



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina  
Departamento de Estudios de Posgrado  
Maestría en Ciencias de la Salud

**“Comparación del efecto en el consumo de EPA y DHA derivados de  
microalgas y pescado en linfocitos de placa de Peyer y bazo”**

## **TESIS**

que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

L.N. Luis Roberto Garatachia Palma

Comité de Tutores

Tutor Académico: Dra. Beatriz Elina Martínez Carrillo

Tutor Interno: Dra. Roxana Valdés Ramos

Tutor Externo: Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna

Toluca, Estado de México

2018

## **Agradecimientos**

Gracias a mi familia, a mis padres y a mis hermanos por apoyarme durante toda la maestría, en cada decisión y proyecto, sin su apoyo esto no sería posible.

Gracias a Alicia por ser el pilar del que me sostengo, por estar en los mejores momentos y también en los más difíciles y por ser el apoyo incondicional y la paz que necesito.

A mis tutoras por mostrarme mis debilidades y ayudarme a corregirlas y por la confianza ofrecida para la realización de esta tesis.

A mis amigos que siempre me tendieron una mano cuando lo necesité.

Gracias a todos, este trabajo es también suyo.

## Índice

1. ANTECEDENTES	7
1.1 Ácidos grasos	7
1.1.1 Ácidos grasos polinsaturados	8
1.1.2 Ácidos grasos omega 3	9
1.1.3. Ácidos grasos omega 3 derivados de pescado	10
1.1.4 Ácidos grasos omega 3 derivados de microalgas	11
1.1.5 Efecto del EPA y DHA en el estrés oxidante	11
1.1.6 Efecto del EPA y DHA en la inflamación	12
1.2 Estrés oxidante	13
1.2.1 Radicales libres	13
1.2.2. Efecto de los radicales libres sobre los lípidos	15
1.2.3 Efectos de los radicales libres sobre las proteínas	15
1.3 Lamina propia	16
1.4. Placas de Peyer	16
1.5. Bazo	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPOTESIS	19
4. OBJETIVOS	20
5. JUSTIFICACIÓN	21
6. MATERIAL Y MÉTODO	22
6.1 Diseño del estudio	22
6.2 Universo de trabajo	22
6.3 Cuidado y manejo de animales de experimentación	22
6.4 Procedimiento	23
6.4.1 Suplementación	23
6.4.2 Índice de masa corporal	23
6.4.3 Obtención y procesamiento de muestra	23
6.5 Operacionalización de Variables	27
6.6 Implicaciones Bioéticas	28
6.7 Recolección De Datos	28
6.8 Análisis Estadístico	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Nombre del artículo	29

7.1.1 Carta de envío	28
7.1.2 Abstract	30
7.1.3 Introduction	30
7.1.4 Materials and methods	31
7.1.5 Results	35
7.1.6 Discussion	37
7.1.7 Conclusions	41
7.1.8 Data Availability	41
7.1.9 Conflicts of interest	42
7.1.10 Funding Statement	42
7.1.11 References	42
8. CONCLUSIONES GENERALES	46
8.1 Conclusiones	46
8.2 Limitaciones	46
8.3 Recomendaciones	46
9.REFERENCIAS	46

## RESUMEN

Los ácidos grasos *n-3* presentan múltiples beneficios para la salud, actúan como antiinflamatorios, antioxidante, previenen la hiperlipidemia, etc. La principal fuente en la dieta humana son los pescados frescos y los suplementos de aceite de pescado, pero actualmente se requieren fuentes alternativas y sustentables para su consumo, como las microalgas marinas; fuente primaria de ácidos grasos polinsaturados. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto antioxidante de un liofilizado de microalgas rico en *n-3*, comparado con un suplemento de aceite de pescado. Material y métodos: Se utilizaron 30 ratones CD1 de 8 semanas de vida suplementados con liofilizado de microalgas y aceite de pescado como fuente de ácidos grasos *n-3*. Resultados: El grupo suplementado con liofilizado de microalgas presentó una tendencia a disminuir la lipoperoxidación en plasma ( $1.57 \pm 0.21$ ) y aumentó significativamente la capacidad antioxidante total en plasma ( $1184.17 \pm 34.9$ ). Conclusiones: Las microalgas pueden ser una alternativa para sustituir el consumo de suplementos de aceite de pescado como agentes antioxidantes e incluso mejorar la capacidad antioxidante, al contener otras sustancias antioxidantes como pigmentos y flavonoides; pero se requieren más estudios, especialmente bajo condiciones de estrés para evaluar su efecto antioxidante real.

