental Surgery, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Talpan, Ciudad de México, Mexico

^c Department of Genomics Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico

^d Department of Transplants, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Talpan, Ciudad de México, Mexico

^e División de Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Talpan, Ciudad de México, Mexico

^f Inflammation Research Foundation, Peabody, Massachusetts, USA

Received 29 March 2023; received in revised form 1 July 2023; accepted 7 July 2023

Abstract

Omega-3 fatty acids (w-3 FA) have anti-inflammatory effects and improve mitochondrial function. Nonetheless, little is known about their effect on mitochondrial bioenergetics of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in individuals with obesity. Thus, this study aimed to determine the mitochondrial bioenergetics status and cell subset composition of PBMCs during obesity, before and after 1 month supplementation with w-3 FA. We performed a case-control study with twelve women with normal BMI (lean group) and 19 with grade 2 obesity (obese group), followed by a before-after prospective study where twelve subjects with obesity received a 1 month intervention with 5.25 g of w-3 FA (3.5 g eicosapentaenoic (EPA) and 1.75 g docosahexaenoic (DHA) acids), and obtained PBMCs from all participants. Mitochondrial bioenergetic markers, including basal and ATP-production associated respiration, proton leak, and nonmitochondrial respiration, were higher in PBMCs from the obese group vs. the lean group. The bioenergetic health index (BHI), a marker of mitochondrial function, was lower in the obese vs. the lean group. In addition, Th1, Th2, Th17, CD4+ Tregs, CD8+ Tregs, and Bregs, M1 monocytes and pDCreg cells were higher in PBMCs from the obese group vs. the lean group. The w-3 FA intervention improved mitochondrial function, mainly by decreasing nonmitochondrial respiration and increasing the reserve respiratory capacity and BHI. The intervention also reduced circulating pro-inflammatory and anti-inflammatory lymphocyte and monocytes subsets in individuals with obesity. The mitochondrial dysfunction of PBMCs and the higher proportion of peripheral pro-inflammatory and anti-inflammatory immune cells in subjects with obesity, improved with 1 month supplementation with EPA and DHA. © 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Keywords: low-grade inflammation; mitochondrial bioenergetics dysfunction; oxygen consumption rate; extracellular acidification rate; bioenergetics health index; peripheral blood mononuclear cells; PUFA.

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; APA respiration, ATP production associated respiration; BHI, bioenergetic health index; BAIF, basic leucine zipper transcription factor TF-like; Breg, regulatory B lymphocytes; BMI, body mass index; CD, cluster of differentiation; COX-2, cyclooxygenase-2; DAMPS, damage-associated molecular patterns; DHA, docosahexaenoic acid; DRP1, dynamin-related protein 1; EPA, eicosapentaenoic acid; ECAR, extracellular acidification rate; ESR, erythrocyte sedimentation rate; FA, fatty acids; FMI, fat mass index; FCCP, carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IL, interleukine; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; NADPH, nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase; NF- κ B, nuclear factor kappa B; OCR, oxygen consumption rate; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells; pDCreg, regulatory plasmacytoid dendritic cells; ROS, reactive oxygen species; RvE1, resolvin E1; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TGF- β , transforming growth factor-beta; Th, T helper cells; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; Treg, regulatory T lymphocytes; w-3, omega-3; 18R-HEPE, 18R-hydroxyeicosapentaenoic acid.

* Corresponding authors at: Francisco Enrique Gómez and Lilia G. Noriega at: Avenida Vasco de Quiroga No.15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Talpan C.P.14080, Ciudad de México, México. Tel.: 55 5487 0900.

E-mail addresses: lilia.noriega@incmnsz.mx (L.G. Noriega), egomezinn@gmail.com (F.E. Gómez).

1. Introduction

Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and inflammation are involved in the pathogenesis of obesity [1,2]. Mitochondrial dysfunction is partially attributed to ineffective dissipation of proton gradient, which increases reactive oxygen species (ROS), electron transport chain uncoupling, reduced oxidative phosphorylation (OXPHOS), decreased mitochondrial biogenesis and altered mitochondrial dynamics [3].

The mitochondria of muscle [4], and adipose tissue [5] of subjects with obesity have altered morphology, impaired bioenergetics, increased generation of lipid peroxides, decreased ATP synthesis, lower energy-generating capacities, less clearly defined inner membranes, and reduced fatty acid oxidation when compared with mitochondria of lean subjects [2,3]. The alterations of some mitochondrial constituents, such as mitochondrial DNA [6] and cytochrome C [7], are damage-associated molecular patterns (DAMPs) triggering innate immune responses contributing to the low-grade inflammation during obesity [1].

Increased monocytes in peripheral blood and macrophages in adipose tissue [8,9], as well as CD4+ and CD8+ T lymphocytes in peripheral blood and adipose tissue, characterize the low-grade inflammation present during obesity [10–15]. Besides the production of mitochondrial DAMPs, mitochondrial alterations in monocytes and lymphocytes are linked to the progression of the inflammatory process during obesity [16,17]. Monocytes and macrophages with the pro-inflammatory phenotype (M1) rely on glycolysis, while the M2 phenotype with an anti-inflammatory function depends on OXPHOS pathway [3,18]. Enhancement of OXPHOS in adipose tissue macrophages decreases the inflammation associated with a high-fat diet [19]. On the other hand, naïve T cell activation promotes a rapid metabolic shift from OXPHOS towards aerobic glycolysis [18,20]. In fact, the effector CD4+ T lymphocytes are cells with glycolytic metabolism.

In contrast, the regulatory T lymphocytes (Treg) that induce immune tolerance, depend on OXPHOS to maintain their regulatory phenotype and suppressor capabilities [20]. The CD8+ T lymphocytes have cytotoxic activity and use glycolysis to promote their effector function and differentiation [1,18]. Mitochondrial dysfunction in T lymphocytes induces an increase in glycolysis and promotes differentiation toward pro-inflammatory subsets instead of a regulatory subset [21]. However, scarce information is available regarding whether the mitochondrial function is altered in blood immune cells of subjects with obesity [22]. For example, the utility of mitochondrial function assessment in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) has proven to be a quick and effective tool to differentiate the bioenergetics status in pregnant and nonpregnant women. PBMCs showed an increase in nonmitochondrial respiration during pregnancy compared to nonpregnant women [23]. Thus, the first aim of our work was to determine the mitochondrial bioenergetics and the lymphocyte and monocyte subsets composition of PBMCs during obesity.

Furthermore, the resolution of inflammation during obesity could be improved by modulation of how immune cells harness metabolic substrates to provide energy, which depends partly on mitochondrial function [24]. Some nutrients are immunomodulatory by regulating metabolic pathways and mitochondrial function in immune cells [25]. Among these nutrients are eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, which are omega-3 fatty acids (w-3 FA) that have proven their anti-inflammatory effect [26]. EPA and DHA also improve mitochondrial function in hepatocytes and muscle of animal models by reducing ROS production and promoting mitochondrial fusion, associated with improving insulin sensitivity in muscle [27]. However, little is known about the

effect of EPA and DHA on mitochondrial bioenergetics of PBMCs as part of the anti-inflammatory effect during obesity. Therefore, the second aim of our study was to evaluate the effect of 1 month w-3 FA supplementation on mitochondrial bioenergetics and the lymphocyte and monocyte subsets composition of PBMCs of subjects with obesity.

2. Methods

2.1. Subjects

This study was conducted in the Department of Nutritional Physiology of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) in Mexico City during the years 2019 to 2020. Mexican women between 25 and 45 years old were included and allocated into two groups according to their body mass index (BMI). The obese group ($n=19$) included participants who at least had grade 2 obesity (BMI over 35 kg/m^2) as established by the World Health Organization [28]; and the lean group ($n=12$) included women with normal BMI ($18.5\text{--}24.9 \text{ kg/m}^2$) [28]. Exclusion criteria for both groups comprised patients diagnosed with type 1 and type 2 diabetes, high blood pressure, autoimmune diseases, cancer, kidney disease, liver failure, pregnant or breastfeeding women, individuals with infection disease, cardiovascular history, and/or who have consumed any nutritional supplement 3 months before the study and/or who consume hypolipemic, antihypertensive, hypoglycemic, steroids, chemotherapeutics, or immunosuppressant medication.

Subjects were invited to participate through posters and the official website of the INCMNSZ. The Ethics Committee of the Institute approved this study (REF: 1832), and all participants gave written informed consent. Clinical trials registration NCT05219890.

2.2. Data collection

Individuals were asked to provide personal information (date of birth, age). Medical history and body composition were evaluated. Laboratory data were collected from each patient on day 0 (baseline) and 1 day after the last dose of w-3 FA (day 31). They included blood count and plasma biochemical and cytokine tests.

2.3. Study design

This study was divided into two phases. The first phase was a case-control study to determine the mitochondrial bioenergetics and the lymphocyte and monocyte subsets subpopulation composition of PBMCs during obesity. The second phase was a before-after prospective study to evaluate the effect of an omega-3 (w-3 FA) intervention in mitochondrial bioenergetics and lymphocyte and monocyte subsets composition of PBMCs in subjects with obesity.

2.4. Intervention details

Women of the obese group that accepted to participate in the intervention ($n=12$) received 5.25 g of w-3 FA (3.5 g of EPA and 1.7 g of DHA) per day by consuming seven capsules daily, spread over two shots (three at breakfast and four at lunch) for 1 month. Each capsule contains 10 kcal derived from 0.25 g of protein, as well as from 1000 mg of fish oil that provides 500 mg of EPA and 250 mg of DHA. Additionally, the capsules include other ingredients such as gelatin, glycerin, purified water, and a proprietary antioxidant blend consisting of rosemary extract, sunflower oil, natural tocopherols, distilled monoglycerides. Supplements were provided by the Inflammation Research Foundation, Peabody, MA and

were delivered to participants by a nutritionist, who explained how to take the supplement and answered participants' questions. The dose was chosen because it is the minimum dose reported to be required to achieve a plasma concentration of EPA and DHA considered effective to improve triglyceride concentration and decrease cardiovascular risk by 25% [29,30]. All participants were asked to maintain their regular diet and level of physical activity and to not consume any nutritional supplements during the study. Compliance monitoring was evaluated by counting the remaining capsules in the provided bottles that were returned on the subsequent visit. We observed a compliance rate of 92%, and no participants met the exclusion criteria for noncompliance (<80% compliance rate). In addition, participants were given a monthly adverse effects record sheet, and a nutritionist was kept in touch by phone and messages to monitor tolerance to the supplement and to resolve participants' treatment concerns. During the study, 6 patients reported fishy burps, 6 reported changes in stool consistency without being diarrhea during the first 4 days of the study, and 1 reported nausea. To this later patient the dose was decreased by half and gradually increased to reach the desired dose on the third day.

2.5. Anthropometry assessment

The anthropometric assessment was performed in the morning after 12 hours of fasting. It included evaluating body weight, percentage of fat mass, and lean mass by bioelectric impedance with the body composition analyzer InBody 770®. The height was measured using a 274 stadiometer (SECA, Hamburg, Germany). The BMI was determined as indicated by the World Health Organization [28]. In addition, the fat mass index was calculated as fat mass (kg)/height² (m²) [31].

2.6. Plasma collection and PBMCs isolation

Twelve mL of peripheral blood sample was obtained at day 0 (baseline) and 1 day after the last dose of w-3 FA (day 31) and placed into anticoagulant separator tubes, followed by five tube inversions. Total leukocytes were counted in a Neubauer chamber, erythrocyte sedimentation rate (ESR) was done by a standard method, and blood plasma obtained after centrifugation at 3000 rpm at 4°C. The supernatants were aspirated and separated into 300 µl aliquots. After collection, the plasma samples were stored at -70°C. The PBMCs were isolated by density gradient centrifugation with Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) [32] and used for cytometric and mitochondrial bioenergetic analysis.

