

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapa: Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos

Efecto de una dieta suplementada con chía (Salvia hispánica) sobre moléculas la inflamación y resistencia a la insulina en pacientes con hígado graso no alcohólico (HGNA)

Lugar: Laboratorio de endocrinología, Instituto Nacional de Cardiología

Asesor interno: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ. No. Eco. 17902

Asesor externo: MTRA. AIDA XOCHITL MEDINA URRUTIA. Ced. Prof. 5990263

Fecha de inicio: 20 de agosto 2018

Fecha de terminación: 20 de febrero 2019

Duración en horas: 480 horas.

Autor: Juan Alan Calderon Casas

Matricula: 2132032281

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2.- Marco teórico.....	2
2.1. <i>Obesidad</i>	2
2.2. <i>Fisiopatología de la acción de la insulina</i>	3
2.2.1. <i>Resistencia a la insulina</i>	5
2.2.2. <i>Diagnóstico de resistencia a la insulina (RI)</i>	6
2.3. <i>Inflamación</i>	11
2.4. <i>Hígado graso no alcohólico</i>	12
2.4.1 <i>Fisiopatología del HGNA</i>	13
2.4.2. <i>Diagnóstico de HGNA</i>	15
2.4.3 <i>Tratamiento del HGNA</i>	16
2.5. <i>Ácidos grasos Omega-3</i>	19
2.5.1. <i>Efecto de los PUFA-ω3 sobre marcadores de inflamación y RI</i>	20
2.6. <i>Chía (Salvia Hispanica)</i>	21
3-. <i>Planteamiento del problema</i>	22
4-. <i>Justificación</i>	23
5.- <i>Pregunta de investigación</i>	23
7.- <i>Objetivos particulares</i>	24
8.- <i>Metodología</i>	24
8.1. <i>METODOS DE LABORATORIO</i>	26
9.- <i>Cronograma</i>	29
10. <i>Resultados</i>	30
10.1. <i>Características antropométricas y bioquímicas</i>	30
10.2 <i>Parámetros dietéticos de los pacientes, antes y después del tratamiento con chía</i>	31
10.3 <i>Marcadores de inflamación</i>	35
10.4. <i>Resistencia a la insulina y Ácidos grasos libres</i>	36
11. <i>Discusión</i>	¡Error! Marcador no definido.
12. <i>Conclusión</i>	37

13. Referencias	38
------------------------------	-----------

1. Resumen

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es un padecimiento que afecta aproximadamente al 30% de la población mexicana. Esta anormalidad hepática es un problema de salud pública debido a su estrecha relación con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad arterial coronaria principales causas de mortalidad en población mexicana. Dada la carencia de alternativas farmacológicas para tratar esta anormalidad hepática las modificaciones en el estilo de vida son la principal alternativa para prevenir y esta enfermedad. El HGNA es un padecimiento multifactorial, en el que un exceso de ácidos grasos circulantes, producto del exceso de adiposidad y resistencia a la insulina da lugar a un estado pro-inflamatorio que perpetúa y agrava el daño hepático. -Los ácidos grasos omega 3 han mostrado tener efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y favorecer la beta-oxidación, disminuyendo así el contenido intra-hepático de grasa. Las dietas ricas en ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) han mostrado ser una alternativa eficaz en el tratamiento del HGNA. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto sobre marcadores de inflamación y resistencia a la insulina, en 30 pacientes con HGNA que recibieron una dieta isocalórica suplementada con 25 g/día de chía molida durante 8 semanas. La chía es rica en ácido alfa-linolénico (ALA), también omega 3, precursor de DHA y EPA. Además, la semilla de chía tiene un alto contenido de proteínas, minerales y antioxidantes. En el presente estudio observamos que 8 semanas de intervención con 25 g/día de chía molida, fueron suficientes para disminuir el contenido intrahepático de grasa, atenuar la inflamación del tejido adiposo, mejora la resistencia a la insulina y el metabolismo de carbohidratos, particularmente entre los sujetos que tuvieron una curva de tolerancia a la glucosa anormal. Dada la carencia de intervenciones farmacológicas exitosas en este tipo de pacientes, estos resultados permiten sugerir a la chía como una herramienta útil para la intervención de pacientes con HGNA.

2.- Marco teórico

2.1. Obesidad

La obesidad es un padecimiento crónico no transmisible, caracterizado por la acumulación excesiva de grasa corporal, constituye un problema de salud debido a que afecta múltiples órganos y sistemas, por lo que es un factor de riesgo para la presencia de depresión, alteraciones musculo-esqueléticas y respiratorias, algunas anomalías metabólicas como hipertensión, dislipidemia, resistencia a la insulina, hígado graso no alcohólico (HGNA) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), además de asociarse directamente con el desarrollo de algunos tipos de cáncer y enfermedad cardiovascular, principales causas de mortalidad en diversas poblaciones (OMS, 2017).

La antropometría es la herramienta más utilizada para el diagnóstico de obesidad, esta incluye tres medidas básicas que son el peso, la estatura y la circunferencia de cintura. El índice de masa corporal (IMC) expresa el peso en función de la talla, y se calcula mediante la fórmula de Quetelet: $\text{Peso (kg)} / \text{talla (m}^2\text{)}$ (Rosales, 2012). Aunque estrictamente el IMC es un reflejo del estado nutricional de un individuo, este índice es el indicador antropométrico más ampliamente utilizado para definir el grado de obesidad, tanto en estudios poblacionales como en la práctica clínica cotidiana, ya que es un método accesible y de bajo costo que no requiere de infraestructura costosa, ni de capacitación especializada para el personal de salud. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los puntos de corte para definir el estado nutricional son los siguientes: $\text{IMC} < 18.5 \text{ Kg/m}^2$ peso bajo, IMC de 18.5 a 24.9 Kg/m^2 peso normal, IMC entre 25 y 29.9 Kg/m^2 sobrepeso, $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ obesidad. Por otro lado, la circunferencia de cintura es la medida más asequible para evaluar la distribución de la grasa corporal o adiposidad central, cuando la circunferencia de cintura es mayor de 102

cm en hombres y de 88 cm en mujeres, se diagnostica obesidad central o abdominal (OMS, 2017).

En la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSATU) se obtuvo información antropométrica y estimaciones poblacionales sobre las prevalencias de sobrepeso y obesidad en México. La información fue recabada en adultos a mayores de 20 años, niños en edad escolar (5 -11 años) y adolescentes (12-19 años). La prevalencia de exceso de peso (sobrepeso y obesidad) fue de 73% en mujeres y 69.4% en hombres adultos. De manera alarmante se observó que más del 30% de la población infantil y adolescente cursa con obesidad (ENSANUT, 2016).

2.2. Fisiopatología de la acción de la insulina

La insulina es una proteína con un peso molecular de 5.8 KDa, formada por 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas (A y B) unidas por puentes disulfuro (Figura 1). Esta hormona es secretada por los islotes de células β en el páncreas y participa en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. (Reyes. 2008)

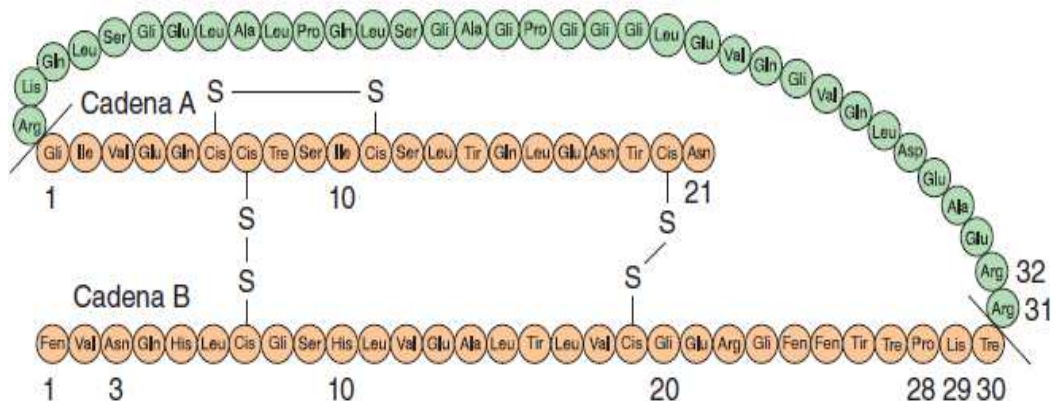


Figura 1. Estructura química de la insulina. Imagen obtenida de www.accessmedicina.com

La insulina se encarga de controlar la captación, utilización y almacenamiento de nutrientes celulares. En el caso de la glucosa, la acción de la insulina regula la expresión de su receptor celular (GLUT4), este modula la entrada de glucosa a las células de todos

los tejidos. En condiciones fisiológicas normales, el exceso de glucosa es almacenado en el tejido muscular y el tejido adiposo en forma de glucógeno y triglicéridos, respectivamente. Durante el post-prandio la insulina inhibe la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la cetogénesis hepática, además de promover la síntesis de proteínas, principalmente en el músculo. (Rodelo, 2017).

El receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés) es una glucoproteína que pertenece a la familia de las tirosin-cinasas y está formada por dos subunidades α (extra-menbranal) y dos subunidades β (trans e intramembranal) (Rodelo, 2017) (Figura 2).

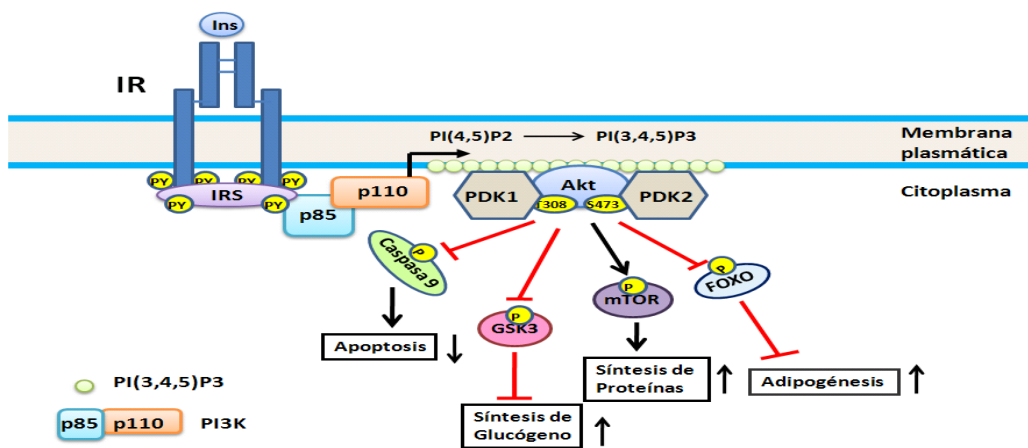


Figura 2. Vías de señalización de la insulina (Reyes, 2008)

La insulina induce la fosforilación del receptor (IR) en residuos intracelulares de tirosina (Tyr), lo que inicia una cascada de señalización intracelular, el receptor fosforilado se une con los sustratos del receptor de insulina tipo I y II (IRS-1, IRS-2) (Hubbard, 1997). La propagación intracelular de la señal está regulada por la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K/Akt), también llamada proteína cinasa B (PKB), responsable de los efectos metabólicos de la insulina. La vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAP cinasas), regula la expresión genética y los efectos mitogénicos de la insulina. (White, 2003, Reyes. 2008) La cinasa Akt, de la cual se conocen 3 isoformas (Akt 1, 2 y 3), tiene un papel central en la regulación metabólica de la insulina ya que su activación induce la

fosforilación de diversos sustratos con importantes funciones biológicas. La isoforma Akt 2 participa en la incorporación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, en donde promueve la translocación del receptor de glucosa (GLUT4), regulando así la captación de glucosa por la célula (Manning, 2007).