## SUMMARY

The *n*-3 fatty acids have multiple health benefits, act as anti-inflammatory, antioxidant, prevent hyperlipidemia, etc. The main source in the human diet are fresh fish and fish oil supplements, but currently alternative and sustainable sources are required for their consumption, such as marine microalgae; primary source of polyunsaturated fatty acids. The objective of the study was to evaluate the antioxidant effect of a lyophilized microalgae rich in *n*-3, compared to a fish oil supplement. Material and methods: We used 30 CD1 mice of 8 weeks of life supplemented with freeze-dried microalgae and fish oil as source of *n*-3 fatty acids. Results: The group supplemented with freeze-dried microalgae showed a tendency to decrease plasma lipoperoxidation ( $1.57 \pm 0.21$ ) and significantly increased the total antioxidant capacity in plasma ( $1184.17 \pm 34.9$ ). Conclusions: Microalgae can be an alternative to replace the consumption of fish oil supplements as antioxidants and even improve antioxidant capacity, containing other antioxidant substances such as pigments and flavonoids; but more studies are required, especially under stress conditions to assess its actual antioxidant effect.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos forman parte de un conjunto de moléculas denominadas lípidos que junto con los hidratos de carbono y las proteínas conforman las tres macromoléculas esenciales en la alimentación de los seres humanos, su estructura característica consiste en una cadena hidrocarbonada, que en un extremo posee un grupo carboxilo mientras que en el otro extremo tiene un grupo metilo. <sup>(1,2)</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el consumo de lípidos en la dieta debe aportar entre el 15% y el 35% de la energía diaria requerida, por lo que su consumo, tanto de fuentes animales como vegetales, es indispensable para mantener un correcto estado de salud; siendo las grasas de origen animal las principales fuentes de ácidos grasos saturados, mientras que los aceites de origen vegetal contienen en mayor proporción ácidos grasos insaturados, ya sean mono o polinsaturados. Además, los ácidos grasos pueden ser también sintetizados dentro de las células, este proceso se realiza por lo general en condiciones de exceso de nutrimentos, ya que al generarse concentraciones elevadas de acetil Coencima A de vías como la glucólisis, las rutas catabólicas se inhiben y el exceso es transformado en ácidos grasos para su almacenamiento en el tejido adiposo. <sup>(2,3)</sup>

Los ácidos grasos pueden ser clasificados de acuerdo a distintos criterios, los más utilizados se derivan del número de carbonos que contenga su cadena o por la presencia o no de dobles enlaces en su estructura. <sup>(3,4)</sup> Por su número de carbonos los ácidos grasos pueden ser clasificados como:

- a) Ácidos grasos de cadena corta: de 4 a 6 carbonos
- b) Ácidos grasos de cadena media: de 8 a 12 carbonos
- c) Ácidos grasos de cadena larga: de 14 a 18 carbonos
- d) Ácidos grasos de cadena muy larga: 20 o más carbonos <sup>(3)</sup>

También se pueden clasificar por la presencia o ausencia de dobles enlaces como:

- a) Ácidos grasos saturados: son aquellos que no presentan dobles enlaces o insaturaciones en su estructura y por lo tanto tienen un mayor número de hidrógenos y una estructura linear.
- b) Ácidos grasos insaturados: Presentan dobles enlaces en algunos de sus carbonos; en algunos casos su cadena puede modificarse a una forma isomérica (cis) de su estructura trans; estos ácidos grasos insaturados a su vez pueden ser clasificados como monoinsaturados cuando tienen un solo doble enlace o polinsaturados cuando presentan más de un doble enlace. <sup>(5,6)</sup>

### **1.1.1. Ácidos grasos polinsaturados**

De acuerdo a los enlaces carbono-carbono los ácidos grasos polinsaturados contienen más de un doble enlace en su estructura, los principales miembros de esta familia son los ácidos grasos *n*-3 y 6, que se nombran así debido a que su primer doble enlace comienza en el carbono 3 o 6 respectivamente, a partir del extremo metilo terminal; son considerados como esenciales, ya que forzosamente tienen que ser consumidos en la dieta debido a que el organismo no cuenta con las enzimas de desaturación requeridas para insertar dobles enlaces después del carbono 9. <sup>(7,8)</sup>