2.7. Plasma cytokines and metabolic markers analysis

Plasma TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, leptin, and adiponectin were determined using Magpix Luminex quantitative luminescence, Merck Millipore (Luminex, Austin, TX), and according to multiplexed immunoassays following the manufacturer's instructions. The plasma concentration of glucose, total cholesterol, high-density cholesterol (HDL-c), low-density cholesterol (LDL-c), and triglycerides were analyzed by a respective colorimetric assay using the Cobas c111 equipment (Roche, Indianapolis, IN). Insulin plasma levels were determined using an ELISA kit (ALPCO, Salem, NH). The HOMA-IR index was used as an indicator of insulin resistance [33], which was calculated as follows:

$$\text{HOMA-IR} = \left[\frac{\text{plasma fasting insulin (mU/L)}}{\text{X plasma fasting glucose (mg/dL)}} \right] / 405$$

2.8. Mitochondrial bioenergetic analysis in PBMCs

Mitochondrial respiration and aerobic glycolysis were assessed by measuring the oxygen consumption rate (OCR) and the extracellular acidification rate (ECAR), respectively, using the extracellular flux analyzer Seahorse XF96 (Agilent, Santa Clara, CA). The PBMCs were resuspended in Seahorse XF RPMI medium without phenol red with HEPES at 7.4 pH supplemented with glucose 11 mM, glutamine 2 mM, and pyruvate 1 mM. A density of 3×10^5 cells per well was plated in a Cell-Tak (Corning, NY) coated plate (3.7 µg/cm²). The mitochondrial stress test kit (Seahorse XF cell mito stress test kit, Agilent) was used to sequentially inject oligomycin (1.5 µM) to inhibit mitochondrial complex V, carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (1.5 µM), an uncoupling agent, and a mix of rotenone and antimycin A (0.9 µM) to inhibit mitochondrial complex I and III, respectively. We calculated basal respiration (basal OCR - nonmitochondrial OCR), ATP-production associated respiration (APA) (basal OCR - oligomycin OCR), maximal respiration (FCCP OCR - rotenone OCR), spare respiratory capacity (FCCP OCR - basal OCR), proton leak (oligomycin OCR - rotenone OCR), and nonmitochondrial respiration (rotenone and antimycin A OCR). In addition, we calculated the Bioenergetic Health Index (BHI) with the following formula $\text{BHI} = \text{Log} \left[\frac{\text{APA} \times \text{spare capacity}}{\text{proton leak} \times \text{nonmitochondrial}} \right]$ [16,34]. BHI has been proposed as a biomarker of mitochondrial function under metabolic stress in PBMCs and suggests mitochondrial dysfunction related to chronic diseases associated with obesity, and serves as an indicator of the response of PBMCs to changing metabolic programs related to their role in inflammation [16,34]. Regarding glycolytic parameters, we calculated glycolytic reserve (oligomycin ECAR - basal ECAR), compensatory glycolysis (rotenone and antimycin A ECAR - basal ECAR), and basal acidification (basal ECAR).

2.9. Immunophenotyping of PBMCs subpopulations

To evaluate the inflammatory status, we studied the lymphocyte and monocyte subset composition in PBMCs by flow cytometry using the Accuri™ C6 cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). PBMCs were incubated with 5 µL of Human TruStain FcX™ (BioLegend Inc.) per million cells in 100 µL PBS for 10 minutes, and then they were labeled with 5 µL of antihuman CD127-FITC-labeled, antihuman CD163-PerCyP-labeled and antihuman CD86-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) for M1 monocytes; antihuman CD86-FITC-labeled, antihuman CD163-PerCyP-labeled and antihuman CD14-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences) for M2 monocytes; antihuman CD4-FITC-labeled, antihuman CD11c-PerCyP-labeled and antihuman CD161-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) for Th17; antihuman CD4-FITC-labeled, antihuman CD11c-PerCyP-labeled and antihuman CD25-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) for Th1, Th2, and Tregs; antihuman CD14-FITC-labeled, antihuman CD8-PerCyP-labeled and antihuman CD28-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) for CD8+ Tregs; antihuman CD24-FITC-labeled, antihuman CD38-PerCyP-labeled and antihuman CD19-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) for Bregs; and antihuman CD123-FITC-labeled, antihuman CD11c-PerCyP-labeled and antihuman CD196-APC-conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) for plasmacytoid dendritic regulatory cells (pDCregs) in separated tubes during 20 min at 37°C in the dark. Cells were permeabilized with 200 µL of cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) at 4°C for 30 minutes. Intracellular staining was performed with an antihuman TNF-α-PE-, IL-10-PE-, IL-17-PE, IL-4-PE-, IFN-γ-PE-

, Foxp3-PE, and IDO-PE-labeled mouse monoclonal antibodies (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C in the dark. An electronic gate was made for CD127+/CD163+/CD86+ cells; CD86-/CD163-/CD14- cells; CD4+/CD11c-/CD161+ cells; CD4+/CD11c-/CD25- cells; CD4+/CD11c-/CD25high cells; CD8+/CD28-/CD14- cells; CD19+/CD24+/CD38+ cells; and CD11c+/CD123+/CD196+ cells (Supplementary Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Results are expressed as the relative percentage of TNF- α -, IL-10-, IL-17-, IL-4-, IFN- γ -, Foxp3-, and IDO-expressing cells in each gate (Supplementary Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). As isotype control, IgG1-FITC/IgG1-PE/CD45-PE/Cy5 mouse IgG1 kappa (BD Tritest, BD Biosciences) was used to set the threshold and gates in the cytometer. We ran an unstained (autofluorescence control) and permeabilized PBMCs sample. Autofluorescence control was compared to single stained cell positive controls to confirm that the stained cells were on the scale for each parameter. Besides, BD Calibrate 3 beads were used to adjust instrument settings, set fluorescence compensation, and check instrument sensitivity (BD calibrates, BD Biosciences). Fluorescence minus one (FMO) controls were stained in parallel using the panel of antibodies with the sequential omission of one antibody, except for the anti-TNF- α , IL-10, IL-17, IL-4, IFN- γ , Foxp3, and IDO, which was replaced by an isotype control rather than simply omitted. Finally, T subsets were analyzed by flow cytometry with an Accuri C6 (BD Biosciences). 500,000 to 1,000,000 events were recorded for each sample and analyzed with the FlowJo X software (Tree Star, Inc.).

2.10. Outcomes

The primary outcomes were triglyceride concentration and the mitochondrial bioenergetic parameters in subjects from the control and obese group, and before and after w-3 FA supplementation in the obese group. Secondary outcomes included the cell composition of PBMCs, plasma inflammatory and metabolic markers of subjects from the control group and from the obese group before and after w-3 FA supplementation. Additional secondary outcomes included the association of PBMCs subpopulations with biochemical, hormonal, mitochondrial bioenergetics, and plasma inflammatory markers, and the association of mitochondrial bioenergetics parameters with plasma biochemical, hormonal and inflammatory markers.

2.11. Statistical analysis

The sample size, calculated to identify a decrease of 25% in plasma triglycerides concentration after w-3 FA supplementation [35], was 10 considering a power of 80% and an alpha error of 0.05. We added 20% for possible missing patients, a total of 12 participants per group were required for this study. Descriptive statistics were performed. The continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The Shapiro Wilk statistical test was used to assess the distribution of variables. A Wilcoxon test was used to assess differences in variables that were not normally distributed. For normal distributed variables, the differences between obese and lean groups at Time 0 were analyzed using the Student t-test for independent samples. Student t-test for paired samples was used for the analysis to compare before (Pre-EPA+DHA) and after (Post-EPA+DHA) supplementation with w-3 FA. Pearson correlation was used to determine the association between OCR and ECAR parameters or subpopulation composition of PBMCs with plasma inflammatory and metabolic markers. We performed a hierarchical cluster analysis with Pearson's correlation coefficients, displayed as a heat map with the corresponding dendrogram using GraphPad Prism (version 7.0 for Windows 7 GraphPad Software, La Jolla, CA). Data were expressed as the median,

range, and mean \pm standard deviation (SD). The data were analyzed using Statistical Package for Social Science, version 20 (SPSS Inc, Chicago, IL).

3. Results

3.1. Characteristics of the study participants

Demographic, clinical, and laboratory variables of the control and obese groups are described in Table 1. The anthropometric (weight, BMI, fat mass, lean body mass, and fat mass index) and metabolic (glucose, insulin, HOMA-IR, and triglycerides) parameters were higher in the obese group compared with the lean group. As expected, HDL-c was significantly lower in the obese group than in the lean group. Inflammatory parameters such as leukocyte number and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were higher in the obese group than in the lean group (Table 1).

3.2. PBMCs mitochondrial function is impaired in patients with obesity

A mitochondrial stress test was performed to determine the mitochondrial bioenergetics status of PBMCs from subjects in the lean and obese groups (Fig. 1A and Table 2). PBMCs from the obese group had higher basal respiration ($P < 0.009$, Fig. 1C), higher respiration associated with ATP production ($P < 0.02$, Fig. 1E), higher proton leak ($P < 0.02$, Fig. 1G), and higher nonmitochondrial respiration ($P < 0.002$, Fig. 1H) when compared to PBMCs from the lean group. Conversely, there were no significant differences in maximal respiration and spare respiratory capacity between groups (Figs. 1D and 1F, respectively). We then calculated BHI that has been proposed as a biomarker of mitochondrial function under metabolic stress in PBMCs. A low BHI suggests mitochondrial dysfunction due to a higher proton leak and nonmitochondrial respiration than basal and ATP-production associated respiration. Notably, the BHI was lower in PBMCs from the obese group than in the lean group (Fig. 1B). Altogether, these results suggest that PBMCs from subjects with obesity have mitochondrial dysfunction.

Moreover, we observed a significantly higher ECAR after oligomycin ($P < 0.009$), FCCP ($P < 0.01$), and rotenone ($P < 0.01$) addition to the PBMCs from the obese group when compared with the lean group (Fig. 2A). The basal ECAR was higher ($P < 0.006$, Fig. 2B) in the obese group than in the lean group. However, there was a tendency for a higher glycolytic reserve ($P < 0.051$, Fig. 2C) and compensatory glycolysis ($P < 0.053$, Fig. 2D) in the PBMCs from the obese group than the lean group. These data suggest that PBMCs from subjects with obesity have increased extracellular acidification in basal conditions.