La sensibilidad a la insulina (SI) se define como la eficacia de esta hormona para reducir la concentración de glucosa en sangre, a nivel periférico estimula la captación de glucosa en músculo y tejido adiposo, mientras que en hígado inhibe la producción hepática de glucosa e incrementa la biosíntesis de glucógeno (Anderwald, 2007). La secreción de insulina ocurre en dos fases, la primera es regulada por la ingesta de alimento y ocurre dentro de los primeros 10 minutos después del estímulo, por lo que se conoce como fase rápida. La segunda fase está regulada por el nivel de glicemia y la presencia de otros nutrientes, así como por la producción de hormonas gastrointestinales denominadas incretinas, estas últimas favorecen la producción y acción celular de la insulina. (Pacini, 2003).

2.2.1. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) es un proceso complejo en el que hay una respuesta disminuida de los tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo e hígado) hacia la acción de la insulina. Debido a que en condiciones fisiológicas los niveles de glucosa en plasma regulan la tasa de secreción de insulina, su concentración en plasma es un reflejo de su acción sobre la captación y el metabolismo de glucosa, por lo que en los estados de RI ocurre un incremento compensatorio en las concentraciones plasmáticas de insulina, en un intento de la célula β pancreática por mantener las concentraciones de glucosa en concentraciones normales (Lebovits, 2001). La RI esta asociada a un conjunto de factores de riesgo metabólicos y cardiovasculares, que en conjunto se han definido como síndrome de resistencia a la insulina o síndrome metabólico. (Lebovits, 2001)

2.2.2. Diagnóstico de resistencia a la insulina (RI)

La tolerancia a la glucosa depende de la interacción entre la secreción de insulina y la sensibilidad celular a la acción de esta hormona (sensibilidad a la insulina: SI). El deterioro progresivo de la secreción y acción de la insulina dan lugar a lo que se conoce como intolerancia a la glucosa y finalmente a DM2 (Kahn, 2003). La evaluación cuantitativa de la SI y secreción de insulina (función de las células β pancreáticas: FCB) pretende esclarecer a que nivel está el defecto de los padecimientos metabólicos asociados con intolerancia a carbohidratos y DM2. Se han descrito diversos modelos para el estudio de la SI y la FCB. El estándar de oro para el análisis de éstas variables es el clamp euglucémico-hiperinsulinémico; sin embargo, esta es una prueba que requiere manejo intra-hospitalario, por lo que su costo es alto, y sólo se utiliza con fines de investigación. Diversos autores han creado modelos a partir de la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG), de los que derivan aproximaciones que permiten estimar la SI y FCB. De igual manera, otros modelos estiman la RI con mediciones de glucosa e insulina en ayuno, un ejemplo es el modelo de homeostasis para definir resistencia a la insulina (HOMA-RI). (Bergman 1985, Pacini, 2003).

Clamp euglucémico-hiperinsulinémico: Esta prueba fue diseñada por De Fronzo y colaboradores en 1979 (Tobin, 1979), ésta es una técnica compleja, invasiva y costosa, por lo que no se usa en la práctica clínica cotidiana. Sin embargo, permite conocer tanto la sensibilidad tisular a la insulina (hepática y muscular), como la respuesta de la célula β a la glucosa, por lo que es frecuentemente utilizada en investigación (Martínez, 2011). La prueba se fundamenta en el hecho de que a concentraciones constantes de hiperinsulinemia (100 μ U/mL por arriba del nivel basal de cada individuo), la cantidad de glucosa captada por los tejidos insulino-dependientes, será proporcional a la cantidad de insulina exógena necesaria para mantener constante la concentración de glucosa circulante. En esta prueba la glucosa debe monitorizarse cada 5 minutos y la velocidad de

infusión de glucosa se ajusta para mantener la glicemia cercana a 90 mg/dL. La infusión de insulina se calcula en base a la superficie corporal del paciente (40 mU minuto / m² de superficie corporal) (DeFronzo,1979). La prueba finaliza cuando las glicemias varían menos de 5%, lo que usualmente ocurre después de 2 a 3 horas, en este tiempo la concentración de insulina y la eliminación de glucosa se encuentran en un estado estable (Pacini, 2003). La cantidad de glucosa infundida (M= mg/Kg•min) indica el grado de tolerancia a la glucosa, mientras que la sensibilidad a la insulina se obtiene al dividir este valor (M) entre la cantidad de insulina infundida.

Mediciones en ayuno.

Las mediciones de glucosa e insulina determinadas en muestra sanguínea obtenida en ayuno han sido utilizadas para estimar la sensibilidad a la insulina; sin embargo, se reconoce que la información que brindan estas mediciones es limitada. La concentración de insulina de ayuno se ha utilizado como un subrogado de SI, aunque esta estimación ha mostrado explicar mejor aquellas condiciones en las que la respuesta a la acción de la insulina es deficiente o en las que cursan con hiperglucemia (Ader, 1997, Pacini, 2003).

Modelo homeostático para evaluar resistencia a la insulina (HOMA-RI): El método más empleado para definir RI es el modelo homeostático (HOMA) descrito en 1985 por Matthews y cols. Este modelo permite evaluar tanto la RI (HOMA-RI), como la funcionalidad de la célula beta (HOMA-B). El cálculo se fundamenta en la relación entre la glucemia e insulinemia de ayuno (Araujo, 2003); es decir, evalúa el balance entre la producción hepática de glucosa (en condiciones de ayuno más del 75% de la glucosa circulante proviene del hígado), y la secreción de insulina, por lo que ofrece una estimación de la sensibilidad hepática a la insulina. El modelo utiliza factores de corrección, para que el resultado del modelo correlacione linealmente con el clamp euglucémico-hiperinsulinémico (Wallace, 2004):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina en ayuno } (\mu\text{U/ mL}) * \text{glucosa en ayuno (mmol/L)}] / 22.5$$

$$\text{HOMA-B} = 20 * \text{insulina en ayuno } (\mu\text{U/ mL}) / (\text{glucosa en ayuno [mmol/L]} - 3.5)$$

Los modelos asumen que en un individuo sano, con índice de masa corporal normal y sin antecedentes familiares de DM el HOMA-RI sería muy cercano a 1, y el HOMA-B alrededor del 100%. Al incrementar el valor de HOMA-RI incrementa la resistencia a la insulina. Estas fórmulas fueron modificadas, debido a que con los nuevos métodos para cuantificar insulina, las ecuaciones originales subestiman la sensibilidad a la insulina y sobreestiman la función de la célula beta. Sin embargo, el HOMA2 no se ajusta a una relación lineal entre glucosa e insulina, por lo que se calcula con un programa informático disponible en www.OCDDEM.ox.ac.uk. Este modelo es útil para insulinemias entre 1-300 $\mu\text{U/ mL}$ y glucemias entre 20-450 mg/dL. (Fuentes, 2008) El índice HOMA se considera una prueba apropiada para determinar el grado de resistencia periférica a la acción de la insulina, ya que su correlación con el clamp euglucémico-hiperinsulinémico en individuos sanos, con intolerancia a la glucosa y con diabetes es de ($r=0.88$, $p<0.0001$; $r=0.85$, $p<0.0001$, y $r=0.73$, $p<0.0001$; respectivamente). Mientras que la correlación es moderada para la función de la célula beta ($r=0.62-0.69$) (Fuentes, 2008).

Curva de tolerancia oral a la glucosa

La curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) es un procedimiento originalmente diseñado para conocer el estado de tolerancia a carbohidratos, utilizando los siguientes puntos de corte: normal (glucemia 120 min post carga < 140 mg/dL), intolerancia a carbohidratos (glucemia 120 min post carga ≥ 140 mg/dL, pero < 200 mg/dL) o diabetes (glucemia 120 min post carga ≥ 200 mg/dL) (figura 3). Esta prueba permite conocer la eficacia con la que los mecanismos homeostáticos restauran la glucemia a los valores basales (valores de ayuno), tras una sobrecarga de glucosa (generalmente de 75 g de sacarosa). Sin embargo, ya que la respuesta de la glucosa y la insulina durante la prueba reflejan la capacidad de las células β para secretar insulina, así como la sensibilidad de los tejidos a la acción de esta hormona, esta prueba ha sido utilizada para evaluar la

sensibilidad a la insulina, y la funcionalidad de las células β , con fines de investigación. (Borra, 2008) Los modelos matemáticos mediante los cuales se hacen estas estimaciones se mencionan a continuación:

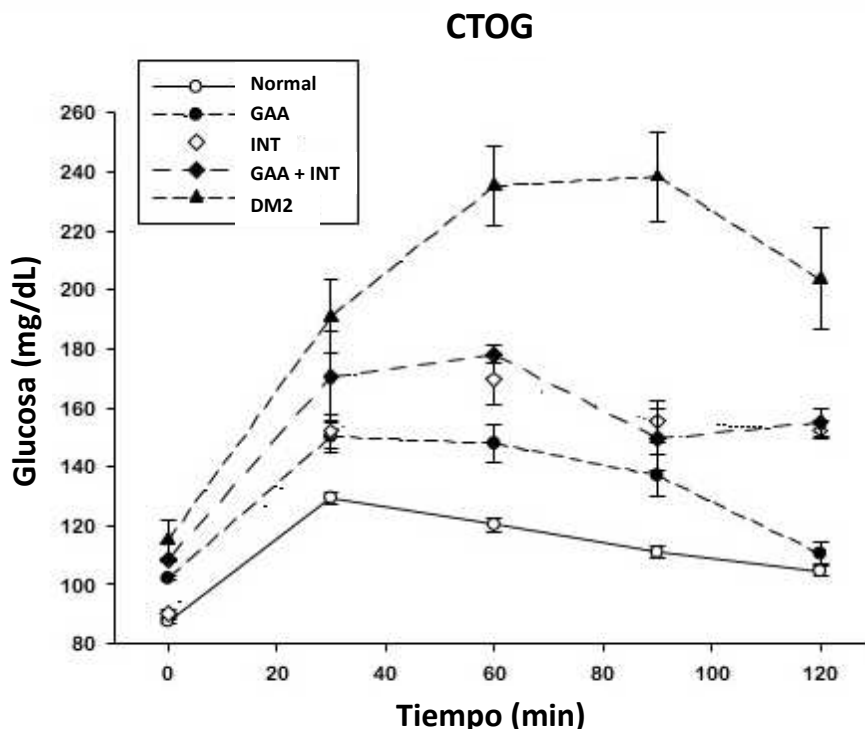


Figura 3. Patrones de respuesta a la carga oral de glucosa en los diferentes estatus de tolerancia a carbohidratos: GAA (glucosa de ayuno anormal > 110 mg/dL, INT (intolerancia a carbohidratos: glucosa > 140 mg/dL, a los 120 min post carga). DM2 (diabetes mellitus tipo 2: glucosa > 200 mg/dL, a los 120 min post carga)

Durante la CTOG la respuesta a la insulina puede dividirse en “fase temprana”, que corresponde al incremento en los primeros 30 minutos, y una fase “tardía” que abarcaría los siguientes minutos de la prueba. El cociente del incremento a los 30 minutos de insulina entre glucosa, es considerado un subrogado de la respuesta insulínica y se denomina índice insulogénico ($InsIndex = \frac{[Insulina_{30min} - Insulina_{basal}]}{[Gluc_{30min} - Gluc_{basal}]}$) (Pontiroli 2004).

En 1999 Matsuda y DeFronzo propusieron un índice de sensibilidad a la insulina obtenida a partir de las determinaciones de glucosa e insulina derivadas de la CTOG (Índice Matsuda ó ISI_{comp}). Este modelo matemático considera que durante la sobrecarga oral de

glucosa la sensibilidad a la insulina es proporcional a la supresión de la producción hepática de glucosa y a el uso de la misma por los tejidos periféricos, por lo que a menor sensibilidad a la insulina, mayores serán los incrementos de glucosa durante la curva de tolerancia. La ecuación incluye una constante (10,000) que permite obtener resultados entre 0 y 12, y la raíz cuadrada corrige la distribución no lineal de los valores. Los valores de glucemia se expresan en mg/dL y los de insulina en $\mu\text{U/mL}$ (Girbes, 2008). La correlación entre este índice y el *clamp* fueron significativas ($p < 0.0001$) en todos los casos con una $r = 0,73$ para sujetos sanos, 0.66 en los sujetos con tolerancia alterada, y de 0.54 en sujetos con diabetes. La fórmula se presenta a continuación:

$$ISI_{\text{comp}} = \frac{10.000}{\sqrt{(G_0 \times I_0) \times (\text{concentración media de glucosa en la SOG}) \times (\text{concentración media de insulina en la SOG})}}$$

Índice OGIS (por sus siglas en inglés: oral glucose insulin sensitivity): Este modelo fue desarrollado en 2001 y se basa en una ecuación que predice el aclaramiento de glucosa durante el *clamp* euglucémico-hiperinsulinémico, utiliza los valores de concentración de glucosa e insulina durante la CTOG, considerando la cinética de depuración de glucosa, en respuesta a insulina (Girbes, 2008). El modelo asume que la relación entre el aclaramiento de glucosa y la concentración de insulina sigue una función lineal. La correlación de este modelo con el *clamp* es de $r = 0.77$ para sujetos sanos y de $r = 0.49$, en pacientes con diabetes. Ya que la fórmula de este modelo es muy compleja los autores disponen de una página web para calcular el índice (<http://www.isib.cnr.it/bioing/ogis/home.html>).

2.3. Inflamación.

La inflamación se caracteriza por liberación de una cantidad elevada de leucocitos y/o citocinas proinflamatorias, en respuesta a agresiones físicas, químicas o biológicas. Una de las características de los padecimientos crónico-degenerativos como DM2, hipertensión, dislipidemia e hígado graso no alcohólico (HGNA) es su asociación con procesos inflamatorios de bajo grado (Fantuzzi, 2005); sin embargo, no está claro si la inflamación es causa o consecuencia del exceso de adiposidad y la resistencia a la insulina (Alvarenga, 2007, Yudkin, 2003) comúnmente asociada con estos padecimientos. Los adipocitos estimulados por señales de origen infeccioso o inflamatorio secretan reactantes de fase aguda como el amiloide sérico A (SAA), mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas (IL) IL-6, 8, 10, 15, 1 β (Izaola, 2015), además de proteínas con importantes funciones biológicas como leptina, adiponectina y resistina (Rejala, 2003, Yamagishi, 2005). La adiponectina es una proteína sintetizada constitutivamente en el tejido adiposo, y es un importante modulador del metabolismo de glucosa y lípidos, por lo que las concentraciones bajas de esta proteína, que paradójicamente se presentan en la obesidad, se encuentran asociadas con resistencia a la insulina y riesgo incrementado de DM2. Se ha sugerido que esta adipocina es un potente sensibilizador a la acción de la insulina, estudios in vitro han mostrado que la unión de la adiponectina con su receptor celular (AdipoR1 y AdipoR2), activa a las MAP cinasas y promueve la traslocación de GLUT4, además de reducir la producción hepática de glucosa. (Medina, 2015)

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado, productores de citocinas, factores de crecimiento y mediadores biológicos. Éstas células ejercen funciones vitales para el organismo, como la eliminación de sustancias extrañas y la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria (Clária, 2004), y participan en la patogénesis de la enfermedad hepática. Condiciones como la obesidad, el consumo

excesivo de alcohol, el consumo de algunos medicamentos y xenobióticos pueden inducir la activación de las células de Kupffer. Al activarse estas células se liberan proteínas de fase aguda, como la proteína C-reactiva (PCR), citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α), radicales libres de oxígeno y aniones superóxido, IFN- α , eicosanoides (PGD2, PGE2 y leucotrienos). El proceso inflamatorio favorece la fibrosis hepática, y de persistir el estímulo genera necrosis del tejido hepático (Clária, 2004).

2.4. Hígado graso no alcohólico

El Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) fue descrito en 1980 por Ludwig y se define como la acumulación de triglicéridos intrahepáticos mayor al 5%, respecto al peso total del hígado (Figura 4), en ausencia de ingesta excesiva de alcohol ($\geq 20\text{g/día}$), infecciones virales o consumo de fármacos hepatotóxicos. El HGNA es un padecimiento progresivo, por lo que de no controlar los factores predisponentes, puede dar lugar a esteatohepatitis caracterizada por la presencia de fibrosis hepática, y finalmente a daño hepático avanzado e irreversible (cirrosis o carcinoma hepatocelular). (Neuschwander, 2003)

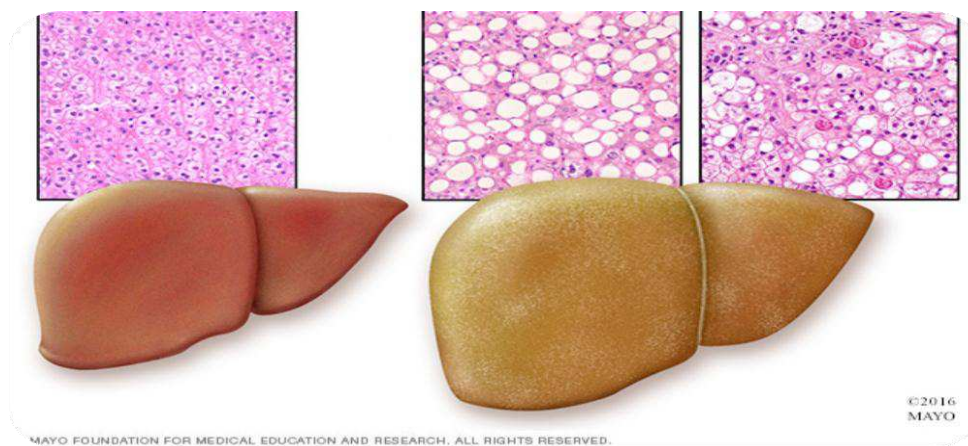


Figura 4. Hígado sano (izquierda), hígado con HGNA (derecha). www.mayoclinic.org

Un factor de riesgo fuertemente asociado al desarrollo de HGNA es la obesidad, aunque otros factores como el género (más frecuente en hombres), el origen étnico (más común en hispanos [45%] vs. blancos no-hispanos [33%]), y el consumo de una dieta inadecuada

(excesiva en calorías provenientes de carbohidratos simples y/o grasa saturada, y deficiente en ácidos grasos omega-3), se asocian con un riesgo incrementado de esta anormalidad hepática. (Manne, 2016, Browning, 2004) Estudios epidemiológicos han descrito que el HGNA es frecuente en personas con DM2; sin embargo, no ha sido posible dilucidar si el daño hepático es causa o consecuencia de la diabetes. Además se ha sugerido que el HGNA es un factor de riesgo, independiente de otros depósitos grasos, para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (EAC). (Gaggini, 2013) La asociación del HGNA con las principales causas de morbilidad (DM2 y EAC) en México y en el mundo nuestro país, aunado a la estimación de que esta anormalidad hepática será la principal causa de daño hepático irreversible en los próximos años, señalan al HGNA como una enfermedad multisistémica y un problema de salud pública, por lo que su detección oportuna, prevención y tratamiento son fundamentales. (Martinez-Alvarado, 2014)

2.4.1 Fisiopatología del HGNA

La fisiopatología del HGNA tradicionalmente ha sido explicada por la teoría de “los dos golpes”, esta propone que en el primer golpe o daño al hígado se produce por la acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos, secundaria a un estilo de vida sedentario, acompañado del consumo de una dieta inadecuada, que en conjunto dan lugar a obesidad y resistencia a la insulina. La acumulación de lípidos intra-hepáticos sensibiliza al hígado y lo hace susceptible al segundo golpe, en el que se activa la cascada de inflamación y la fibrosis hepática. Actualmente esta teoría se considera simplista, ya que se ha observado que hay diversos procesos moleculares que ocurren de manera simultánea. (Peverill, 2014)