Cumplen con diversas funciones en el organismo, ya sea como fuente de energía, o como parte estructural de la membrana celular para el mantenimiento de la permeabilidad de la misma, además de facilitar los procesos de endocitosis y exostosis, También tienen funciones regulatorias por ejemplo son precursores de eicosanoides antiinflamatorios, los cuales actúan sobre la agregación plaquetaria, regulan la permeabilidad de la membrana célula, el tono muscular, reclutamiento de células del sistema inmunitario y son una parte esencial de la respuesta inflamatoria. Han sido asociados con la disminución de triacilglicéridos plasmáticos al reducir la lipogénesis, aumentan la síntesis de lipoproteínas de alta densidad y por lo tanto disminuyen las concentraciones de colesterol, entre otras. <sup>(9,10)</sup>





Sus acciones en la prevención de enfermedades cardiovasculares se deben principalmente a la de la arterosclerosis, proceso desencadenado por las dislipidemias y la inflamación. Los ácidos grasos *n*-3 han mostrado resultados satisfactorios en estudios tanto en modelos animales como humanos, esencialmente por su efecto en la reducción de las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos, a través de la reducción en la producción de lipoproteínas VLDL, llevando a una menor acumulación de colesterol en los vasos sanguíneos y evitando accidentes vasculares. <sup>(14,15)</sup>

Los efectos antiinflamatorios del EPA y DHA se deben a la competencia con el ácido araquidónico (AA) en la membrana celular, disminuyendo sus concentraciones y por lo tanto reduciendo la producción de las prostaglandinas y leucotrienos, derivados del AA. También el EPA es precursor para la biosíntesis de eicosanoides con efectos marcadamente antiinflamatorios, además de que varios estudios han mostrado una reducción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , con la suplementación de EPA y DHA. <sup>(11,16)</sup>

### **1.1.3. Ácidos grasos *n*-3 derivados de pescado**

La principal fuente de obtención de ácidos grasos *n*-3 (EPA y DHA) en la dieta humana se realiza a partir de productos marinos, particularmente de pescado y de concentrados de aceite de pescado. Las concentraciones de EPA y DHA que contiene cada suplemento o pescado es variable y puede ir desde 1.4g por cada 100 g en el caso del salmón y la anchoa o hasta 19.9 g y 18.8 g por cada 100g en el caso de los concentrados de aceite de salmón y bacalao. <sup>(17,18)</sup>

Se ha observado en distintas poblaciones, especialmente en aquellas que siguen una dieta mediterránea y que tienen un consumo elevado de productos marinos, una baja prevalencia de enfermedades cardiovasculares en comparación con poblaciones con consumos menores; por lo que se ha considerado un elevado consumo de pescado y otros productos marinos como un factor cardioprotector, por sus acciones de unión de fosfolípidos a la membrana celular y estimulación en la producción de óxido nítrico que cumple funciones de vasodilatación. <sup>(18)</sup>

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) el consumo *per cápita* de pescado en el mundo es de 19.2 kg para el año 2012,

pero en México el consumo *per cápita* no rebasa los 12 kg lo cual demuestra una resistencia al consumo de productos marinos. <sup>(19,20)</sup>

#### **1.1.4. Ácidos grasos *n*-3 derivados de microalgas**

Una de las principales fuentes de EPA y DHA de consumo humano es el pescado graso, sin embargo, la pesca indiscriminada y no controlada de pescado lo han vuelto una fuente de ácidos grasos polinsaturados poco sustentable, además de que su producción en masa resulta costosa. Aunado a esto, la presencia de contaminantes químicos como el mercurio en el aceite de pescado, puede ser perjudicial para la salud y los procesos de purificación son complicados y poco eficientes. <sup>(21)</sup>

Actualmente una de las alternativas biotecnológicas para sustituir el consumo de pescado para extraer los ácidos grasos polinsaturados, es el uso de sus productores primarios, es decir, las microalgas que son organismos unicelulares que poseen la maquinaria sintética para la producción de *n*-3, esencialmente de EPA y DHA. <sup>(21,22)</sup>

Algunas de las ventajas que tienen sobre los ácidos grasos polinsaturados de origen animal, es que naturalmente pueden crecer rápidamente bajo una variedad de condiciones de cultivo autótrofos, mixotróficos y heterótrofos, pudiendo presentar una mayor producción en un tiempo más corto y con menores costos de fabricación; además de que presentan características organolépticas más agradables tanto en sabor como olor, en contraste con los *n*-3 de pescado. Por lo que son una opción más aceptable, favoreciendo la extensión de su consumo; también se ha demostrado que en microalgas es mayor la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (>80%) y *n*-3 que en el aceite de pescado (>31%). <sup>(22)</sup>