3.3. Circulating CD4+ effector T cells, monocytes, and regulatory subsets are increased during obesity

To determine whether obesity impacts the composition of PBMCs, we evaluated the proportion of lymphocytes and monocytes subsets from subjects in the obese and lean groups by flow cytometry (Table 3). The effector CD4+ T lymphocyte subsets, including Th1 (Fig. 3A), Th2 (Fig. 3B), and Th17 (Fig. 3C), were higher in PBMCs from the obese than the lean group. A similar pattern was observed in peripheral CD4+ Treg (Fig. 3D), CD8+ Treg (Fig. 3E), and Breg (Fig. 3F) cell percentage. We determined that M1 monocytes (Fig. 3G) and pDCreg (Fig. 3I) were significantly increased in PBMCs from the obese group vs. the lean group. However, there was no difference in M2 monocytes between groups (Fig. 3H). Altogether, these results indicate that the composition

Table 1
Demographic, clinical and inflammatory characteristics of the trial population before and after EPA+DHA intervention

	Baseline			w-3 FA treatment		
	Lean group (n=12)	Obese group (n=19)	P-value ^a	Obese group pre-EPA+DHA (n=12)	Obese group post-EPA+DHA (n=12)	P-value [†]
Demographics						
Age (years), mean±SD	31.8±6.1	34.2±5.4	0.26	33.0±4.9	33.0±4.9	0.99
Median	30.0	35		33.0	33.0	
Range	24–43	26–45		26.0–41.0	26.0–41.0	
Anthropometric and body composition parameters						
Weight (kg), mean ±SD	57.8±4.1	106.0±15.4	0.0001	106.0±18.2	106.4±17.8	0.96
Median	58.4	105.0		104.3	105.7	
Range	50.3–64.3	80.1–136.9		80.1–136.9	80.0–136.9	
Fat mass (kg), mean ±SD	15.4±3.1	52.4±12.6	0.01 [‡]	56.4±13.1	56.1±12.6	0.12 [‡]
Median	15.4	49.8		54.6	54.2	
Range	8.3–20.6	36.4–75.6		36.4–75.6	36.4–75.6	
Fat mass (%), mean ±SD	26.6±4.4	49.2±6.5	0.01 [‡]	52.7±3.8	52.9±3.6	0.58 [‡]
Median	27.5	50.4		53.1	53.9	
Range	15.0–30.0	36.5–58.1		45.5–58.1	45.0–55.8	
Lean mass (kg), mean ±SD	42.3±3.0	53.5±8.1	0.01 [‡]	50.3±5.3	50.5±5.5	0.34 [‡]
Median	43.3	50.6		49.7	49.3	
Range	36.0–47.1	43.7–70.5		43.7–61.3	43.7–61.3	
Lean mass (%), mean ±SD	73.4±4.4	50.8±6.5	0.01 [‡]	47.8±4.5	48.0±4.8	0.41 [‡]
Median	72.5	49.6		46.6	46.0	
Range	68.0–85.0	41.9–63.5		41.9–55.7	41.9–57.9	
Height (m), mean±SD	1.60±0.04	1.58±0.07	0.40	1.57±0.06	1.57±0.06	0.99
Median	1.6	1.57		1.57	1.57	
Range	1.5–1.7	1.47–1.75		1.47–1.70	1.47–1.70	
BMI (kg/m ²), mean±SD	22.4±1.3	42.2±5.7	0.001 [‡]	43.1±6.3	43.4±6.1	0.91
Median	22.7	41.0		42.7	44.1	
Range	20.1–24.2	35.0–52.8		35.0–52.8	35.0–52.8	
FMI (kg/m ²), mean±SD	6.0±1.1	21.0±4.9	0.0001	22.9±4.6	22.7±4.5	0.95
Median	6.1	21.0		23.1	23.4	
Range	3.5–7.7	13.3–29.2		15.8–29.2	15.8–29.2	
Laboratory variables						
Leukocyte count (x10 ³ /μL), mean±SD	5583±1548	9499±1970	0.002 [‡]	9326±2011	9026±1320	0.57
Median	5460	9500		9362	8475	
Range	3950–9225	5433–12600		5433–12130	7600–11400	
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h), mean±SD	9±3	28±11	0.003 [‡]	30±10	30±11	0.90 [‡]
Median	9	30		33	29	
Range	6–13	6–47		16–47	10–50	
Total cholesterol (mg/dl), mean±SD	159.3±25.8	170.5±28.8	0.38	189.3±33.1	181.7±34.1	0.80
Median	156.7	156.9		190.4	181.7	
Range	120–199	141.6–228.7		148.0–228.8	157.6–205.8	
LDL-c (mg/dl), mean±SD	97.5±13.5	106.2±24.5	0.28	112.6±25.4	110.5±26.3	0.73
Median	94.1	100.6		111.3	98.8	
Range	80.0–127.3	60.6–163.5		87.0–163.5	83.2–160.2	
Triglycerides (mg/dl), mean±SD	95.6±29.4	197.1±102.2	0.003	209.0±84.7	155.6±50.6	0.005
Median	95.0	155.9		182.9	145.9	
Range	46.1–152.4	79.2–454.1		107.0–345.7	86.7–244.4	
HDL-c (mg/dl), mean±SD	51.1±11.5	29.1±7.9	0.0002	30.6±10.2	32.6±7.2	0.32
Median	51.3	29.7		32.0	32.4	
Range	33.3–68.4	17.5–40.8		17.5–40.8	24.4–41.2	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

	Baseline			w-3 FA treatment		
	Lean group (n=12)	Obese group (n=19)	P-value*	Obese group pre-EPA+DHA (n=12)	Obese group post-EPA+DHA (n=12)	P-value [†]
Fasting glucose (mg/dL), mean±SD						
Median	78.7±8.8	89.9±10.4	0.17 [‡]	87.6±9.4	89.1±11.1	0.26 [‡]
Range	75.5	86.0		85.8	88.0	
Range	66.6–96.3	76.6–112.1		76.6–112.1	78.6–116.8	
Insulin (mU/L), mean±SD	3.6±2.5	5.13±37.7	0.0002	66.4±35.3	41.8±28.1	0.01
Median	3.9	48.6		68.5	28.6	
Range	0.1–9.1	3.7–121.2		3.2–121.2	6.0–82.4	
HOMA-IR, Mean±SD						
Median	0.7±0.5	12.4±8.83	0.0001	12.9±8.5	8.0±6.7	0.03
Range	0.7	13.1		14.1	5.5	
Range	0.1–1.6	0.7–26.1		0.01–25.9	0.01–18.7	
Serum cytokine and adipokine levels						
IL-1 β (pg/mL)	1.02±0.9	0.5±0.3	0.08	0.5±0.3	0.2±0.2	0.09
mean±SD	0.6	0.5		0.6	0.2	
Median	0.01–2.8	0.03–1.1		0.03–0.9	0.03–0.6	
Range						
IL-6 (pg/mL)	1.2±0.7	2.6±1.8	0.06 [‡]	2.9±2	1.8±0.7	0.02 [‡]
mean±SD	1.2	2.1		2.3	1.7	
Median	0.3–2.3	0.5–6.9		0.7–6.9	1.0–3.0	
Range						
IL-8 (pg/mL)	2.8±1.6	4.1±4.9	0.32 [‡]	4.9±5.8	4.4±5.1	0.09 [‡]
mean±SD	2.9	2.2		2.1	2.3	
Median	0.6–6.0	0.4–20.5		1.0–20.5	0.7–17.7	
Range						
TNF- α (pg/mL)	1.3±0.8	1.5±0.9	0.53 [‡]	1.5±1.1	1.1±0.6	0.19 [‡]
mean±SD	1.4	1.3		1.3	1.0	
Median	0.3–2.6	0.6–4.6		0.6–4.6	0.2–2.5	
Range						
Leptin (ng/mL)	4.9±4.5	30.5±18.9	0.0001	33.3±18.6	32.6±17.0	0.74
mean±SD	4.1	25.8		29.3	35.9	
Median	0.1–12.7	7.6–69.7		7.6–69.7	13.0–66.9	
Range						

* t Test for independent samples.

[†] t Pared T test.[‡] Wilcoxon test.

of PBMCs during obesity is characterized by an increased proportion not only of pro-inflammatory (Th1, Th2 and Th17 CD4+ T lymphocytes and M1 monocytes) but also regulatory cells (CD4+ Treg, CD8+Treg, Breg and pDCreg).

3.4. Association of PBMCs subpopulations with biochemical, hormonal, mitochondrial bioenergetics, and plasma inflammatory markers

We performed a hierarchical cluster analysis with Pearson's correlation coefficient to evaluate the association between lymphocyte and monocyte subsets of PBMCs with biochemical, hormonal, PBMCs mitochondrial bioenergetics, and inflammatory markers in the plasma of subjects in the obese and lean groups (Fig. 4). The clusters were visualized using a heat map and the corresponding dendrogram. M2 monocytes were classified apart from the rest of the lymphocyte and monocyte subsets. They had a significant positive correlation with proton leak, respiration associated with ATP production, nonmitochondrial respiration, and a significant negative correlation with plasma cholesterol and HDL-c (Fig. 4A). The

rest of the analyzed subsets had a significant positive correlation with BMI, fat, and lean mass and a negative correlation with HDL-c (Fig. 4A).

Moreover, the Th1 and Th2 lymphocytes were grouped and were characterized by a significant positive correlation with insulin, IL-6, and HOMA IR. The pDCreg had a similar pattern to M2 monocytes regarding mitochondrial bioenergetics markers, as shown by the significant positive correlation with proton leak, respiration associated with ATP production, and nonmitochondrial respiration (Fig. 4A). Furthermore, we evaluated the correlation between the mitochondrial bioenergetics markers with the biochemical, hormonal, and inflammatory parameters. Interestingly, BHI was classified apart from the rest of the mitochondrial markers and characterized by a positive correlation with HDL-c and a significant negative correlation with plasma glucose and leptin (Fig. 4B). Conversely, nonmitochondrial respiration and respiration associated with ATP production positively correlated with HDL-c. Finally, the glycolytic reserve had a positive correlation with HOMA-IR and a negative correlation with IL-1 β , and the spare respiratory capacity of PBMCs had a positive correlation with lean mass (Fig. 4B).