La teoría de los golpes múltiples propone que los hábitos dietéticos, ambientales y los factores genéticos pueden conducir al desarrollo de resistencia a la insulina, obesidad y cambios en la microbiota intestinal. (Buzzetti, 2016). La resistencia a la insulina tiene un

papel clave en la etiopatogenia del HGNA, ya que a nivel hepático provoca el incremento de la lipogénesis de novo; y en el tejido adiposo provoca la inhibición deficiente de la lipasa sensible a hormonas, dando lugar a la inadecuada supresión de la lipólisis y el flujo incrementado de ácidos grasos libres (AGL) hacia el hígado. Por otro lado, la resistencia a la insulina también promueve la disfunción del tejido adiposo, que se relaciona con un aumento en la secreción de adipocitocinas pro-inflamatorias (figura 5). Por otro lado, los triglicéridos intra-hepáticos tienen efectos lipotóxicos, provocan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés del retículo endoplásmico (ER), en conjunto esto genera un ambiente pro-oxidante y pro-inflamatorio, que perpetúa el daño hepático. (Cusi, 2009) Finalmente, se ha observado que el HGNA también provoca alteraciones en la flora intestinal, la microbiota alterada produce una mayor cantidad de ácidos grasos per-se, induce un aumento significativo en la permeabilidad intestinal, lo que favorece la absorción de nutrientes, incluyendo el de ácidos grasos. Por lo que ocurre un efecto aditivo sobre la resistencia a la insulina del tejido adiposo liberando un exceso de ácidos grasos hacia la circulación, lo que perpetúa la sobrecarga hepática de lípidos. (Kirpich, 2015)

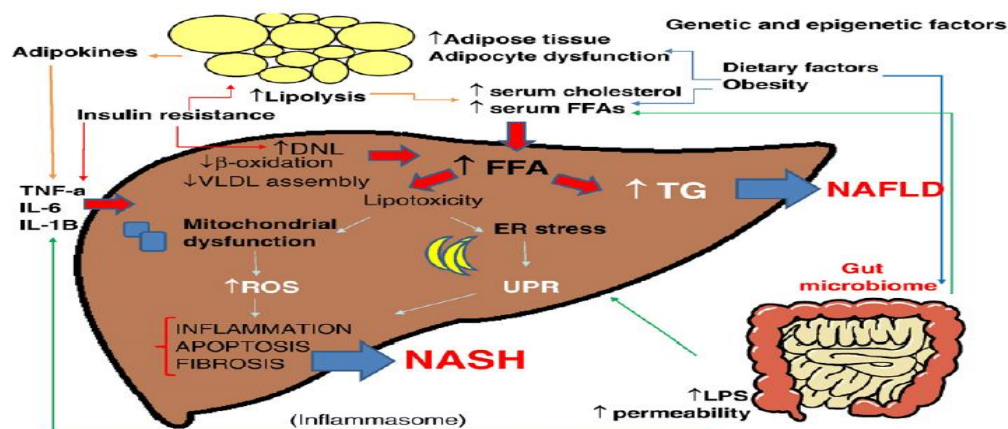


Figura 5. Hipótesis de los golpes múltiples. Abreviaturas: FFAs, ácidos grasos libres; DNL, lipogénesis de novo; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-6, interleucina 6; TG, triglicéridos; ROS, especies reactivas de oxígeno; ER, retículo endoplásmico; LPS, lipopolisacárido; NAFLD, enfermedad del hígado graso no alcohólico; NASH, esteatohepatitis no alcohólica.

2.4.2. Diagnóstico de HGNA

El estándar de oro para el diagnóstico de HGNA es la biopsia hepática; sin embargo, esta es una prueba invasiva y riesgosa, no justificada en la mayor parte de los pacientes. (Buzzetti, 2016) Esto dio origen al desarrollo de algunos estudios de imagen para la identificación no invasiva del HGNA. Entre ellos están el ultrasonido (US), la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Dada su accesibilidad y costo el método más utilizado es el US, este al igual que la TC, identifica depósitos intrahepáticos de grasa superiores al $\geq 30\%$. El US tiene una sensibilidad del 60-94%, y una especificidad del 90%; mientras que la TC tiene una sensibilidad de 82% y una especificidad del 100%. Aunque la RMN identifica depósitos grasos a partir del 3%, con una sensibilidad 88%, no es un método empleado en la práctica clínica cotidiana dada su baja accesibilidad y alto costo. (Graffigna, 2017)

Algunos estudios observacionales han mostrado que en los pacientes con exceso de peso y PFH (Pruebas de función hepática) anormales, que además presenten alguna alteración metabólica como niveles elevados de glucemia y/o triglicéridos en ayuno, o valores bajos de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad bajo (C-HDL), es muy probable que coexista el HGNA. Por lo que esta anormalidad hepática ha sido considerada como la expresión hepática del síndrome metabólico, caracterizado por la presencia de al menos 3 de los siguientes criterios: obesidad abdominal (cintura > 80 cm en mujeres o 90 cm en hombres), hiperglucemia (glucosa de ayuno > 100 mg/dL), colesterol HDL bajo (C-HDL < 40 mg/dL), HTG (hipertrigliceridemia: triglicéridos de ayuno > 150 mg/dL) e hipertensión arterial (tensión arterial sistólica > 130 mmHg o diastólica > 80 mmHG) (Westerbacka, 2004). A diferencia de los pacientes con hígado graso inducido por consumo excesivo de alcohol, en quienes es frecuente observar concentraciones altas de C-HDL e HTG. Respecto a las pruebas de función hepática el HGNA generalmente se asocia con

elevación de AST (aspartato aminotransferasa), mientras que en el hígado graso inducido por alcohol la enzima que se eleva es la ALT (alanina aminotransferasa), como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 1. Diferencias clínicas y bioquímicas entre en hígado graso alcohólico (HGA) y el hígado graso no alcohólico (HGNA)

	HGA	HGNA
Consumo excesivo de alcohol*	↑	↓
Peso corporal	↓→↑	↑↑
Volúmen corpuscular medio	↑	→
ALT	→	↑
AST	↑	→
Relación ALT/AST	<1.0	>1.0
GGT	↑↑	→↑
Glucemia	→	→↑
HDL-colesterol	↑↑	↓
Triglicéridos	↑ó↑↑	↑

Modificado de (Pressi, 2008). *mayor a 20g/día. Alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), y glutamiltransferasa (GGT)

2.4.3 Tratamiento del HGNA.

Tratamiento farmacológico: Como se describió, la resistencia a la insulina juega un papel central en la etiopatogenia del HGNA, por lo que se esperaría que los agentes sensibilizadores a la acción de la insulina, como las glitazonas y la metformina, fueran efectivos para tratar esta anormalidad hepática; sin embargo, su uso no está recomendado. Las glitazonas se encuentran en desuso debido a sus efectos adversos, y aunque hay evidencias en humanos que muestran reducción en el contenido intrahepático de grasa con el uso de pioglitazona, la esteatosis reaparece al abandonar el tratamiento. Los estudios con modelos animales en los que se ha probado el uso de metformina

muestran disminución del HGNA, pero esto no se ha observado en humanos. (Eshraghian, 2017).

El estrés oxidativo, es un factor que perpetúa y agrava el HGNA, el uso de antioxidantes como la vitamina E podría eliminar los radicales libres y prevenir la lipoperoxidación. Aunque algunos estudios *in-vitro* apoyan su uso y ha mostrado resultados alentadores en humanos con distintos estadios de daño hepático, su uso es controversial ya que algunos estudios epidemiológicos han mostrado incremento en la mortalidad total, asociado a un mayor riesgo de infarto cerebral y cáncer de próstata. Por lo su uso debe ser cauteloso e individualizado a las características clínicas de cada paciente y por tiempos cortos de tratamiento. (Azzi, 2016).

La acumulación intrahepática de lípidos (>5%) es per se la definición de HGNA, dentro de los mecanismos responsables de esta anormalidad participa la acumulación de colesterol libre, que es tóxico para las células, por lo que el uso de fármacos hipolipemiantes podría ser de utilidad. Los inhibidores de la hidroxil-metil-glutaril-coenzima A reductasa (estatinas), enzima clave en la biosíntesis del colesterol, han mostrado disminuir la concentración de las enzimas hepáticas y la progresión del HGNA, pero su uso debe ser cauteloso, ya que uno de los efectos adversos de las estatinas es su hepatotoxicidad. Por otro lado, la ezetimiba, es un inhibidor de la absorción intestinal de colesterol; sin embargo, aunque algunos estudios en modelos animales han mostrado que la ezetimiba previene la acumulación intrahepática de lípidos y la resistencia a la insulina, su efecto es controversial en humanos (Mihos, 2014). Los fibratos funcionan como agonistas del receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- α), incrementan la sensibilidad a la insulina, estimulan la oxidación de ácidos grasos y disminuyen la concentración de triglicéridos plasmáticos, por lo que es plausible que este fármaco reduzca el contenido intrahepático de grasa, y aunque su efecto benéfico sobre el perfil metabólico ha sido observado en humanos, no se ha logrado demostrar que disminuya el

contenido intrahepático de grasa (Eshraghian, 2017). Considerando lo anterior, ninguno de estos fármacos es recomendado por las guías de práctica clínica para el tratamiento del HGNA (Eshraghian, 2017).

Cambios en el estilo de vida: Considerando que ningún fármaco ha mostrado ser seguro y eficaz para tratar el HGNA, las modificaciones en el estilo de vida, orientadas hacia la mejora en la calidad y cantidad de nutrimentos consumidos, así como el incremento en la actividad física, son el tratamiento de elección para estos pacientes.

Se ha observado que la disminución del 5% del peso corporal, mantenida a largo plazo (más de un año), disminuye significativamente el contenido intrahepático de grasa (Esper, 2011). La reducción en peso generalmente se fundamenta en la promoción de la actividad física y el consumo de una dieta restringida en calorías; sin embargo, el éxito a largo plazo de este tipo de intervenciones no es bueno, por lo que mejorar la composición de la dieta pudiera ser una mejor alternativa. En el estudio PREDIMED (Estruch, 2013) se observó que el consumo ad libitum de una dieta estilo mediterráneo disminuye de manera importante los eventos cardiovasculares a 5 años, este estudio sirvió como fundamento para intervenir con una dieta similar pacientes con HGNA (Properzi, 2018). La dieta mediterránea tradicional se caracteriza por una alta ingesta de aceite de oliva (rico en grasas monoinsaturadas, semillas como almendras, frutas, legumbres, hortalizas y salmón; así como una baja ingesta de carnes rojas, carnes procesadas y azúcares simples. Por otro lado, evidencias de estudios experimentales que han mostrado que las dietas ricas en ácidos grasos poli-insaturados omega-3 favorecen la sensibilidad a la insulina, reducen el contenido de triglicéridos intrahepáticos y mejoran el HGNA. (Gómez, 2017) Estas evidencias apoyan los hallazgos obtenidos en el estudio con dieta mediterránea en pacientes con HGNA, que mostraron una disminución significativa en el contenido intrahepático de grasa, incluso utilizando una dieta sin restricción calórica. (Properzi, 2018).