#### **1.1.5 Efecto del EPA y DHA en el estrés oxidante**

El estudio de sustancias que eviten el daño celular producido por el estrés oxidante ha sido ampliamente difundido y se sabe que algunos nutrimentos como vitaminas y derivados de carotenoides, tienen efectos antioxidantes exógenos, inactivando radicales libres o acentuando la acción de los sistemas de antioxidación endógenos. Uno de los nutrimentos acerca del cual aún no está bien esclarecida su acción sobre la prevención del estrés oxidativo son los ácidos grasos *n*-3, porque aunque se sabe que al ser ácidos grasos polinsaturados son más propensos a la lipoperoxidación

producida por los radicales libres, se podría tomar esta como una ventaja, pues se cree que su efecto antioxidante radica en atrapar a los radicales libres antes de que entren en contacto con la membrana celular dañando los lípidos estructurales. (23,24)

La mayoría de los estudios del efecto de los ácidos grasos *n*-3 sobre el estrés oxidante se han llevado a cabo en células neuronales, donde los resultados han sido controversiales; algunos estudios muestran protección a los efectos de los radicales libres, mientras que otros estudios demuestran una susceptibilidad a la oxidación de las células en presencia de ácidos grasos polinsaturados. (23)

#### **1.1.6. Efecto del EPA y DHA en la inflamación**

Desde hace varios años se ha demostrado que los ácidos grasos polinsaturados, específicamente los ácidos grasos *n*-3, tienen efectos moduladores en los procesos inflamatorios, permitiendo su uso como alternativa de tratamiento para enfermedades inflamatorias crónicas como el asma y desórdenes cardiovasculares. Sus acciones principales se basan en la interrupción de las vías de señalización de NF-Kb y MAPK, lo cual tiene como consecuencia la disminución en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ . (25) Actúan también compitiendo con el ácido araquidónico en las membranas celulares, que en condiciones de inflamación es liberado y transformado a eicosanoides bioactivos por acción de lipoxigenasas o cicloxigenasas, dando como resultado la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos con actividad pro-inflamatoria. Sin embargo, en presencia de EPA Y DHA disminuyen sus concentraciones en la membrana provocando una menor síntesis de eicosanoides inflamatorios. (26,27)

El EPA y DHA también pueden ser utilizados como sustratos para la síntesis de eicosanoides (Figura 2), pero las vías metabólicas que los transforman varían un poco, provocando que los productos finales tengan actividades anti-inflamatorias o cuyo potencial pro-inflamatorio disminuya sustancialmente, dando como resultado procesos inflamatorios menos severos. (28)



Figura 2. Constructo del autor. Mecanismos de síntesis de eicosanoides.

## 1.2. Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como el desequilibrio de las sustancias oxidantes (radicales libres) y los mecanismos antioxidantes endógenos, ya sea por una deficiencia en los mecanismos de alivio del estrés oxidante o por exceso en la producción de sustancias oxidantes. El principio de las reacciones propiciadas por los radicales libres es la óxido-reducción, en la que una molécula oxidante se reduce al ganar electrones de una molécula reductora, pasando ésta a un estado oxidado. De este modo se cambia la estructura molecular de las sustancias reductoras que pueden ser moléculas funcionales del organismo, esto tiene como consecuencia reacciones en cadena, dañando células y tejidos debido a la alteración de la relación estructura-función de las células. Algunas de las causas más comunes del desequilibrio antioxidante-proxidante son el consumo de sustancias nocivas como el tabaco o el alcohol, estado patológicos, exposición a sustancias químicas y el estrés. (29,30,31)

### 1.2.1. Radicales libres

Desde un punto de vista químico los radicales libres se pueden definir como todas aquellas sustancias químicas ya sea con carga o no, con un electrón desapareado en su orbital más externo; esto les confiere una configuración espacial inestable y les da la capacidad de interactuar de manera inespecífica, ya sea con ellos mismos o con

moléculas de la integridad celular (proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos). <sup>(31)</sup>

Los radicales libres se forman de manera cotidiana como parte de las reacciones bioquímicas necesarias para el metabolismo celular, como en la respiración mitocondrial, la cadena de transporte de electrones, la beta oxidación, etc. También participan en reacciones necesarias para el mantenimiento de la homeostasis, como en la degradación de microorganismos por mecanismos de degradación oxidativos en la fagocitosis, favoreciendo la síntesis de biomoléculas como el colágeno o las prostaglandinas e incluso en la activación de enzimas. Los radicales libres son por lo general sustancias de vida media corta y por lo tanto actúan en el sitio o muy cercano al sitio donde se forman. <sup>(31,32)</sup>