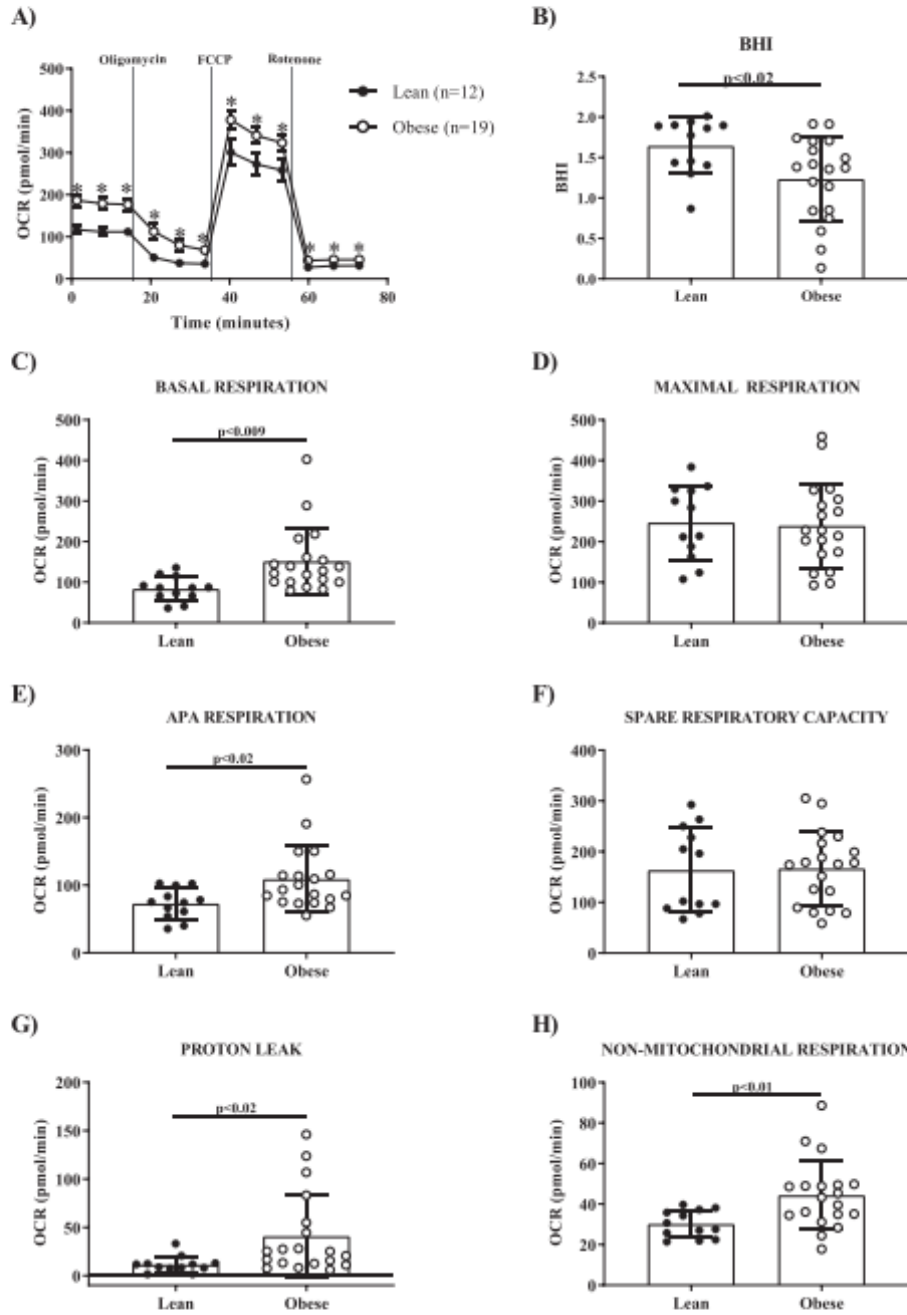


Figure 1. PBMCs mitochondrial function is impaired in individuals with obesity. (A) PBMCs from the obese group had a higher oxygen consumption rate (OCR) upon the indicated inhibitor injections in a standard Seahorse Mito Stress Test compared with the lean group. (B) PBMCs from the obese group presented mitochondrial bioenergetics dysfunction showed by lower bioenergetic health index (BHI) than the lean group. (C) Basal respiration and (D) Maximal respiration were higher in the obese group compared with the lean group. (E) ATP-production associated (APA) respiration and (F) spare respiratory capacity were similar between groups. (G) Proton leak and (H) nonmitochondrial respiration were higher in PBMCs from the obese group compared with the lean group. Data are means \pm SD except for (A) where data are mean \pm SEM. Independent-samples Student t-test was used for statistical analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Table 2
Mitochondrial parameters before and after EPA+DHA intervention

	Baseline			w-3 FA treatment		
	Lean group (n=12)	Obese group (n=19)	P-value*	Obese group pre-EPA+DHA (n=12)	Obese group post-EPA+DHA (n=12)	P-value†
Basal respiration (pmol/min), mean±SD	113.5±37.0	196.2±95.2	0.009 [‡]	203.5±114.8	153.3±65.8	0.09 [‡]
Median	109.0	176.7		160.2	143.7	
Range	57.4–173.9	100.1–491.2		100.1–491.2	80.0–278.2	
ATP production associated respiration (pmol/min), mean±SD	72.8±22.6	109.2±48.9	0.009 [‡]	122.2±56.2	104.1±37.5	0.30 [‡]
Median	74.8	93.4		103.5	112.6	
Range	35.5–102.6	55.1–256.5		67.1–256.5	60.0–181.4	
Spare respiratory capacity (pmol/min), mean±SD	163.6±83.2	172.3±68.7	0.75 [‡]	154.8±57.6	223.7±79.9	0.01 [‡]
Median	149.2	178.1		174.4	257.8	
Range	66.7–292.6	58.6–305.1		58.6–238.1	86.7–302.2	
Proton leak (pmol/min), mean±SD	11.5±8.5	40.9±42.6	0.13 [‡]	35.5±47.2	22.9±22.1	0.69 [‡]
Median	10.3	25.0		16.2	18.8	
Range	1.6–33.2	6.0–146.0		6.0–146.0	5.2–86.2	
Nonmitochondrial respiration (pmol/min), mean±SD	30.2±6.7	44.4±17.0	0.01	43.2±19.2	35.9±12.0	0.27 [‡]
Median	29.2	43.3		37.8	36.1	
Range	21.4–39.7	17.8–88.6		17.8–88.6	12.9–53.8	
BHI, mean±SD	1.7±0.4	1.2±0.5	0.02	1.3±0.5	1.6±0.3	0.005
Median	1.8	1.4		1.4	1.7	
Range	0.9–2.0	0.1–1.9		0.4–1.9	0.9–2.0	
Basal acidification (mPH/min), mean±SD	29.1±14.6	43.6±12.7	0.006	45.3±13.6	32.7±17.9	0.07 [‡]
Median	30.4	42.2		44.5	29.5	
Range	11.1–57.2	15.9–68.5		15.9–68.5	16.1–71.3	
Glycolytic reserve (mPH/min), mean±SD	23.4±6.8	31.6±12.9	0.051	31.3±15.8	26.1±8.9	0.23
Median	22.5	30.3		31.2	25.4	
Range	12.2–33.2	10.7–57.1		10.7–57.1	13.8–39.6	
Compensatory glycolysis (mPH/min), mean±SD	48.0±13.2	67.5±31.8	0.87 [‡]	58.7±33.9	47.8±17.0	0.20 [‡]
Median	50.1	55.0		51.7	42.2	
Range	23.3–71.2	19.0–141.6		19.0–141.6	29.4–89.3	

* t Test for independent samples.

† t Pared T test.

‡ Wilcoxon test.

3.5. Supplementation with w-3 FA: EPA and DHA improve mitochondrial dysfunction in PBMCs of subjects with obesity

To evaluate whether EPA and DHA supplementation improve mitochondrial bioenergetics of PBMCs in subjects with obesity, 12 participants with obesity received 3.5 g of EPA and 1.7 g of DHA daily for 1 month. The effect of w-3 FA supplementation on biochemical, hormonal, and inflammatory markers is shown in Table 1. Notably, there was a significant decrease in triglycerides, insulin, IL-1 β , and IL-6 after treatment.

One-month supplementation with EPA and DHA improved mitochondrial bioenergetics in PBMCs. We observed that the three first measurements of OCR ($P<0.009$) and the OCR after rotenone injection ($P<0.03$) significantly decreased (Fig. 5A and Table 2). No-

tably, the nonmitochondrial respiration (Fig. 5H) decreased, and the spare respiratory capacity significantly increased (Fig. 5F) after EPA and DHA supplementation. No significant effect was observed on proton leak (Fig. 5G) or basal respiration (Fig. 5C). However, there was a tendency ($P=0.06$) for maximal respiration to increase after EPA and DHA supplementation (Fig. 5D). BHI significantly increased ($P<0.004$) in PBMCs after EPA and DHA supplementation (Fig. 5B). Altogether, this data shows that the EPA and DHA supplementation improves mitochondrial dysfunction in PBMCs of subjects with obesity.

Moreover, we observed a statistical decrease in basal ECAR ($P<0.01$) and after oligomycin ($P<0.01$) and rotenone ($P<0.03$) injections, and there were no differences upon the injection of FCCP after w-3 FA intervention (Fig. 6A). Basal ECAR significantly de-

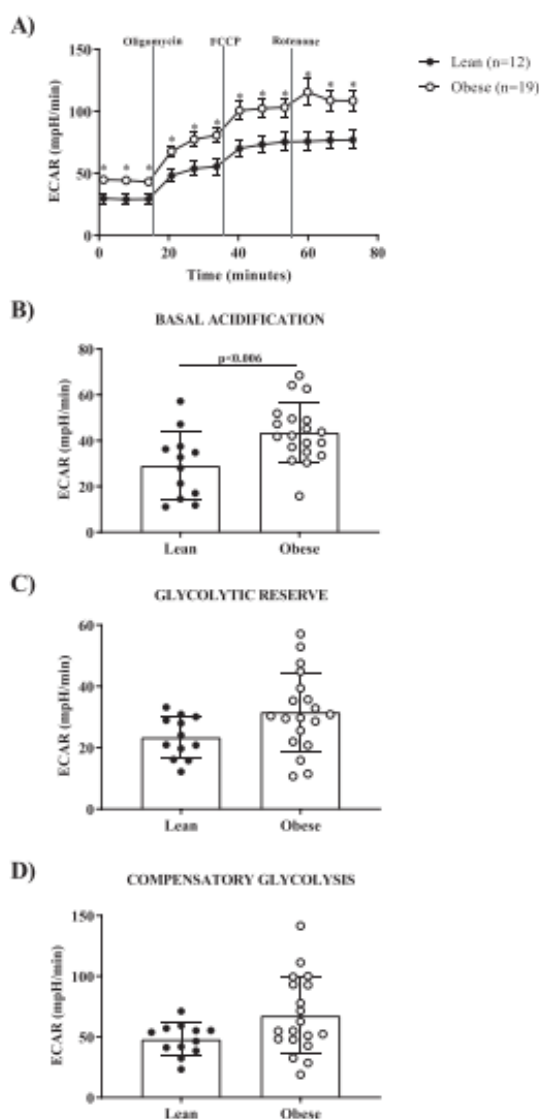


Figure 2. PBMCs have higher basal acidification in individuals with obesity. (A) Extracellular acidification rate (ECAR) upon the indicated inhibitor injections in a standard Seahorse Mito Stress Test was higher in PBMCs from the obese group compared with the lean group. (B) Basal acidification was significantly higher in PBMCs from the obese group compared with the lean group. (C) Glycolytic reserve and (D) compensatory glycolysis were similar between groups. Data are means \pm SD except for A) where data are mean \pm SEM. Independent-samples Student t-test was used for statistical analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

creased after 1 month of EPA and DHA supplementation (Fig. 6B). However, there was no significant change in glycolytic reserve and compensatory glycolysis after EPA and DHA supplementation (Figs. 6C and 6D, respectively). Altogether, this data shows that EPA and DHA supplementation improves the basal extracellular acidification state in PBMCs of participants with obesity.

3.6. Supplementation with EPA and DHA modulates peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes and monocytes from subjects with obesity

EPA and DHA supplementation for 1 month decreased the proportion of circulating Th1 (Fig. 7A), Th2 (Fig. 7B), and Th17 (Fig. 7C) in PBMCs from subjects with obesity (Table 3). Circulating CD8+ Treg (Fig. 7E) and Breg (Fig. 7F) were also significantly decreased after 1 month of EPA and DHA supplementation. However, CD4+ Treg had no changes after supplementation (Fig. 7D). M1 monocytes (Fig. 7G), M2 (Fig. 7H), and pDCreg (Fig. 7I) decreased after 1 month of w-3 FA treatment in PBMCs from subjects with obesity. Altogether, this data shows that the EPA and DHA supplementation improves the lymphocyte and monocyte subset composition of PBMCs during obesity.

4. Discussion

In the present study, we found mitochondrial dysfunction in PBMCs from subjects with obesity, together with an increased proportion of Th1, Th2, Th17, CD4+ Treg, CD8+ Treg, and Breg lymphocytes, and M1 and pDCreg monocytes in PBMCs contributing to the low-grade systemic inflammation that occurs during obesity [36]. Notably, the supplementation with EPA and DHA for 1 month improved mitochondrial bioenergetics markers and modulated the proportion of peripheral pro-inflammatory and anti-inflammatory lymphocyte and monocyte subsets in PBMCs of participants with obesity.