El sedentarismo (pasar mucho tiempo sentado) y la actividad física (ejercicio físico), no son recíprocos entre sí. Se ha observado que el sedentarismo es un factor predisponente para el desarrollo del HGNA, independientemente de la actividad física. Por otro lado, la actividad física es un determinante clave del control metabólico y generalmente se recomienda como parte del tratamiento en personas con HGNA (Gómez, 2017). Sin embargo, no se han realizado estudios a gran escala con un adecuado poder estadístico para poder ayudar a los profesionales de la salud en la prescripción de programas de ejercicios. La evidencia del beneficio de la actividad física se fundamenta en estudios prospectivos que muestran que las personas que mantienen un estilo de vida físicamente activo tienen menos probabilidades de desarrollar resistencia a la insulina, intolerancia a carbohidratos o DM2. Aunque el ejercicio tiene poco efecto sobre la sensibilidad a la insulina hepática, mejora la sensibilidad a la insulina periférica, lo que produce una mejora neta en la acción de la insulina (Thomas, 2006). Por otro lado, el incremento en la actividad física reduce significativamente el tejido adiposo visceral, que se vincula directamente con la inflamación del hígado y la fibrosis, independientemente de la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática (Gómez, 2017).

2.5. Ácidos grasos Omega-3

Los ácidos grasos están formados por cadenas monocarboxílicas con un número par de átomos de carbono (12 a 22). Se clasifican en base al número de dobles enlaces presentes en su estructura, como saturados (sin dobles enlaces), mono-insaturados (con un solo doble enlace) o poli-insaturados (con dos o más dobles enlaces) (McKee, 2014). Los ácidos grasos omega 3 son un tipo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA- ω 3), caracterizados por presentar un doble enlace en el tercer átomo de carbono a partir del metilo terminal (figura 6).

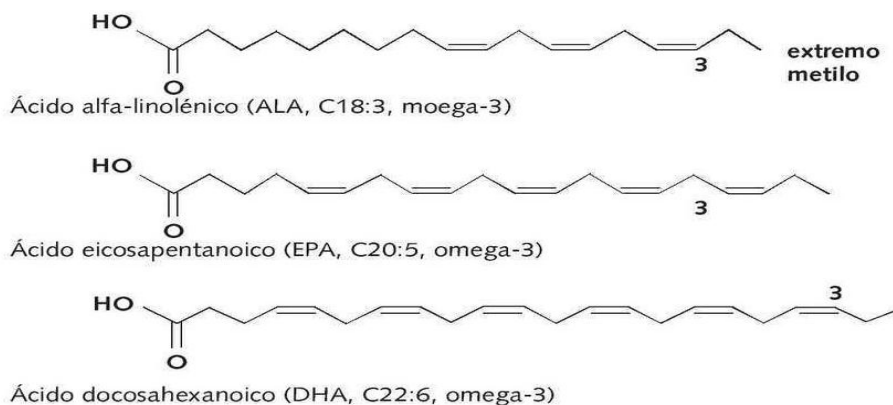


Figura 6. Estructura química de los ácidos grasos poli-insaturados omega-3 (PUFA- ω 3), imagen obtenida de <http://www.elsevier.es>

Los PUFA- ω 3 son componentes importantes de las membranas celulares, ya que le confieren flexibilidad, además de ser precursores de eicosanoides y tromboxanos, elementos que regulan los procesos inflamatorios (Simopoulos, 2002). El ácido α -linolénico (ALA), es considerado como esencial, ya que no puede ser sintetizado por el organismo humano, por lo que debe ser consumido en la dieta, este es precursor del ácido decosohexanoico (DHA) y del ácido eicosapentanoico (EPA). Sin embargo, la bioconversión de ALA a EPA y DHA en humanos es limitada (hasta 5%), debido a que el ALA compite con el ácido linoléico (AL, omega-6) por las desaturasas encargadas de su biotransformación (McKee, 2014), por lo que se recomienda su consumo en la dieta. El ALA se encuentra en alimentos de origen vegetal como el aceite de soya, las nueces, la linaza y la chía; mientras que los alimentos de origen animal como algunas especies de pescado (salmón, trucha y sardina, entre otros) son fuentes ricas en DHA y EPA. (Blond, 1994)

2.5.1. Efecto de los PUFA- ω 3 sobre marcadores de inflamación y RI

La composición de ácidos grasos modula la fluidez de las membranas celulares, eso a su vez modula la acción de los receptores trans-membranales, incluido el receptor de insulina, por lo que se ha observado que los ácidos grasos provenientes de la dieta

modulan la sensibilidad a la insulina y el control metabólico de los pacientes con DM2. El consumo de una dieta hipercalórica, rica en ácidos grasos saturados, se relaciona con resistencia a la insulina, estudios in vitro han mostrado que el ácido palmítico induce daño a la célula beta pancreática. Por otro lado, el consumo de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente de ácido alfa-linolénico ha mostrado mejorar la sensibilidad a la insulina, en pacientes con DM2, lo que probablemente esté asociado con un incremento en las concentraciones de adiponectina.

Algunos estudios epidemiológicos, como el de salud de las enfermeras, han mostrado una asociación negativa y significativa entre la ingesta de ALA y las concentraciones de PCR e IL-6 en plasma. Por otro lado un estudio que evaluó el efecto del consumo de 6–8 g/día de ALA durante 2 años en pacientes con hipercolesterolemia mostró disminución del 12.5% en la concentración sérica de PCR, aunque no hubo cambios en las concentraciones de la fracción soluble de ICAM-1, ni en las interleucinas 6 o 10 (Bemelmans 2004). Otro estudio investigó el efecto del aumento de la ingesta de ALA, al suplementar la dieta de pacientes en hemodiálisis con 40 g/día de linaza molida durante 8 semanas (Khalatbari, 2013). Estos estudios reportan una disminución significativa en las concentraciones de PCR, TNF- α e IL-6 (Khalatbari, 2013, Ristic, 2014). Finalmente, en una revisión sistemática que incluyó 19 estudios se informó que en 9 de ellos se observa disminución de los marcadores inflamatorios al incrementar el consumo de ALA durante 4 semanas o más. (Baker, 2016) Estudios in-vitro han mostrado que los PUFA- ω 3 bloquean la activación del receptor nuclear kappa beta (NF- κ B), responsable de inducir la síntesis de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6), quimiocinas (IL8, MCP-1, MIP-1) y moléculas de adhesión celular (ICAM, VCAM). (Fan, 2013)

2.6. Chía (*Salvia Hispanica*)

La Chía (*Salvia hispánica* L.) pertenece a la familia de las Lamiaceae, esta planta es originaria de México y Guatemala y crece durante el verano. Aunque actualmente su

semilla ha cobrado importancia como complemento alimenticio, ya era de importancia para las culturas mesoamericanas precolombinas especialmente para la cultura azteca. (Sukhneet, 2016) Las semillas presentan propiedades nutricionales importantes para la salud, ya que son una fuente rica en fibra, proteína, calcio, hierro, zinc y antioxidantes, además de contener altos niveles de PUFA- ω 3, especialmente de ALA, gracias a sus propiedades nutrimentales se ha sugerido la semilla de chía podría ser útil en el tratamiento y prevención de enfermedades crónico-degenerativas como DM2, EAC y cáncer. (Petruzzello, 2018)

Tabla 2. Composición nutricional de la semilla de chía

Composición	Cantidad (gr)*
Kcalorías	486
Carbohidratos	42.8
Proteínas	16.6
Fibra	34.4
Lipidos totales	30.7
Omega 3 (ALA)	17.8
Omega 6	5.8
Sodio	19
Calcio	631
Hierro	6.5
Fósforo	600
Potasio	160
Vitamina A	36
Vitamina C	1.6

Información obtenida de United States Department of Agriculture. *por cada 100 gramos de semilla

3-. Planteamiento del problema

El HGNA se presenta en 1 de cada 3 adultos mexicanos, esta anomalía además de ser precursora de cirrosis y carcinoma hepatocelular, es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes y enfermedad arterial coronaria, principales causas de mortalidad en nuestro país. El consumo de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (EPA y DHA), ha mostrado

ser útil en este tipo de pacientes, ya que se asocia con disminución de la resistencia a la insulina y en el estado pro-inflamatorio que caracteriza a esta enfermedad. El efecto de los ácidos grasos omega-3 de origen vegetal (ALA) sobre el HGNA no ha sido analizado en humanos; sin embargo, algunos estudios, en su mayoría en modelos animales, han mostrado mejoras sobre el perfil metabólico en estados de resistencia a la insulina. El consumo de ácidos grasos omega-3 en población mexicana es deficiente, la chía (Salvia hispánica) es un alimento accesible a nuestra población, rico en omega-3, antioxidantes y fibra, por lo que es una opción terapéutica para el manejo del HGNA y las comorbilidades que lo acompañan.

4.- Justificación

Datos de la ENSANUT 2006 (ENSATU 2006) muestran que en población mexicana el consumo de ácidos grasos omega-3 es de tan sólo 0.3 g/día, muy lejos de la ingesta recomendada en adultos (1.2g/día). Estudios previos han mostrado que el consumo deficiente de ácidos grasos omega-3 se asocia con riesgo incrementado de HGNA y mortalidad total. Aunque la pérdida de peso mediante restricción calórica y ejercicio es el tratamiento de elección en pacientes con HGNA, significa un reto para la práctica clínica, por lo que el uso de alimentos funcionales podría tener una aplicabilidad clínica potencial. Dadas sus propiedades nutrimentales, la chía podría ser una alternativa útil capaz de regular la resistencia a la insulina y el estado pro-inflamatorio que caracteriza a los pacientes con HGNA

5.- Pregunta de investigación

¿La suplementación de la dieta con 25 g/día de chía molida durante 8 semanas tendrá efecto sobre la resistencia a la insulina y los marcadores de inflamación, en pacientes con HGNA?