Una clase específica de radicales libres son los que se originan a partir del oxígeno; estas son sustancias de bajo peso molecular, que pueden generar otras sustancias que no son consideradas como radicales libres al no tener electrones desapareados, pero que tienen también la capacidad de generar daño celular. A estas moléculas ya sea como radicales libre o sus subproductos de les conoce como especies reactivas de oxígeno (EROs); entre las EROs más comunes se encuentran: <sup>(31)</sup>

- El radical superóxido
- El peróxido de hidrógeno
- El radical hidroxilo
- El oxígeno singlete
- El óxido nítrico

La generación de EROs puede deberse principalmente a 2 mecanismos, ya sea enzimático o no enzimático. En los mecanismos enzimáticos, algunos de los generadores de EROs son la NADPH oxidasa, la mieloperoxidasa, la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, etc. Mientras que para los mecanismos no enzimáticos las reacciones de autoxidación de moléculas como la glucosa o las catecolaminas son importantes. <sup>(30,32)</sup>

### **1.2.2. Efecto de los radicales libres sobre los lípidos**

Uno de los principales blancos de los radicales libres y uno de los que más ha sido estudiado, son los ácidos grasos de la membrana celular, especialmente por la reacción de peroxidación de lípidos que se da sobre los lípidos polinsaturados de la membrana, afectando su funcionamiento y la permeabilidad de la célula. Esta reacción está dada por interacción en la cadena de moléculas de ácidos grasos (polinsaturados) con una ERO que al final de su proceso va a formar una molécula de lípido peróxido y una de ácido graso radical, necesario para la formación de más lípido peróxido generando así tanto productos finales de lipoperoxidación como intermediarios. Estos productos de lipoperoxidación han sido utilizados como marcadores de medición para estrés oxidante, específicamente el malonaldehído (MDA).<sup>(33,34)</sup>

Entre las principales consecuencias de la generación de los productos de lipoperoxidación están la alteración de la permeabilidad e integridad de la membrana celular y el daño estructural de las lipoproteínas que genera desequilibrios en las vías de acarreamiento y movilización de triacilglicéridos y colesterol. Se han relacionado también con enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson, diabetes mellitus tipo 2, Alzheimer, cáncer de próstata y colon, etc.<sup>(35)</sup>

### **1.2.3. Efectos de los radicales libres sobre las proteínas**

Otro de los blancos de los radicales libres en los procesos de estrés oxidante son las proteínas, que al igual que los lípidos, el contacto con una molécula con un electron desapareado, lleva al cambio en su estructura y por lo tanto cambio o pérdida de su función; además de que podría tener consecuencias más severas que la lipoperoxidación al ser moléculas más complejas.<sup>(36)</sup>

Estos procesos de oxidación de proteínas pueden darse por mecanismos irreversibles y reversibles. Los mecanismos irreversibles dependen de la interacción de las proteínas con EROs y metales, suelen ser las más graves ya que en algunos casos se pierde la función para eliminar estas proteínas modificadas por el proteosoma, derivando en su acumulación. Los mecanismos reversibles comprenden la nitración, la ruptura de enlaces peptídicos, y la carbonilación entre otros. Mientras que los procesos irreversibles engloban a la glutationilación y la n-nitrosilación.<sup>(36,37)</sup>

Uno de los marcadores más utilizados para la determinación de daño oxidativo en proteínas es la medición de proteínas carboniladas; estas proteínas se generan por la adición de grupos carbonilo (cetona y aldehído) en su estructura, y el mecanismo de adición puede ser directo o indirecto. Los metales generan la carbonilación directa en los residuos de prolina, lisina, arginina y treonina; mientras que las reacciones secundarias se dan por la interacción de moléculas previamente modificadas por EROs, ya sea en procesos como la lipoperoxidación y la oxidación de azúcares. <sup>(38,39)</sup>

### **1.3. Lámina propia**

La lamina propia forma parte, junto con las placas de Peyer, del tejido linfoide asociado al intestino y cumple con la función de ser el sitio efector de las respuestas inmunitarias en la mucosa intestinal. La lámina propia es un tejido conjuntivo que se encuentra en la primera capa del intestino (mucosa), se encuentra situado entre el epitelio y la *muscularis mucosae*, y junto con la membrana basal, es el encargado además de sus funciones inmunológicas, de dar soporte al tejido epitelial y separarlo de la *muscularis mucosae*. La lámina propia a diferencia de las placas de Peyer es un tejido linfoide difuso que cumple con funciones inmunitarias efectoras, en las que se encuentran principalmente: células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos T y B macrófagos y eosinófilos. <sup>40,41</sup>