PBMCs are cells that can provide a more extensive overview of the metabolic status of immune cells than other biomarkers in plasma. PBMCs are less invasive to acquire and are sensitive to the metabolic, inflammatory, or therapeutic environment to which they are exposed [22,37,38]. For example, Parisi et al. demonstrated that PBMCs from healthy subjects exposed to plasma from subjects with obesity had a higher rate of apoptosis, mitochondrial dysfunction, and higher secretion of inflammatory cytokines [37]. In another study, Zhou et al. proved that heart failure was associated with a reduced respiratory capacity of PBMCs in hospitalized patients with this condition. Moreover, a NAD+ boost improved PBMCs respiration in those patients [38]. Specifically, our work provides further evidence of mitochondria dysfunction of PBMCs during obesity, which was characterized by higher higher proton leak, higher nonmitochondrial respiration, and lower BHL. Our results are different from those observed in PBMCs from diabetic patients, which have decreased maximal respiration when nonstimulated, and increased extracellular acidification when stimulated with aCD3/aCD28 [39]. This suggests that the alterations of PBMCs mitochondrial functions depend on the patient's pathophysiological process.

Since adequate mitochondrial function drives different metabolic processes that determine phenotype, function, and proliferation of immune cells [1,24,27], mitochondrial dysfunction could be due to the low-grade chronic inflammation present during obesity. The higher mitochondrial basal respiration and ATP-linked respiration in the PBMCs during obesity suggest a higher proportion of activated lymphocytes and monocytes [40,41] and increased demand of energy by immune cells [16], which is essential for the T cell differentiation process to the Th17 phenotype and function. Th17 cells rapidly increase mitochondrial respiration during development; OXPHOS promotes the activation of the basic leucine zipper transcription factor TF-like (BATF) and, together with STAT3 activation via IL-6 signaling, is necessary to induce the Th17 phenotype [42]. Meanwhile, higher proton leak and nonmitochondrial respiration in PBMCs during obesity suggest mitochondrial membrane damage and an increased activity of enzymes like cyclooxygenase-2 (COX-2) and nicotinamide-adenine

Table 3
Absolute numbers of circulating monocyte and lymphocyte subsets before and after EPA+DHA intervention

	Baseline			w-3 FA treatment		
	Lean group (n=12)	Obese group (n=19)	P-value*	Obese group pre-EPA+DHA (n=12)	Obese group post-EPA+DHA (n=12)	P-value†
CD4+/CD161+/IL-17A+ cells (mm³),						
mean±SD	29±27	164±101	0.06‡	169±110	51±43	0.003‡
Median	19	146		154	33	
Range	14–82	14–311		14–311	11–133	
CD4+/CD25-/IL-4+ cells (mm³),						
mean±SD	27±22	163±153	0.02‡	186±174	45±41	0.006‡
Median	20	126		144	34	
Range	12–70	15–664		15–664	9–150	
CD4+/CD25-/INF-γ+ cells (mm³),						
mean±SD	20±10	147±107	0.03‡	165±122	62±54	0.02‡
Median	20	122		124	50	
Range	10–38	50–416		50–416	9–205	
CD4+/CD25hi/FOXP3+ cells (mm³),						
mean±SD	125±66	211±104	0.06‡	219±123	171±81	0.75‡
Median	105	200		200	176	
Range	78–257	39–404		39–404	31–301	
CD8+/CD28-/FOXP3+ cells (mm³),						
mean±SD	114±35	245±98	0.02	240±96	140±81	0.03
Median	98	252		259	120	
Range	94–165	71–399		71–389	46–285	
CD19+/CD24+/CD38+/IL-10+ cells (mm³), mean±SD						
mean±SD	186±119	286±127	0.11	294±147	198±131	0.11‡
Median	169	261		261	143	
Range	38–402	60–592		60–592	45–452	
CD163-/CD86+/TNF-α+ cells (mm³),						
mean±SD	33±18	128±81	0.07‡	127±91	47±42	0.005‡
Median	33	102		94	36	
Range	14–53	22–320		22–320	12–139	
CD14+/CD163+/CD86-/IL-10+ cells (mm³), mean±SD						
mean±SD	29±11	83±82	0.34‡	86±96	51±30	0.08‡
Median	30	53		49	50	
Range	12–40	14–306		14–306	13–116	
CD11c+/CD123+/CD196+/IDO+ cells (mm³), mean±SD						
mean±SD	33±9.0	149±101	0.01	152±117	80±43	0.06
Median	34.0	140		133	88	
Range	23–47	16–412		16–412	12–140	

* t Test for independent samples.

† t Pared T test.

‡ Wilcoxon test.

dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. Indeed, COX-2 and NADPH oxidase increase in phagocytic cells in subjects with obesity or metabolic alterations such as hyperlipidemia [43,44].

The maximal respiration or respiratory reserve capacity was not modified during obesity, suggesting that the cell's ability to meet the increased energy demand in response to cellular stress is not affected during obesity. Mitochondrial dysfunction could also result from low-grade chronic inflammation or induced by mitochondrial alterations produced in different organs during obesity. For example, PBMCs treated with mitoDAMPs isolated from the human heart had increased IL-6 secretion and impaired mitochondrial respiration by reducing complex I activity [37]. In addition,

macrophages from adipose tissue, which had the same mitochondrial alterations that we observed in PBMCs, have higher glycolysis and an increased secretion of IL-1β, contributing to the low-grade inflammation [45].

The BHI has been proposed as a dynamic marker for assessing the cellular bioenergetics health [16]. In this study, we utilized the BHI to evaluate the mitochondrial function status of PBMCs in individuals with obesity. We found that subjects with obesity had a lower BHI compared to lean subjects, indicating impaired mitochondrial function. However, following supplementation with EPA and DHA, the BHI significantly improved. This highlights the diagnostic and prognostic value of BHI. Furthermore, our hierarchal

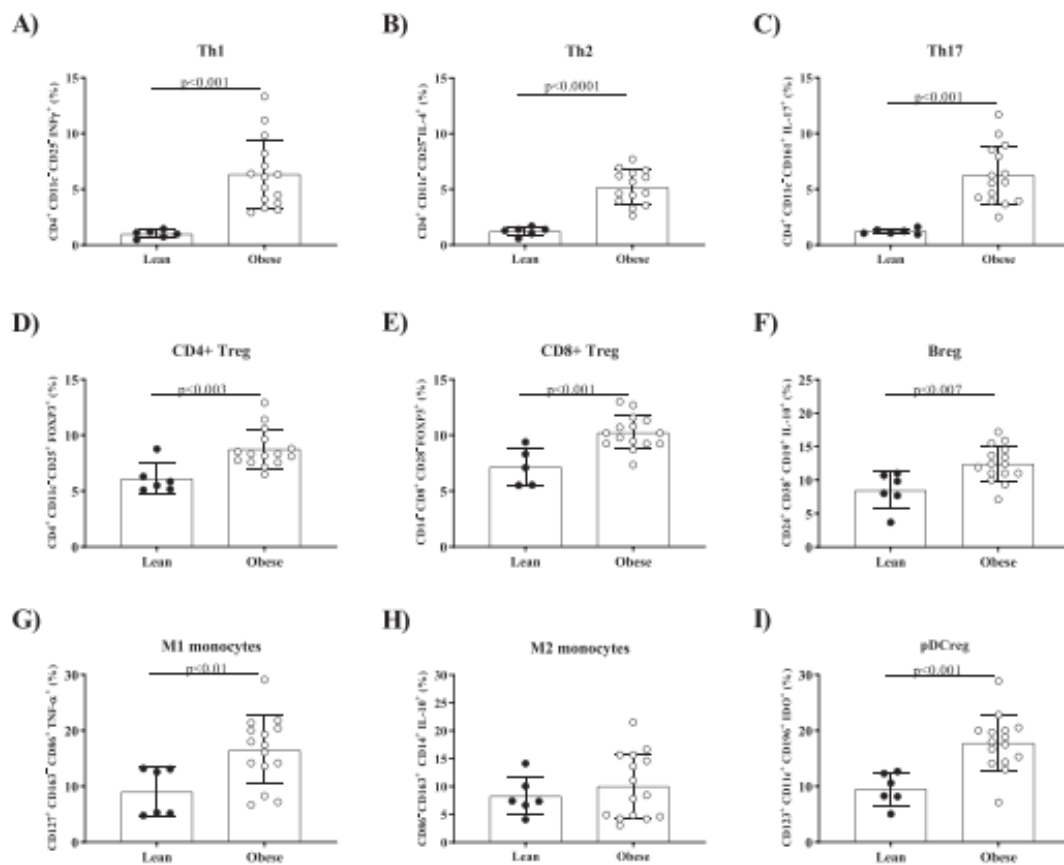


Figure 3. Circulating CD4+ effector T cells, monocytes, and regulatory subsets are increased in individuals with obesity. Circulating (A) Th1 lymphocytes, (B) Th2 lymphocytes, (C) Th17 lymphocytes, (D) CD4+ Treg, (E) CD8+ Treg, (F) Bregs, (G) M1 monocytes, and (I) pDCregs were increased in the obese group compared with the lean group. (H) Circulating M2 monocytes were similar between groups. Data are means±SD. Independent-samples Student t-test was used for statistical analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

cluster analysis showed a significant association of BHI with HDL-c levels. HDL-c is highly modulated by exercise [46] suggesting that exercise may modulate the mitochondrial bioenergetics of PBMCs and decrease inflammatory markers during obesity. However, inflammation could also modulate HDL-C and viceversa. In fact, we observed a negative correlation between HDL-c and all evaluated cells subsets. In this regard, a study has shown that HDL-c is inversely correlated to inflammation and promotes polarization of M1 macrophages to the M2 phenotype, which induces an anti-inflammatory effect in atherosclerosis [47]. Another study showed that 1 year of exercise training in subjects with obesity improved HDL-c and reduced inflammation markers such as TNF- α and CRP [48]. However, further research is needed to confirm if exercise can restore PBMCs mitochondrial function in patients with obesity.

The higher proportion of peripheral CD4+ T lymphocytes subpopulations, including Th1, Th2, and Th17 cells, and higher monocytes with M1 and pDCreg markers observed in subjects with obesity describe a systemic low-grade inflammation. Our results agree with previous reports that described an increase in peripheral Treg and Th2 lymphocytes in subjects with morbid obesity and T-cell subsets in adipose tissue from subjects with obesity [10–12]. In-

terestingly, CD4+ Treg, CD8+ Treg, and Breg cells were also increased in the obese group. Van del Weerd et al. have shown that CD4+Tregs are higher in the peripheral blood of morbidly obese individuals [10]. The increase in CD8+ Treg and Breg cells with an anti-inflammatory phenotype, suggests that a compensatory mechanism could be in place to mitigate inflammation that probably is not enough to control the inflammatory status during obesity. Bregs are not typical cells; their regulatory functions produce anti-inflammatory cytokines like IL-10 and TGF- β , inducing apoptosis of T cells by granzyme-B and producing inhibitory immunoglobulin (Ig)G4 [49]. Our results differ from a previous report by García-Hernández M et al., which showed that the Bregs decreased during overweight and obesity compared to lean volunteers. However, García-Hernández M et al. included subjects with BMI above 28 kg/m² [49]. We recruited subjects with a BMI between 35 and 40 kg/m², suggesting that the grade of obesity could determine the amount of circulating Bregs. However, further research is needed to evaluate whether Tregs and Bregs' role in modulating inflammation is efficient during obesity.