6.-Objetivo general

Evaluar el efecto de una dieta suplementada con 25 g/día de chía molida durante 8 semanas en pacientes con HGNA, sobre resistencia a la insulina y marcadores de inflamación.

7.-Objetivos particulares

- Cuantificar glucosa e insulina en muestras obtenidas en ayuno y durante una curva de tolerancia a carbohidratos, antes y después de 8 semanas de intervención con 25 g/día de chía molida.
- Cuantificar ácidos grasos libres en muestras obtenidas en ayuno, antes y después de 8 semanas de intervención con 25 g/día de chía molida.
- Calcular HOMA-RI (modelo de homeostasis para evaluar resistencia a la insulina), antes y después de 8 semanas de intervención con 25 g/día de chía molida.
- Cuantificar adiponectina, proteína C-reactiva y moléculas de adhesión solubles (VCAM-1 e ICAM-1) en muestras obtenidas en ayuno, antes y después de 8 semanas de intervención con 25 g/día de chía molida

8.-Metodología

Diseño del estudio: Ensayo clínico de un solo grupo, antes y después de tratamiento, en el que se incluirán 40 participantes.

Población objetivo: Sujetos incluidos en el grupo control del estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA).

El estudio GEA, realizado en nuestro laboratorio tuvo como objetivos identificar y analizar las bases genómicas de la EAC, y examinar su relación con factores de riesgo tradicionales y emergentes. Del grupo control se excluyeron los sujetos con historia de trastornos hepáticos, renales, oncológicos, o tiroideos sin tratamiento, y aquellos que estuvieran recibiendo tratamiento con corticoesteroides. Uno de los principales criterios de inclusión fue que el sujeto de estudio y sus dos generaciones previas fueran mestizos

(español-amerindio) nacidos en México, y solo se incluyó un miembro por familia. Todos los participantes firmaron un formato de consentimiento informado aprobado por el Comité de Investigación y Bioética de nuestra Institución. De todos los participantes se obtuvieron muestras de ayuno (10-12 horas), después de 15 min de reposo en posición sedente, en ellas se midió colesterol total, TG y glucosa, en un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD Tokio, Japan), con estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El C-HDL se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania), y el C-LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald modificada por De Long. Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por radioinmunoanálisis (MilliporeCat #HI-14K, Billerica, MA). La RI se evaluó empleando el método del modelo de homeostasis (HOMA-RI).

Población elegible: Participantes del estudio del grupo control GEA que hayan acudido a su visita basal y que cumplan con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión: Diagnóstico tomográfico de HGNA (relación hígado:bazo <1) y RI (HOMA-RI \geq p75 de la población GEA sin alteraciones metabólicas).

Criterios de exclusión: Diagnóstico previo de DM2, tratamiento con fármacos hipoglucemiantes o hipolipemiantes, consumo de suplementos alimenticios que contengan ácidos grasos ω -3, vitaminas liposolubles o complementos vitamínicos ricos en antioxidantes, pérdida de peso > 3 kg durante los últimos tres meses, ingesta $>$ de 20 g/día de alcohol, consumo de fármacos hepatotóxicos.

Intervención: Previa firma de consentimiento informado los participantes fueron instruidos para consumir una dieta isocalórica fase I, de acuerdo con el NECP ATP III (55%, 15% y 30% para hidratos de carbono, proteínas y grasa respectivamente)⁷⁴ durante 2 semanas. Después de este periodo, recibieron instrucciones para consumir durante ocho semanas 25 g de chía molida, el porcentaje de macro nutrientes fue ajustado a las proporciones antes señaladas y a su ingesta calórica habitual. Se instruyó a los participantes para evitar

modificaciones su estilo de vida y el consumo de alguna otra fuente de ácidos grasos ω -3. A cada participante se le proporcionaran 35 paquetes con 25 gramos de chía para un mes de tratamiento y un aditamento para moler la semilla el día de su consumo. Para evaluar el apego al tratamiento, se contó el número de paquetes vacíos devueltos en cada visita, y el apego a la dieta se evaluó mediante un diario de consumo de alimentos de tres días (uno de fin de semana y dos entre semana).

A cada participante se le realizó al menos una llamada semanal para resolver dudas, evaluar posibles efectos adversos (constipación, acidez, diarrea, náusea y alergias) y dar opciones en caso necesario.

8.1. METODOS DE LABORATORIO

Preparación y procesamiento de la muestra sanguínea

Se colectaron muestras de sangre venosa que fueron centrifugadas en frío (20min a 2500rpm) para la obtención de suero y plasma. En muestras frescas se determinó perfil de lípidos, glucosa, química sanguínea y enzimas hepáticas. El resto de suero y plasma fue guardado en alícuotas para su análisis posterior.

Las determinaciones de perfil de lípidos (colesterol total, TG y C-HDL) y la química sanguínea (glucosa, ácido úrico, creatinina) y enzimas de funcionamiento hepático (aspartato amino-transferasa [AST], ALT, GGT y FA) se realizaron en un autoanalizador COBAS c 311, utilizando estuches enzimático-colorimétricos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El C-LDL fue estimado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long. La apoB y apoA-I, fueron cuantificadas por inmuno-turbidimetría en un autoanalizador COBAS c 311, con estuches comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania).

Marcadores de inflamación

La fracción soluble de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, así como la adiponectina, fueron determinadas en suero con estuches comerciales de ELISA (Bender MedSystems, Viena, Austria, cat. No. BMS232 Y BMS 232).

Procedimiento:

1. Las placas de 96 pozos que contiene adsorbido los anticuerpo monoclonal anti-VCAM-1 ó anti-ICAM-1 fueron hidratadas con solución amortiguadore de fosfatos durante 10 min.
2. Se descarta el buffer. Se coloca 90 mcL de diluyente de muestra en cada poso y se colocan 10 mcL de muestra de cada paciente para ICAM. En el caso de VCAM se colocan directamente 10 mcL de muestra de los pacientes.
3. A cada pozo se le agrega 100 mcL de anticuerpo conjugado incluido en el kit y se deja en agitación por 90 min
4. Después de la agitación se le agrega el sustrato (tetrametil-bencidina) que actúa sobre la peroxidasa del anticuerpo conjugado, y se deja en reposo por 30 min en un lugar oscuro.
5. Pasados los 30 min se le agrega una solución *stop* (ácido fosforico 1M) para detener la reacción
6. La placa se lee en un lector de ELISA a 450 nm.
7. Se realizan los cálculos a partir de la curva estándar.

Proteína C Reactiva (PCR)

La proteína C reactiva es principalmente secretada por el hígado en respuesta a la inflamación. Esta molécula se midió mediante inmunonefelometria, técnica basada en la dispersión de luz que se da por la formación de complejos (antígeno-anticuerpo) AG-AC.

Este ensayo se realizará en un autoanalizador BN Pro Spec (Dade Behring Marburg GmbH, Alemania), con anticuerpos comerciales de la misma marca.

Insulina

La determinación de insulina en suero fue medida por inmunoensayo tipo sándwich (ALPCO ELISA Kit ST. Keewaydin Drive, Salem, USA), que se lee espectrofotométricamente a 450nm.

Los ensayos se realizan de la siguiente manera:

1. En una placa de 96 pozos con un anticuerpo monoclonal anti-insulina humana se coloca 25 mcL de muestra de suero
2. A cada pozo se le agrega 100 mcL de anticuerpo conjugado incluido en el kit y se deja en agitación por 60 min
3. Después de la agitación se le agrega un sustrato que actúa sobre la peroxidasa del anticuerpo conjugado, y se deja en reposo por 15 min en un lugar oscuro.
4. Pasados los 15 min se le agrega una solución *stop* para detener la reacción
5. La placa se lee en un lector de ELISA a 450 nm.
6. Se realizan los cálculos a partir de la curva estándar

Curva de tolerancia oral a la glucosa

Para medir la curva de tolerancia a la glucosa a los pacientes se les pidió que asistieran en ayuno de 8-12 hr, posteriormente se les administro una carga de 75 g de sacarosa y se le tomo una muestra basal y cada 30 minutos durante dos horas. La determinación en laboratorio de glucosa se realiza por método enzimático-colorimétrico. Este se basa en la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD), La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada

1. Los reactivos se atemperan a temperatura ambiente
2. En tubos de Eppendorf se coloca 1 mL de reactivo A* y 10 mcg de muestras
3. Se agitan y se dejan incubar a temperatura ambiente durante 10 min
4. Se le a una absorbancia de 500 nm.

*Solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en Buffer Tris 0,92 mol/l

Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres serán determinados mediante ensayos enzimático-colorimétricos, disponibles comercialmente (Wako Diagnostics, USA), en este método los ácidos grasos no esterificados (NEFA) en la muestra se convierten en Acil-CoA, AMP y ácido pirofosfórico (PPi) por la acción de la Acil-CoA sintetasa (ACS), en coexistencia con coenzima A (CoA) y disodio de adenosina 5-trifosfato sal (ATP). La Acil-CoA obtenida se oxida y produce 2,3-trans-Enoil-CoA y peróxido de hidrógeno por la acción de la Acil-CoA oxidasa (ACOD). En presencia de peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno formado produce un pigmento azul púrpura por condensación de oxidación cuantitativa con 3-metil-N-etil-N- (β-hidroxietil) -Anilina (MEHA) y 4-amino-antipirina (4-AA). La concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) se obtiene al medir la absorbancia del color azul púrpura.

9.-Cronograma

	Trimestre					
	18 0				19 I	
	SEPT	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB
Actividad						
Estandarización de métodos	X					

Determinación de moléculas de adhesión y proteína C-reactiva		X	X			
Determinación de insulina y ácidos grasos libres				X	X	
Análisis de resultados y realización del reporte						X

10. Resultados

En este estudio se evaluó el efecto de una dieta isocalórica suplementada con 25 g de chía molida, administrada a 32 pacientes con HGNA. Antes y después de 8 semanas de intervención se evaluaron parámetros dietéticos, antropométricos y el contenido de grasa hepática. En muestra sanguínea de ayuno se cuantificó glucosa, perfil de lípidos, ácidos grasos libres, insulina y marcadores de inflamación. Además, a todos los participantes se les realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa, antes y después de la intervención.