La respuesta inmunitaria en la mucosa se lleva a cabo al activar las células B que migraron procedentes de las placas de Peyer hacia la lámina propia, transformándolas en células plasmáticas, a través de las células dendríticas y a su vez las células B activadas comienzan con su proliferación y producción de IgA para comenzar la respuesta contra el agente agresor. <sup>42</sup>

### **1.4. Placas de Peyer**

Las placas de Peyer son una acumulación de tejido linfático presente en la mucosa del intestino, que contiene en su mayoría linfocitos B. Cumplen funciones importantes para mantener la inmunidad pues ayudan a realizar la presentación de antígenos de la luz intestinal, permiten la opsonización de los patógenos por IgG e IgM producidas por los linfocitos B para su posterior presentación por las células presentadoras de



antígeno. Sin embargo todas las inmunoglobulinas pueden ser expresadas, además también cuentan con una gran cantidad de células T CD4+ y macrófagos. <sup>(43, 44)</sup>

Están conformados por 4 regiones:

- a) Folículo
- b) Espacio interfolicular
- c) Un área entre el folículo y el epitelio (cupula)
- d) El epitelio asociado al folículo

Las placas de Peyer se encuentran asociadas a las células M, cuya función es el transporte de los antígenos de la luz intestinal a espacios con células linfoides para permitir su procesamiento y posteriormente poder pasar al bazo, para realizar la presentación de antígeno y comenzar la respuesta efectora. <sup>45, 46</sup>

## **1.5. Bazo**

Es un órgano linfoide secundario que se encuentra encapsulado, se extiende en trabéculas que forman pequeños lobulillos. Posee circulación sanguínea tanto aferente como eferente, pero solo recibe circulación linfoide eferente, ya que el bazo además de cumplir con funciones inmunológicas importantes también funciona como filtro sanguíneo eliminando eritrocitos viejos, por lo tanto se encuentra dividido en a) pulpa roja, la encargada de filtrar la sangre y b) pulpa blanca que posee la función inmunológica, específicamente se lleva a cabo la producción de linfocitos T, B y macrófagos indispensables para realizar la presentación de antígenos. <sup>47,48</sup>

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunos de los daños más comunes al organismo están dados por procesos inflamatorios y oxidativos, ya sea por estadios patológicos o en condiciones normales, diariamente se está expuesto a estímulos que pueden causar un desequilibrio de la homeostasis. Estos efectos se manifiestan en el aumento de las citocinas pro-inflamatorias como lo son la IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  y en el caso del estrés oxidante se manifiesta con daño en las estructuras celulares y ADN que pueden ser factores predisponentes para la aparición de enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, etc.

Por lo tanto la búsqueda de estrategias para prevenir estos procesos es indispensable para garantizar una mejor calidad de vida en la población. Una de las estrategias adoptadas es el aumento en el consumo de ácidos grasos *n*-3, específicamente EPA y DHA, que han demostrado poderosos efectos antiinflamatorios por la interrupción de las vías de síntesis de citocinas pro-inflamatorias o como precursores de moléculas anti-inflamatorias, así como su papel en la prevención del daño de los radicales libres a las membranas de las células.

No obstante, la sobreexplotación de fuentes naturales de obtención de EPA y DHA, ha traído efectos económicos y sobre el medio ambiente, además de que por sus características organolépticas no han sido aceptados ampliamente por la población; por lo que la búsqueda de fuentes alternas y sustentables de obtención de estos ácidos grasos ha llevado a su extracción a partir las microalgas, sus productores primarios.

Sin embargo, la información con respecto a sus efectos sobre marcadores inflamatorios y oxidantes es escasa y no hay estudios que reporten una comparación de los efectos de los EPA y DHA obtenidos de microalgas y los de pescado. Por lo tanto, surge la siguiente pregunta de investigación:

**¿Cuál es el efecto del consumo de EPA y DHA derivados de microalgas comparado con los derivados de pescado en marcadores de estrés oxidante en placas de Peyer y bazo?**

### **3. HIPÓTESIS**

#### **- Hipótesis alterna**

El consumo de ácidos grasos EPA y DHA derivados de microalgas disminuirá los marcadores de estrés oxidante en linfocitos de placa de Peyer y bazo en mayor proporción que los que consumen EPA y DHA derivado de pescado.

#### **- Hipótesis nula**

El consumo de ácidos grasos EPA y DHA derivados de microalgas no disminuirá los marcadores de estrés oxidante en linfocitos de placa de Peyer y bazo en mayor proporción que los que consumen EPA y DHA derivado de pescado.