EPA and DHA are immunomodulatory nutrients that improve low-grade inflammation and metabolic markers [26,30]. The con-

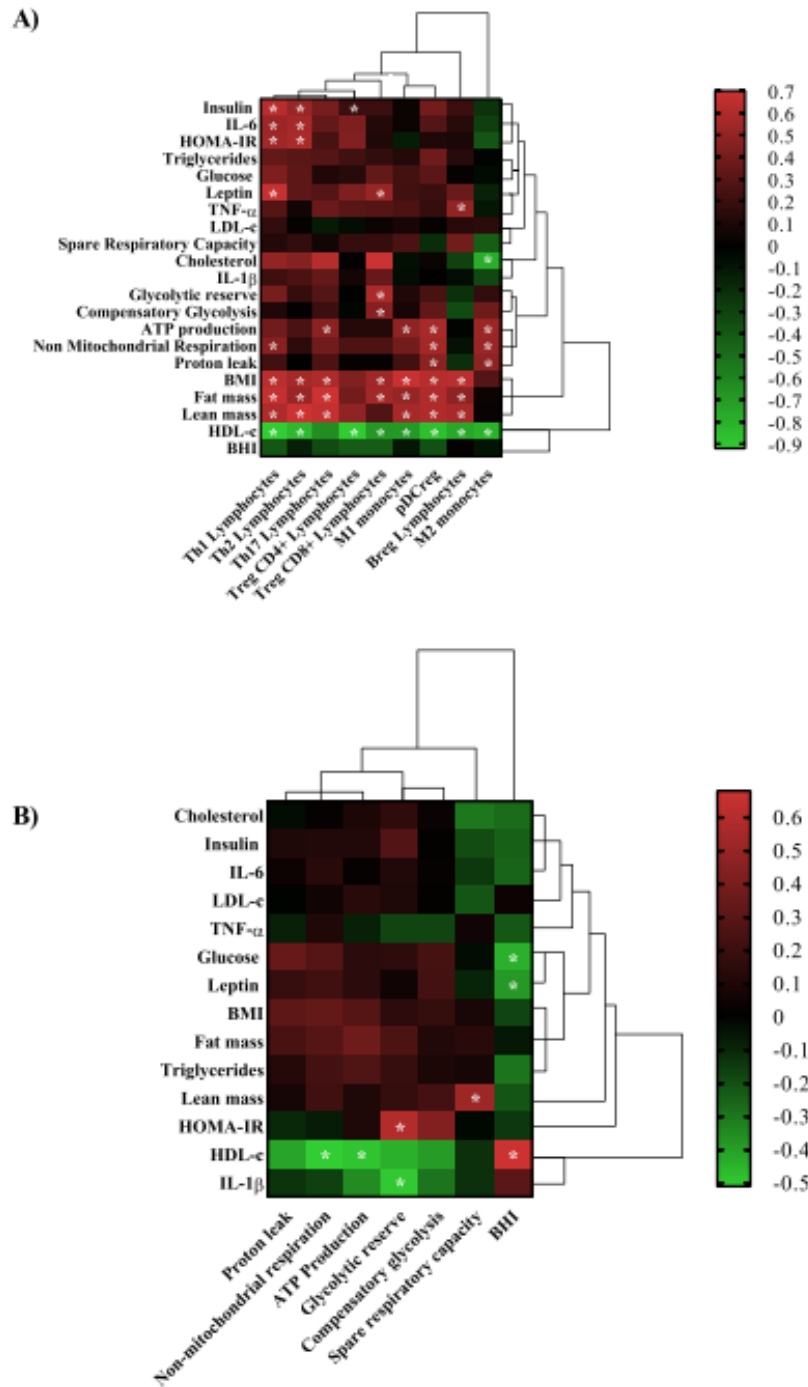


Figure 4. Association of PBMCs subpopulations with biochemical, hormonal, mitochondrial bioenergetics, and plasma inflammatory markers. Heatmap and corresponding dendrogram of the hierarchical cluster analysis of Pearson's correlation coefficients between (A) PBMCs subpopulations with biochemical, hormonal, mitochondrial bioenergetics, and plasma inflammatory markers; and (B) biochemical, hormonal and plasma inflammatory parameters with mitochondrial bioenergetics markers. BMI, body mass index; BHI, bioenergetic health index. * $P < 0.05$.

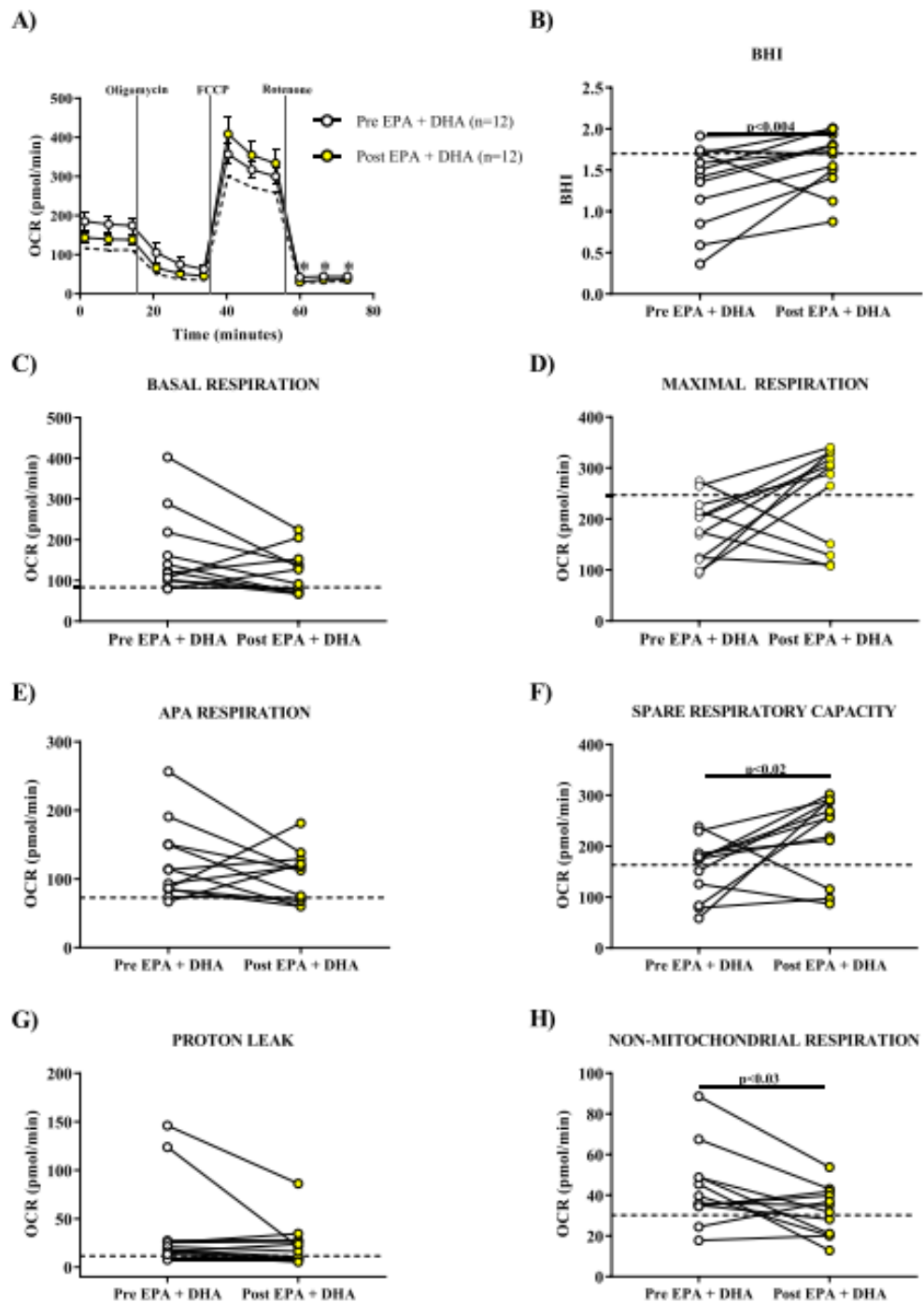


Figure 5. One-month supplementation with EPA and DHA improves PBMCs mitochondrial bioenergetic dysfunction in subjects with obesity. **(A)** EPA and DHA supplementation decreased oxygen consumption rate (OCR) upon the indicated inhibitor injections in a standard Seahorse Mito Stress Test of PBMCs in the obese group. **(B)** Bioenergetic health index (BHI) significantly increased after 1 month of EPA and DHA supplementation in the obese group. **(C)** Basal respiration, **(D)** maximal respiration, **(E)** ATP-production associated (APA) respiration of PBMCs and **(G)** proton leak were similar before and after 1 month of EPA and DHA supplementation in the obese group. **(F)** Spare respiratory capacity of PBMCs increased after EPA and DHA supplementation. **(H)** EPA and DHA supplementation decreased nonmitochondrial respiration in the obese group. Data are mean±SD except for (A) where data are mean±SEM. Paired Student t-test was used for statistical analysis. P<0.05 was considered statistically significant. The dotted line corresponds to the mean value of the lean group.

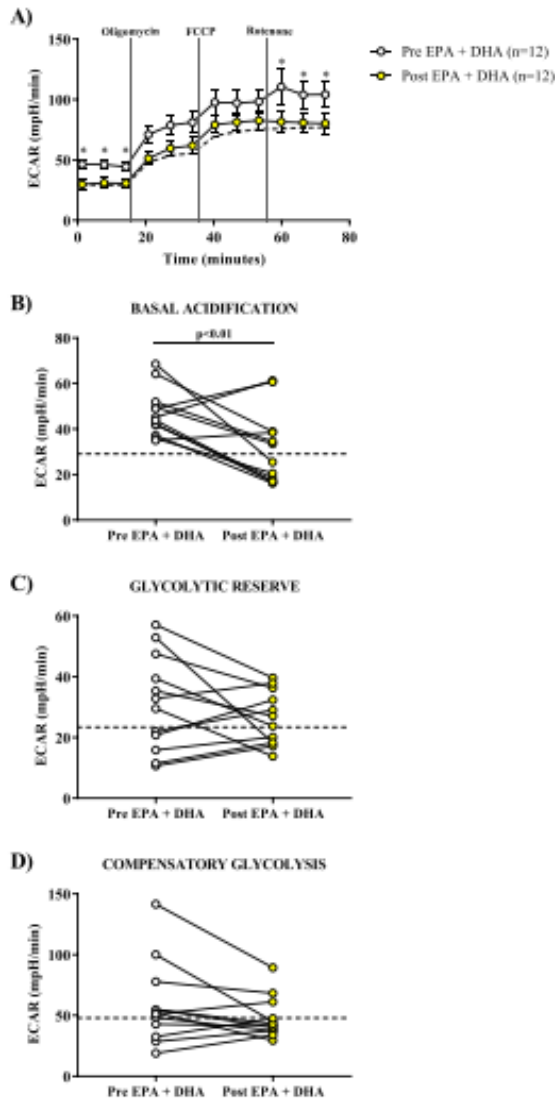


Figure 6. One-month supplementation with EPA and DHA improves PBMCs basal acidification in PBMCs from individuals with obesity. **(A)** Extracellular acidification rate (ECAR) of PBMCs upon indicated inhibitor injections in a standard Seahorse Mito Stress Test decreased after 1 month of EPA and DHA treatment. **(B)** Basal acidification significantly decreased after 1 month of EPA and DHA supplementation. EPA and DHA supplementation for 1 month had no significant effect on **(C)** glycolytic reserve and **(D)** the compensatory glycolysis in the obese group. Data are means \pm SD except for **(A)** where data are mean \pm SEM. Paired Student *t*-test was used for statistical analysis, $P < 0.05$ was considered statistically significant. The dotted line corresponds to the mean value of the lean group.