10.1. Características antropométricas

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de las mediciones antropométricas antes y después de la suplementación. Observamos que aunque a los pacientes se les indicó una dieta isocalórica y los recordatorios de dieta mostraron un ligero incremento en la ingesta calórica total (tabla 1), se observó una modesta pérdida de peso, acompañada de la disminución en la grasa abdominal, medida como circunferencia de cintura y disminución en el contenido de grasa intrahepática, expresado como índice de atenuación hígado:bazo (IAH:Bz). Recordando que un IAH:Bz < 1 es un indicador de acúmulo intrahepático de grasa, y que cuando éste es mayor a la unidad indica que el hígado es sano, es decir, sin acúmulo de grasa.

Tabla 1. Características antropométricas.

	Todos n=32		
	Basal	Post-Chía	p*
Peso (Kg)	78.0(69.5-86.3)	76.8(68.0-85.4)	0.001
IMC (Kg/m ²)	29.8(26.8-32.1)	29.7(26.7-31.3)	0.001
Cint (cm)	98.2(91.0-107.6)	95.0(90.0-106.5)	0.000
IAH:Bz	0.89(0.77-0.98)	1.03(0.87-1.12)	0.000

*Los datos se presentan como medianas (rangos intercuartil). Wilcoxon

10.2 Parámetros dietéticos de los pacientes, antes y después del tratamiento con chía

En la tabla 2 se muestran los resultados de los parámetros dietéticos recolectados antes y después de la suplementación con chía. Acorde con la composición nutrimental de la chía, semilla rica en ácidos grasos omega-3 y fibra, observamos un incremento significativo en el consumo de lípidos, mientras el consumo de fibra prácticamente se duplicó ($p < 0.01$, en ambos casos).

Tabla 2. Parámetros dietéticos de los pacientes.

	Todos n=32		
	Basal	Post-Chía	p*
Kcal/día	1439(1279-1737)	1673(1339-1967)	.047
Proteína (%)	20.3(19.0-24.0)	20.7(17.9-22.3)	.141
Lípidos (%)	25.5(22.7-31.1)	30.5(27.4-34.3)	0.005
Carbohidratos (%)	50.9(46.2-56.6)	48.2(44.8-54.5)	0.045
Fibra (g/día)	18.5(13.7-31.8)	30.3(21.4-35.0)	0.0001

*Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. La comparación se realizó mediante una prueba estadística Wilcoxon

10.2 Parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes, antes y después del tratamiento con chía.

En la tabla 3 se muestran resultados de los parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes antes y después del tratamiento, para estas variables únicamente la tensión arterial sistólica (TAS), mostró una reducción significativa, mientras que el resto de las variables permanecieron sin cambios.

Tabla 3. Parámetros clínicos y bioquímicos

	TODOS n=32		
	Basal	Post-Chía	p*
TAS (mmHg)	115.5 (107-124.2)	111.5 (105-116)	0.010
TAD (mmHg)	69.7 (63.5-75.0)	69(63.5-72.5)	0.217
CT (mg/dL)	179.6(164-199)	178(168-190)	0.286
C-noHDL (mg/dL)	141.8 (125.4-158.1)	140.4(124.1-156.4)	0.244
C-HDL (mg/dL)	36.0 (29.7-42.9)	36.2(32.1-40.7)	0.631
TG (mg/dL)	169.9 (110.4-220.5)	152.2(103.2-200.2)	0.793
AU (mg/dL)	6.4 (5.9-7.5)	6.6(5.6-7.8)	0.659
TGO/TGP	0.89 (0.79-0.99)	.84(0.67-1.04)	0.601
GGT (U/L)	31.4 (22.7-47.3)	30.4(24.2-45.6)	0.130

*Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. La comparación se realizó mediante una prueba estadística Wilcoxon

En cuanto a la respuesta a la carga oral de 75g de glucosa, observamos que en la población total únicamente hubo una disminución modesta, pero significativa a los 60 minutos (tabla 4).

Tabla 4. Respuesta a 75g de carga oral de glucosa

	TODOS n=32		
	Basal	Post-Chía	p*
GLUCOSA 0´	99.7(92.5-108.7)	97.5 (92.6-105)	.581
GLUCOSA 30´	174.1(159.8-203.22)	69(63.5-72.5)	0.340
GLUCOSA 60´	179.6(164-199)	178(168-190)	0.005
GLUCOSA 90´	141.8 (125.4-158.1)	140.4(124.1-156.4)	0.501
GLUCOSA 120´	36.0 (29.7-42.9)	36.2(32.1-40.7)	0.184

*Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. La comparación se realizó mediante una prueba estadística Wilcoxon

Al estratificar a la población de acuerdo a su estatus basal de tolerancia a carbohidratos, observamos que mientras los sujetos con tolerancia basal normal, glucosa de ayuno anormal (GAA), o intolerancia a carbohidratos no mostraron respuesta a la chía, o ésta fue solo modesta, la diferencia se hizo evidente entre los sujetos con pre-diabetes (GAA + intolerancia) y más aún entre los sujetos que en su curva inicial, ya tenían diagnóstico de DM (figura 1). Cabe destacar que, aunque dentro de los criterios de exclusión estaba la DM, y en muestra basal ningún participante tuvo valores de glucosa mayores a 125 mg/dL, al realizar la CTOG observamos que únicamente 4 pacientes cursaron con CTOG normal (12.5 %), 9.3% tuvieron GAA, 15.6% intolerancia a carbohidratos, 37% ambas anormalidades (GAA + Intolerancia) y 25% DM. Esto es importante, ya que se ha descrito que la esteatosis hepática es un factor de riesgo que puede predecir la presencia de DM, y observamos que el 87.5% de la población incluida en este estudio cursó con algún grado de alteración en el metabolismo de carbohidratos.

Figura 1. Respuesta a la glucosa

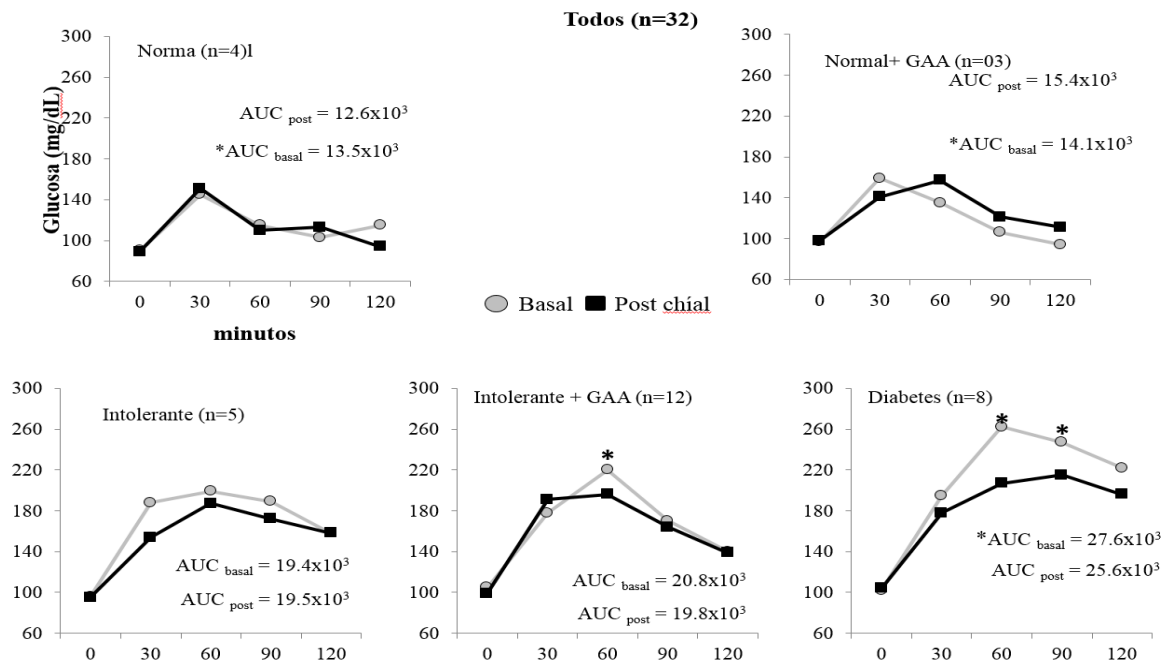


Fig.1 Efecto de la suplementación con chía sobre la respuesta a la glucosa en diferentes grupos. GAA (glucosa de ayuno anormal). Prueba estadística Wilcoxon.

Respecto a la respuesta de la insulina a la carga de glucosa, observamos que, aunque hubo una discreta disminución, particularmente entre los sujetos con pre-diabetes, estos cambios no alcanzaron significado estadístico. Aunque sugieren la utilidad de la chía en la prevención de la progresión a DM (figura 2).

Figura 2. Respuesta a la insulina

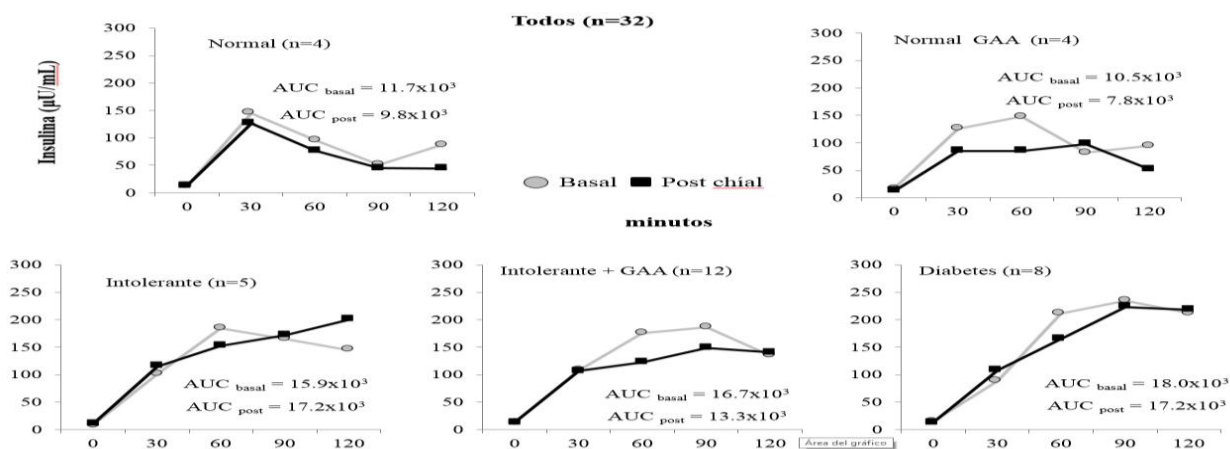


Fig.2 Efecto de la suplementación con chía sobre la respuesta a la insulina en diferentes grupos. GAA (glucosa de ayuno anormal). Prueba estadística Wilcoxon.