## **4. OBJETIVOS**

### **General**

Comparar el efecto del consumo de EPA y DHA derivados de microalgas en los marcadores de estrés oxidante de linfocitos de placa de Peyer y bazo con los que consumen EPA y DHA derivados de pescado.

### **Específicos**

- Determinar los marcadores de lipoperoxidación (MDA) y proteínas carboniladas de placas de Peyer y bazo para evaluar el efecto del estrés oxidante entre los grupos suplementados.
- Evaluar las diferencias entre los marcadores de lipoperoxidación (MDA) y proteínas carboniladas de bazo y placas de Peyer para cada grupo de suplementación.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades relacionadas a condiciones como la inflamación y el estrés oxidante van en aumento y las estrategias para prevenirlas o minimizar sus daños son objetivos actuales de los sistemas de salud.

Las modificaciones en la dieta han mostrado efectos benéficos contra diversas enfermedades y se ha observado que el consumo de ácidos grasos *n*-3 puede causar un efecto protector contra los daños propiciados por estadios inflamatorios y de estrés oxidante. Estos ácidos grasos son consumidos principalmente de extractos de aceites de pescado; pero el avance de la tecnología ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas que permiten disponer de estos ácidos grasos directo de las microalgas, que pueden ser utilizados como una alternativa para el consumo de estos nutrimentos al ser una fuente sustentable y renovable, por lo cual es importante conocer los efectos de esta fuente de ácidos grasos.

Se ha observado también que el consumo de pescado en México es deficiente en comparación con la media mundial por lo cual son limitadas las fuentes de consumo de ácidos grasos *n*-3 en la dieta, por lo que es importante encontrar nuevas fuentes de consumo que sean más accesibles y sin depender de la disponibilidad del pescado.

Además de que hacer una comparación entre los efectos de los EPA y DHA de microalgas y pescado proporcionará información valiosa para delimitar las diferencias no solo a nivel organoléptico, sino sobre marcadores biológicos y establecer si realmente ofrecen un beneficio sistémico mayor los ácidos grasos *n*-3 derivados de microalgas al obtenerse de su productor primario.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño del estudio

Experimental, prospectivo, longitudinal.

### 6.2 Universo de trabajo

Se utilizaron 36 ratones CD1 machos de 8 semanas de vida divididos en 6 grupos idénticos n=6: Basal (BS), Control (CL), Croqueta con EPA+DHA (CR), Liofilizado de ácidos grasos (LI), Grasa Saturada (GSAT) y Aceite de pescado (AP).

Grupo n= 6	Intervención
Basal	Sacrificado al inicio del estudio
Control	Sin suplementación
Croqueta	Consumo de croqueta con EPA y DHA
Liofilizado	Suplementado con liofilizado de EPA y DHA derivado de microalgas
Grasa saturada	Suplementado con grasa saturada (aceite de coco)
Aceite de pescado	Suplementado con EPA y DHA de pescado

#### 6.2.1 Cuidado y manejo de animales de experimentación

Los ratones fueron alimentados con dieta para ratón de la marca Rodent Laboratory Chow 5001 de Purina (3.02Kcal/gr), excepto el grupo de croqueta, se les administró la comida y el agua *ad libitum*, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h, se albergaron en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, en jaulas cría ratón de 19 x 29 x 13 cm de acrílico, se realizó registro semanal de ingestión de agua y alimento. Se consideraron las especificaciones de la “NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999”<sup>49</sup> para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

## 6.3 Procedimientos

### 6.3.1 Suplementación.

- a) El grupo CR fue alimentado con una formulación de croquetas igual a las del consumo de los otros grupos de estudio a excepción de su contenido de EPA y DHA de 2.9% en comparación con el 1.9% de la formulación normal.
- b) El grupo LI fue suplementado con liofilizado de EPA y DHA en una dosis diaria de 1mg/g de peso diluido en agua ultrapura y administrado con pipeta por vía oral.
- c) El grupo AP fue suplementado con aceite de pescado (EPA y DHA) con una dosis de 1 mg/g de peso con pipeta por vía oral.
- d) El grupo GSAT fue suplementado con aceite de coco a una dosis diaria de 1 mg/g de peso.

La suplementación inició en la 8ª semana de vida y se llevó a cabo hasta las 16 semanas de vida.