sumption of total w-3 FA among Mexican adults is 0.3 g/d, as reported by a population survey [50]. This amount is considerably below the recommended intake set by the World Health Organization of 1–2% of energy/day in the form of w-3 FA, which correspond to 2–4 g/d based on an assumed daily energy intake of 2000 calories [51]. However, further research is needed to determine the specific intake of EPA and DHA in our population, which according to the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids

should be of at least 500 mg/d of EPA+DHA [52]. In fact, we conducted a study that further supports a low w-3 FA intake, as we observed very low levels of w-3 FA in both healthy volunteers and individuals with obesity [53]. Here, in addition to the decrease in serum triglycerides, we showed that EPA and DHA enhanced mitochondrial bioenergetics of PBMCs in the obese group by modulating the reserve respiratory capacity, nonmitochondrial respiration, and BHI. It is worth noting that in a study conducted on subjects with similar characteristics to ours, supplementing with 4 g of DHA and 1 g of EPA did not show any significant effects on the parameters measured in monocytes [54], suggesting that the ratio of EPA and DHA may play a crucial role in inducing the observed effects since we used a higher amount of EPA than DHA. The effect of w-3 FA on mitochondrial function has been studied in muscle, adipose tissue, and the liver. Those reports show that EPA and DHA may induce mitochondrial biogenesis and prevent or reverse impairments in mitochondrial function [55,56]. For instance, EPA and DHA decreased mitochondria fragmentation and increased mitofusin 2 expression in an *in vitro* model of hepatic steatosis [57]. However, little is known about the effect of w-3 FA supplementation on PBMCs in individuals with obesity. Some mechanisms have been suggested to explain how EPA and DHA improve mitochondrial function. For example, Hecker et al. showed that w-3 FA-derived lipid mediators like 18R-hydroxyeicosapentaenoic acid (18R-HEPE) and Resolvin E1 (RvE1) improved mitochondrial dysfunction by modulating the mitochondrial fission in PBMCs from healthy individuals treated with TNF- α [56]. In particular, 18R-HEPE and RvE1 inhibited the expression of Dynamin-related protein 1 (DRP1), which induces mitochondrial fission, and this inhibition was associated with a decrease in the production of inflammatory cytokines [58]. Another mechanism suggested for reducing mitochondrial respiration after w-3 FA intervention is probably an improvement of mitochondrial efficiency due to the higher content of electron transfer complexes [59].

In addition to the effect that EPA and DHA may have on mitochondrial function, they can also modulate the inflammatory processes. Williams-Bey showed that w-3 FA suppresses the macrophage inflammasome's activation by inhibiting NF- κ B activation and enhancing autophagy [60]. Furthermore, we observed a reduction in CD4+ T lymphocytes and monocytes subsets after DHA and EPA supplementation. This is consistent with the work of Fan et al., which showed that w-3 FA could modulate clonal expansion of human CD4+ T lymphocytes by incorporating w-3 FA into membrane cells phospholipids, which increases membrane fluidity affecting the recruitment of proteins involved in the activation of the lymphocytes and expansion [61].

Among the limitations of this study we have the sample size, that we did not supplemented with w-3 FA normal weight individuals, the lack of a placebo group and the lack of the plasma or PBMCs fatty acid profile. While we have a small number of participants ($n=12-19$) that may limit our conclusions, our results provide promising evidence about the utility of PBMCs to evaluate the mitochondrial status of immune cells during obesity, as well as to evaluate the efficacy of lifestyle interventions, including dietary or pharmacological treatments to restore mitochondrial function. We decided not to include a placebo group because of the immunomodulatory potential of other fatty acids, frequently used in placebo capsules. For example, a high proportion of omega-6 fatty acids oil has a pro-inflammatory effect, so it is questionable to use them as a placebo [62,63]. Obtaining the plasma or PBMCs fatty acid profile would have provided us with information on the baseline status of the participants w-3 FA, to determine the effectiveness of the dose administered, as well as a quality control measure for the intervention. However, in a previous study, we evaluated the monthly effect of a high dose of

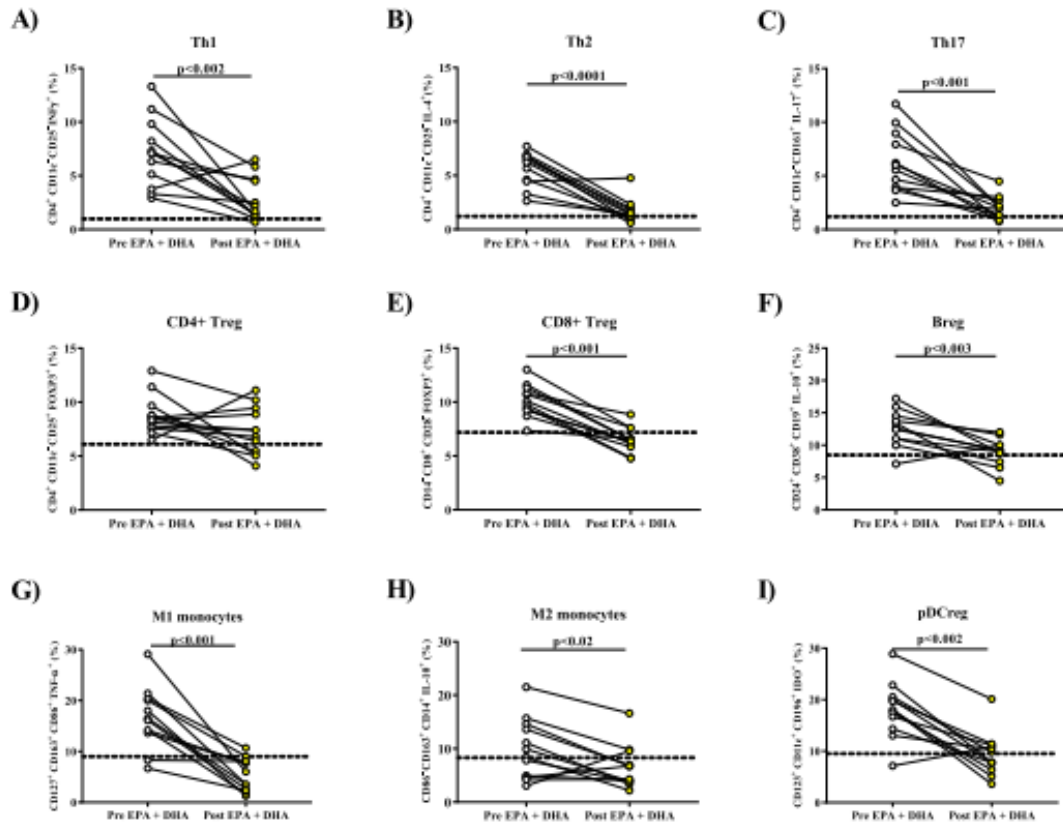


Figure 7. EPA and DHA supplementation for 1 month decreased peripheral (A) Th1 lymphocytes, (B) Th2 lymphocytes, and (C) Th17 lymphocytes in the obese group. (D) EPA and DHA supplementation for 1 month did not affect CD4⁺ Treg in the obese group. EPA and DHA supplementation for 1 month decreased peripheral (E) CD8⁺ Treg, (F) Breg lymphocytes, (G) M1 monocytes, (H) M2 monocytes, and (I) pDCregs in the obese group. Data are means±SD and were analyzed with paired Student t-test, $P < 0.05$ was considered statistically significant. The dotted line corresponds to the mean value of the lean group.

w-3 FA for 3 months on anthropometric, metabolic and inflammatory markers [53]. We observed improvements in these parameters starting from the first month, including a decrease in the arachidonic (AA)/EPA and the omega-6/omega-3 ratio. Furthermore, these changes were maintained throughout the supplementation period, indicating that 1 month supplementation was enough to evaluate the effect of our intervention. Finally, another limitation of our study was the cell heterogeneity present in PBMCs, making it difficult to establish the metabolic phenotype of each cell during obesity. However, our data provide insight into the cell subsets modified during obesity, thus, influencing the inflammatory state. Strikingly, we found cells with anti-inflammatory phenotypes among the increased cell subsets. Further research is needed to establish whether the activity of these cells is affected during obesity and, therefore, unable to counteract the inflammatory process.

5. Conclusion

Mitochondrial dysfunction and low-grade inflammation are present in PBMCs during obesity. 1 month supplementation with

EPA and DHA improved mitochondrial dysfunction and modulated the proportion of inflammatory and anti-inflammatory lymphocyte and monocyte subsets in PBMCs from subjects with obesity.

Authorship statement

AIB-M designed the study, participated in the recruitment and follow-up of participants during treatment, performed the mitochondrial function and flow cytometry experiments, data analysis and interpretation, and wrote the first draft of the paper. JFC participated in the flow cytometry experiments and analysis. MGC quantitated metabolic markers and statistical analysis. CA, JG, and HB participated in the design of the study. ART provided resources for mitochondrial function experiments. BS was the Inflammation Research Foundation contact, provided the EPA and DHA supplements, and participated in the study's design. LGN participated in the design of the study, supervised the mitochondrial function experiments and data analysis, and wrote the first draft of the paper. FEG conceived of the study, participated in its design and coordination, obtained funds, and reviewed the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was partially supported by grant CF2019-191983 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) to FEG.

Declaration of competing interest

Barry Sears is employed by Zone Labs, Inc., medical food company which produces omega-3 fatty acid products.

Acknowledgments

Angélica Irais Borja Magno is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACYT fellowship 607487.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jnutbio.2023.109415.