10.3 Marcadores de inflamación

La tabla 5 muestra los resultados de los marcadores de inflamación analizados (PCR, ICAM, VCAM y adiponectina). Mientras que PCR ICAM y VCAM no mostraron cambios significativos, ICAM mostró una reducción modesta pero significativa ($p < 0.05$) y adiponectina incrementó significativamente ($p < 0.001$). Ya que la adiponectina es una adipocitocina secretada selectivamente por el tejido adiposo, y los valores bajos indican la presencia de tejido adiposo disfuncional, el aumento en esta molécula sugiere la disminución del estado inflamatorio del tejido adiposo y por lo tanto una mejoría en su funcionamiento, acorde con la disminución en peso y en el contenido de grasa hepática observados después de 8 semanas de intervención con chía.

Tabla 5. Marcadores de inflamación y adiponectina

Todos n=32	
------------	--

	Basal	Post-Chía	p*
PCR	2.3(1.3-3.6)	2.1(1.2-3.9)	0.963
ICAM	147(123-173)	141(127-164)	0.047
VCAM	838(712-1032)	865(753-1018)	0.874
Adiponectina	6.6(5.5-7.9)	8.5(6.8-10.5)	0.001

*Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. La comparación se realizó mediante una prueba estadística Wilcoxon

10.4. Resistencia a la insulina y Ácidos grasos libres

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en las mediciones de resistencia a la insulina y ácidos grasos libres. En el total de la población intervenida observamos que únicamente hubo una disminución significativa en la concentración de ácidos grasos libres, mientras que los índices HOMA-RI, OGIS y el índice insulogénico mostraron disminuciones que no alcanzaron significado estadístico; sin embargo, acorde con los cambios observados en la CTOG, los pacientes que cursaron con DM mostraron una disminución significativa de todos estos parámetros.

Tabla 6. Resistencia a la insulina y AGLibres

	Todos n=32		
	Basal	Post-Chía	p*
HOMA-RI	2.8(1.9-4.7)	3.0(2.2-5.2)	0.178
OGIS	346(318-378)	329(284-371)	0.086
InsIndex	1.2(0.74-2.02)	1.55(0.77-2.36)	0.132
AGL	0.64(0.51-0.79)	0.62(0.49-0.68)	0.045

Modelo de homeostasis para evaluar resistencia a la insulina (HOMA-IR), Sensibilidad oral a la glucosa (OGIS) *Los datos se muestran en medianas y rangos intercuartiles. La comparación se realizó mediante una prueba estadística Wilcoxon ($p < 0.05$)

11. Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir a la chía como una herramienta útil para la intervención de pacientes con HGNA, ya que además de disminuir el contenido intrahepático de grasa, atenúa la inflamación del tejido adiposo, mejora la resistencia a la insulina, y el metabolismo de carbohidratos, particularmente entre los sujetos con pre-diabetes y/o DM. Dada la carencia de intervenciones farmacológicas exitosas en este tipo de pacientes, estos resultados indican que la suplementación con 25g de chía durante 8 semanas, en una dieta sin restricción calórica, puede coadyuvar a disminuir el riesgo cardiometabólico en sujetos con HGNA. Es necesario comprobar estos resultados en un estudio de casos y controles, además de verificar la tolerancia y utilidad a largo plazo del consumo de esta semilla.

13. Referencias

Azzi A, Meydani SN, Meydani M, Zingg JM. The rise, the fall and the renaissance of vitamin E. *Arch Biochem Biophys*. 100-108.

Baker Ella J., Elizabeth A. Miles, Graham C. Burdge, Parveen Yaqoo.(2016). Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans. *Progress in Lipid Research*. 30-56.

Bemelmans WJ, Lefrandt JD, Feskens EJ, van Haelst PL, Broer J, Meyboom-de Jong B,. Increased alpha-linolenic acid intake lowers C-reactive protein, but has no effect on markers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 3–9.

Blond, J. B. (1994). The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *34(6)*, 539–568.

Borrás Gírbés J.(2008), Métodos para la determinación de la sensibilidad a la insulina basados en la sobrecarga oral de glucosa. *Av Diabetol.*; *24(4)*: 296-304

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R. (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;*40(6)*:1387-1395

Buzzetti Elena, Massimo Pinzani. (2015). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism journal*. 65. 1038-1048.

Buzzetti Elena, Lombardi R. (2015). Noninvasive assessment of fibrosis in patient with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism journal*.343-828.

Calder, P. C. (2006). n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83(6)*, 1505S–1519S.

Clària J., Titos E. (2004) La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol*. *27(4)*:264-73

Cusi K. (2009). Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. Clin Liver Dis. 13(5). 45-63.

Domínguez, V. M. (2013). Etiopatología, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Revista Española de Enfermedades Digestivas, 409-420.

Dowman, J. K. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. Q J Med, 71–83.

Esper Carillo Raul, J. M. (2011). Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. Revista de la facultad de medicina de la UNAM, 54(3), 25-46.

ENSATU (Encuesta nacional de salud y nutrición), (2016). Recuperado de http://transparencia.insp.mx/2017/auditoriasinsp/12701_Resultados_Encuesta_ENSANUT_MC2016.pdf.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. N Engl J Med. 2013 Apr 4;368(14):1279-90.

Fan Chaonan, Hylde Zirpoli. (2013). n-3 fatty acids modulate adipose tissue inflammation and oxidative stress. Lipid metabolism and therapy. 16(2), 1363-1950.

Fantuzzi G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 1(15) :911-919

Graffigna Mabel, (2017). Diagnosis of hepatic steatosis using clinical, biochemical and imaging methods, Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo. 54(1).37-46.

Gómez Romero Manuel. (2017). Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. Journal of hepatology. 829-846.

Hubbard SR. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. EMBO J; 16(18):5572-81

Izaola Olatz , Daniel de Luis, Ignacio Sajoux, Joan Carles Domingo, Montserrat Vidal. (2015). Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr Hosp.*31(6):2352-2358

Kahn SE. (2003).The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*; 46: 3–19.

Khalatbari Soltani S, Jamaluddin R, Tabibi H, Mohd Yusof BN, Atabak S, Loh SP.(2013).Effects of flaxseed consumption on systemic inflammation and serum lipid profile in hemodialysis patients with lipid abnormalities. *Hemodial Int*;17:275–81.

Kirpich AI, Marsano LS. (2015).Glut-liver axis, nutrition and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem.* 48(13), 23-30.

Khalatbari Soltani S, Jamaluddin R, Tabibi H, Mohd Yusof BN, Atabak S, Loh SP.(2013). Effects of flaxseed consumption on systemic inflammation and serum lipid profile in hemodialysis patients with lipid abnormalities. *Hemodial Int.* 17(2),75–81.

Lebovits H.E.(2001). Insuline resistance: definition and consequences. *Clin endocrinol diabetes.* 10(9), 135-148.

Manning BD, Cantley LC (2003). AKT/PKB signaling: navigating downstream.*Cell.*129(7):1261-74.

Martínez-Alvarado, M. D. R., Juárez-Rojas, J. G., Medina-Urrutia, A. X., Cardoso-Saldaña, (2014). Association of fatty liver with cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in a Mexican population. *Revista De Investigacion Clinica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutricion*, 66(5), 407–414

Martínez Basila, Azucena, Maldonado Hernández, Jorge, & López Alarcón, Mardia. (2011). Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina en la población pediátrica. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 68(5), 397-404.

Medina-Urrutia A, Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, Jorge-Galarza E, Villarreal-Molina T, González-Salazar Mdel C, Cardoso-Saldaña G, Vargas-Alarcón G, Torres-Tamayo M, Juárez-Rojas JG. Role of adiponectin and free fatty acids on the association between abdominal visceral fat and insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol.* 2015 Feb 10;14:20.

Mihos CG, Pineda AM, Santana O. Cardiovascular effects of statins, beyond lipid-lowering properties. *Pharmacol Res* 2014; 88: 12-19

Neuschwander-Tetri, B. A. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD
OMS (Organización Mundial de la Salud) (2017), *Obesidad y sobrepeso*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>

Pacini G, Maria A. (2003). Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and b-cell function. *Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 17(3), 305-322.

Petruzzello, M. (2018). Chia. In *Encyclopædia Britannica*. Retrieved from <https://bidi.uam.mx:6402/levels/collegiate/article/chia/608333>

Pontiroli AE, Pizzocri P, Caumo A, Perseghin G, Luzi L. Evaluation of insulin release and insulin sensitivity through oral glucose tolerance test: differences between NGT, IFG, IGT, and type 2 diabetes mellitus. A cross-sectional and follow-up study. *Acta Diabetol*. 2004 Jun;41(2):70-6

Properzi C, O'Sullivan TA, Sherriff JL, Ching HL, Jeffrey GP, Buckley RF, Tibballs J, MacQuillan GC, Garas G, Adams LA. Ad Libitum Mediterranean and Low-Fat Diets Both Significantly Reduce Hepatic Steatosis: A Randomized Controlled Trial. *Hepatology*. 2018 Nov;68(5):1741-1754.

Rosales YR. Antropometría en el diagnóstico de pacientes obesos; una revisión. *Nutr Hosp*. 2012;27(6):1803-1809.

Reyes Alberto. (2008). Bases moleculares de la acción de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27 (1). 9-18

Ristic-Medic D, Perunicic-Pekovic G, Rasic-Milutinovic Z, Takic M, Popovic T, Arsic. (2014). Effects of dietary milled seed mixture on fatty acid status and inflammatory markers in patients on hemodialysis. *Sci World J.*563-576.

Rodelo Gutiérrez Citlaly. (2017). Mecanismos moleculares de la Resistencia a la insulina. *Gaceta Medica de México.* 153. 214-228.

Simopoulos. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*, 21(6), 495-505.

Sukhneet, S. S. (2016). Chia seed (*Salvia hispanica*) - A new age functional food. *ICRISEM-16*, 752-762.

Thomas DE, Elliott EJ. (2006). Exercise for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Sys Rev.*

Wallace TM, Levy JC, Mathews DR. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 27:1487-1495

Westerbacka J, Corner A. (2004). Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex difference markers of cardiovascular risk. *Diabetologia.* 47, 1360-1369.

Yamagishi S, Nakamura K, Jinnouchi Y, Takenaka K, Imaizumi T. (2005). Molecular mechanisms for vascular injury in the metabolic syndrome. *Drugs Exp Clin Res.* 31:123-129

Yudkin JS. (2003). Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes*; 27:S25-S28.

.Vo. Bo

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez
No. Económico 17902

Mtra. Aida Xochitl Medina Urrutia
Ced. Prof: 55990263