References

- [1] de la Cruz CS, Kang MJ. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion* 2018;41:37–44. doi:10.1016/j.mito.2017.12.001.
- [2] Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med* 2008;44(7):1259–72. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.029.
- [3] Wang L, Hu J, Zhou H. Macrophage and adipocyte mitochondrial dysfunction in obesity-induced metabolic diseases. *World J Mens Health* 2021;39:606–14. doi:10.5534/wjmh.20.0163.
- [4] Kollaki C, Roden M. Alterations of mitochondrial function and insulin sensitivity in human obesity and diabetes mellitus. *Annu Rev Nutr* 2016;36:337–67. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-090656.
- [5] Heinen S, Buzkova J, Muniandy M, Kälönen R, Ollikainen M, Ismail K, et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. *Diabetes* 2015;64:3135–45. doi:10.2337/db14-1937.
- [6] Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chen S, Ramanujan VK, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012;36:401–14. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.009.
- [7] Eleftheriadis T, Pissas G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Cytochrome c as a potentially clinical useful marker of mitochondrial and cellular damage. *Front Immunol* 2016;7:279. doi:10.3389/fimmu.2016.00279.
- [8] McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127:5–13. doi:10.1172/JCI88876.
- [9] Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology* 2018;155:407–17. doi:10.1111/imm.13002.
- [10] van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 2012;61:401–8. doi:10.2337/db11-1065.
- [11] Travers RL, Motta AC, Betts JA, Bouloumié A, Thompson D. The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans. *Int J Obes (Lond)* 2015;39:762–9. doi:10.1038/sj.ijo.2014.395.
- [12] Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:743–8. doi:10.1038/oby.2010.123.
- [13] Zhou H, Liu F. Regulation, communication, and functional roles of adipose tissue-resident CD4+ T Cells in the control of metabolic homeostasis. *Front Immunol* 2018;9:1–12. doi:10.3389/fimmu.2018.01961.
- [14] Zhao Y, Lin L, Li J, Xiao Z, Chen B, Wan L, et al. CD4+ T cells in obesity and obesity-associated diseases. *Cell Immunol* 2018;332:1–6. doi:10.1016/j.celimm.2018.08.013.
- [15] Rodríguez CP, González MC, Aguilar-Salinas CA, Nájera-Medina O. Peripheral lymphocytes, obesity, and metabolic syndrome in young adults: an immunometabolism study. *Metab Syndr Relat Disord* 2018;16:342–9. doi:10.1089/met.2018.0005.
- [16] Chacko BK, Kramer PH, Ravi S, Benavides GA, Mitchell T, Danka BP, et al. The bioenergetic health index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin Sci (Lond)* 2014;127:367–73. doi:10.1042/CS20140301.
- [17] Raas MM, de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;186(6):65845. doi:10.1016/j.bbdis.2020.163845.
- [18] Breda CN de S, Davanzo GG, Basso PJ, Savaia Câmara NO, Moraes-Vieira PMM. Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol* 2019;26:101255. doi:10.1016/j.redox.2019.101255.
- [19] Wang Y, Tang B, Long L, Luo P, Xiang W, Li X, et al. Improvement of obesity-associated disorders by a small-molecule drug targeting mitochondria of adipose tissue macrophages. *Nat Commun* 2021;12:302. doi:10.1038/s41467-020-20315-9.
- [20] O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016;16:553–65. doi:10.1038/nri.2016.70.
- [21] Baicuali F, Acín-Pérez R, Villanueva-Beltrí C, Mazzeo C, Nuñez-Andrade N, Gabandé-Rodríguez E, et al. Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory T cell responses. *Cell Metab* 2015;22:485–98. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.020.
- [22] Sen P, Kempainen E, Orešić M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front Mol Biosci* 2018;4:96. doi:10.3389/fmolb.2017.00096.
- [23] Jones N, Piasecka J, Bryant AH, Jones RH, Skibinski DOF, Francis NJ, et al. Bioenergetic analysis of human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2015;182:69–80. doi:10.1111/cei.12662.
- [24] Keane RN, Calton BK, Cafressi R, Hart PH, Newsholme P. The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2017;71:504–12. doi:10.1038/ejcn.2017.45.
- [25] Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic inflammation-differential modulation by dietary constituents. *Nutrients* 2016;8:247. doi:10.3390/n8050247.
- [26] Li K, Huang T, Zheng J, Wu K, Li D. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e88103. doi:10.1371/journal.pone.0088103.
- [27] Puri R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol* 2015;6:1–7. doi:10.3389/fphys.2015.00103.
- [28] WHO (Europe Nutrition) Body mass index—BMI. World Health Organization; 2018.
- [29] Yee LD, Lester JL, Cole RM, Richardson JR, Hsu JC, Li Y, et al. ω -3 fatty acid supplements in women at high risk of breast cancer have dose-dependent effects on breast adipose tissue fatty acid composition. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1185–94. doi:10.3945/ajcn.2009.2903s.
- [30] Kris-Etherton PM, Richter CK, Bowen KJ, Sialas-Ray AC, Jackson KH, Rettersen KS, et al. Recent clinical trials shed new light on the cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Methodist Debakey Cardiovasc J* 2019;15:171–8. doi:10.34797/mdcj-15-3-171.
- [31] Peltz G, Aguirre MT, Sanderson M, Fadden MK. The role of fat mass index in determining obesity. *Am J Hum Biol* 2010;22:639–47. doi:10.1002/ajhb.21056.
- [32] Grievink HW, Luismann T, Kluff C, Moesland M, Malone KE. Comparison of three isolation techniques for human peripheral blood mononuclear cells: cell recovery and viability, population composition, and cell functionality. *Biopreserv Biobank* 2016;14:410–15. doi:10.1089/bio.2015.0304.
- [33] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–19. doi:10.1007/BF00280883.
- [34] Chacko BK, Zhi D, Daifley-Usmar VM, Mitchell T. The bioenergetic health index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes. *Redox Biol* 2016;8:43–50. doi:10.1016/j.redox.2015.12.008.
- [35] Ihan DC, Watts GF, Mori TA, Barrett PH, Redgrave TG, Bellin LJ. Randomized controlled trial of the effect of n-3 fatty acid supplementation on the metabolism of apolipoprotein B-100 and chylomicron remnants in men with visceral obesity. *Am J Clin Nutr* 2003;77:300–7. doi:10.1093/ajcn/77.2.300.
- [36] Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* 2022;55(1):31–55. doi:10.1016/j.immuni.2021.12.013.
- [37] Parisi MM, Grun IK, Lavandoski P, Alves LB, Bristol IJ, Mattiello R, et al. Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 2017;25:1523–31. doi:10.1002/oby.23888.
- [38] Zhou B, Wang DDH, Qu Y, Aihart S, Liu Y, Stempien-Otero A, et al. Boosting NAD level suppresses inflammatory activation of PBMCs in heart failure. *J Clin Invest* 2020;130:6054–63. doi:10.1172/JCI138538.
- [39] Nicholas DA, Proctor EA, Agrawal M, Belkina AC, Van Nostand SC, Panneerseelan-Bharath L, et al. Fatty acid metabolites combine with reduced β oxidation to activate Th17 inflammation in human type 2 diabetes. *Cell Metab* 2019;30:447–61. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.004.
- [40] Waters LR, Ahsan FM, Wolf DM, Shirahai O, Teitell MA. Initial B cell activation induces metabolic reprogramming and mitochondrial remodeling. *iScience* 2018;5:99–109. doi:10.1016/j.isci.2018.07.005.
- [41] van der Windt G, Pearce E. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev* 2012;249:27–42. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.0150.x.Metabolic.
- [42] Shin B, Benavides GA, Geng J, Korolov SB, Hu H, Daifley-Usmar VM, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation regulates the fate decision between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Cell Rep* 2020;30:1898–909. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.022.
- [43] Fortuño A, Bidegain J, Baltanás A, Moreno MJ, Romero L, Landeche MF, et al. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. *J Hypertens* 2010;28:1944–50. doi:10.1097/HJH.0b013e3283c21af.

- [44] Bonaterra GA, Hildebrandt W, Bodens A, Sauer R, Dugi KA, Deigner HP, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in peripheral blood mononuclear cells of smokers and hyperlipidemic subjects. *Free Radic Biol Med* 2005;38:235–42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.021.
- [45] Sharma M, Boytard L, Hadi T, Koelwyn G, Simon R, Ouimet M, et al. Enhanced glycolysis and HIF-1 α activation in adipose tissue macrophages sustains local and systemic interleukin-1 β production in obesity. *Sci Rep* 2020;10:5555. doi:10.1038/s41598-020-62272-9.
- [46] Ruiz-Ramie JJ, Barber JL, Szarynski MA. Effects of exercise on HDL functionality. *Curr Opin Lipidol* 2019;30:16–23. doi:10.1097/MOL.0000000000000568.
- [47] Nazir S, Jankowski V, Bender G, Zewinger S, Rye KA, van der Vorst EPC. Interaction between high-density lipoproteins and inflammation: function matters more than concentration. *Adv Drug Deliv Rev* 2020;159:94–119. doi:10.1016/j.addr.2020.10.006.
- [48] Pedersen LR, Olsen RH, Anholm C, Astrup A, Eagen-Olsen J, Fenger M, et al. Effects of 1 year of exercise training versus combined exercise training and weight loss on body composition, low-grade inflammation and lipids in overweight patients with coronary artery disease: a randomized trial. *Cardiovasc Diabetol* 2019;18:127. doi:10.1186/s12933-019-0934-x.
- [49] García-Hernández MH, Rodríguez-Varela E, García-Jacobo RE, Hernández-De la Torre M, Uresti-Rivera EE, González-Amaro R, et al. Frequency of regulatory B cells in adipose tissue and peripheral blood from individuals with overweight, obesity and normal-weight. *Obes Res Clin Pract* 2018;12:513–19. doi:10.1016/j.orcp.2018.07.001.
- [50] Ramírez-Silva I, Villalpando S, Moreno-Saracho JE, Bernal-Medina D. Fatty acids intake in the Mexican population. *Res Nat Nutr Surv* 2006;8(1):33. doi:10.1186/1743-7075-8-33.
- [51] Burlingame B, Nishida C, Uauy R, Weisell R. Fats and fatty acids in human nutrition: introduction. *Ann Nutr Metab* 2011;55:5–7. doi:10.1159/000228993.
- [52] International society for the study of fatty acids and lipids and global organization for EPA and DHA. Global recommendations for EPA and DHA intake (Rev 19 November 2014). <https://www.issfa.org/good-recommendations-for-epa-dha>. [accessed 13 June 2023].
- [53] Borja-Magno A, Guevara-Cruz M, Flores-López A, Carrillo-Domínguez S, Ganaños J, Arias C, et al. Differential effects of high dose omega-3 fatty acids on metabolism and inflammation in patients with obesity: eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation. *Front Nutr* 2023;10. doi:10.3389/fnut.2023.1156995.
- [54] Pauls SD, Rodway LR, Sidhu KK, Winter T, Sidhu N, Aulema HM, Zahradka P, Taylor CG. Oils rich in α -linolenic acid or docosahexaenoic acid have distinct effects on plasma oxylipin and adiponectin concentrations and on monocyte bioenergetics in women with obesity. *J Nutr* 2021;151(10):3053–66. doi:10.1093/jn/nab235.
- [55] Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. n-3 Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr* 2011;2:304–16. doi:10.3945/an.111.00505.
- [56] Lepretti M, Martucciello S, Aceres MAB, Putti R, Lionetti L. Omega-3 fatty acids and insulin resistance: focus on the regulation of mitochondria and endoplasmic reticulum stress. *Nutrients* 2018;10:350. doi:10.3390/nu10030350.
- [57] Zhang Y, Jiang L, Hu W, Zheng Q, Xiang W. Mitochondrial dysfunction during in vitro hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2. *Metabolism* 2011;60:767–75. doi:10.1016/j.jmetabol.2010.07.026.
- [58] Hecker M, Sommer N, Foch S, Hecker A, Hackstein H, Witzenthalm M, et al. Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863:1016–28. doi:10.1016/j.bba.lip.2018.06.011.
- [59] Serrano J, Cassanye A, Martín-Gari M, Gárnado-Serrano A, Potero-Olín M. Effect of dietary bioactive compounds on mitochondrial and metabolic flexibility. *Diseases* 2016;4:14. doi:10.3390/diseases4010014.
- [60] Williams-Bey Yolanda, Boulsan Cedric, Vural Ali, Huang Ning-Na, Ji-Young Hwang CS-S, Kehil. Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammatory activation by inhibiting NF- κ B activation and enhancing autophagy. *PLoS One* 2014;9:e97957. doi:10.1371/journal.pone.008503.
- [61] Fan Yang-Yi, Fuentes Natividad R, Hou Tim Y, Rola Barhoumi XCL, Deutz Nicolaas EP, Engelen Marielle PKJ, McMurray David N, Chapkin RS. Remodelling of primary human CD4+ T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. *Br J Nutr* 2018;119:163–75. doi:10.1017/S0007114517003385.
- [62] Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018;132:41–8. doi:10.1016/j.plsfa.2018.03.004.
- [63] Sureña A, Martorell M, Bibiloni M del M, Bouzas C, Gallardo-Alfaro L, Mateos D, et al. Effect of free fatty acids on inflammatory gene expression and hydrogen peroxide production by ex vivo blood mononuclear cells. *Nutrients* 2020;12:146. doi:10.3390/nu12030146.