### 6.3. 2 Índice de masa corporal (IMC)

La obtención del índice de masa corporal, se efectuó a partir del peso corporal en gramos y la longitud del cuerpo en cm, con la siguiente formula:

$$IMC= \frac{\text{Peso corporal (g)}}{\text{Longitud del cuerpo}^2 (\text{cm}^2)}$$

La longitud del cuerpo fue medida con una cinta de fibra de vidrio tomando como puntos de referencia la nariz y el ano. Mientras que para la obtención del peso se utilizó una balanza granataria con cesta para ratones (Ohaus, Triple Beam Balance 700 series).<sup>50</sup>

### 6.3.3 Obtención y procesamiento de muestras

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical; los grupos de LI, CR, CL, GSAT y AP a las 8 semanas de tratamiento, mientras que el grupo BS fue sacrificado a las 8 semanas de vida, considerando las especificaciones técnicas para la

producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Se obtuvieron:

1. Linfocitos de Placas de Peyer, lámina propia y bazo para la determinación de proteínas carboniladas como marcador de estrés oxidante.
2. 400 µl de plasma para la determinación de marcadores de estrés oxidante (MDA y capacidad antioxidante) mediante kits comerciales.

#### **Punción cardiaca**

1. Se realizó punción con jeringa previamente eparinizada en ventrículo izquierdo.
2. Movié el embolo hasta obtener de 1 a 1.5 ml de sangre.
3. Se colocó en tubo ependorff.
4. Se centrifugó por 7 minutos a 3000 rpm.
5. Se recuperó 500ul de plasma y congelar a -20° C hasta su procesamiento.

#### **Obtención de linfocitos de placa de Peyer**

1. Una vez obtenidas las placas de Peyer se disgregaron mecánicamente con ayuda de una maya metálica fina y un embolo plano.
2. Se agregó 2 ml de PBS 1x.
3. Se realizó filtrado con organza en un tubo cónico de 15 ml.
4. Se aforó el líquido filtrado a 10ml con PBS 1x.
5. Se centrifugó por 10 minutos a 1500 RPM a 4°C.
6. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante.
7. Se adicionaron 2 ml de PBS 1x y se homogenizó manualmente.
8. Colocar en tubos ependorff de 1.5 ml y guardar hasta su procesamiento.

#### **Determinación de proteínas carboniladas por el método de Dinitrofenilhidrazina**

1. Se homogenizó el tejido en forma mecánica.
2. Se centrifugarón los linfocitos 5 minutos a 3000 RPM.
3. Se colocaron en un tubo de vidrio 50 µl del sobrenadante.
4. Al tubo blanco se le añadieron 450 µl de HCl 10 mM.
5. Al tubo problema se le añadieron 450 µl de DMPH 2.5 M.
6. Los tubos se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad.
7. Las muestras se agitaron vigorosamente (vortex) cada 15 minutos.



8. Después a ambos tubos se le agregó 1 ml de TCA al 10% y se le dio un pulso en el vortex.
9. Se centrifugó 5 minutos a 3000 RPM.
10. Se desechó el sobrenadante y se dejó escurrir el tubo boca abajo en una gradilla con papel absorbente.
11. Se agregaron 1 ml de TCA al 5%.
12. Se disolvió mecánicamente la pastilla con la ayuda de una varilla de vidrio
13. Se centrifugó 5 minutos a 3000 RPM.
14. Se desechó el sobrenadante y se dejó escurrir el tubo boca abajo en una gradilla con papel absorbente.
15. Agregaron 2 ml de la solución de extracción etanol-acetato de etilo (1:1) (v/v). (En la campana, primero se agrega 1 ml de etanol e inmediatamente después 1 ml de acetato etilo y se le da un pulso en el vortex.
16. Se centrifugó 5 minutos a 3000 RPM.
17. En la campana de extracción, se desechó el sobrenadante, y se dejó escurrir el tubo boca abajo en una gradilla con papel absorbente hasta que las pastillas estuvieran perfectamente secas.
18. Los precipitados finales se disolvieron perfectamente (vortex) en 1 ml de Guanidina.
19. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
20. Se leyó en el espectrofotómetro, en ensayo  $\lambda$  a una longitud de onda de 370 nm.

### **Determinación de proteínas mediante técnica de Lowry**

1. Se homogenizó el tejido en forma mecánica.
2. Se centrifugó 15 minutos a 3000 RPM.
3. Se colocó en un tubo de vidrio 50  $\mu$ l del sobrenadante.
4. Se colocó 1 ml de solución de Lowry (Solución cupro-alcalina) la cual se preparó al momento de usarse a una proporción 50:1.
5. Se agitó en vortex.
6. Se incubó por 10 minutos.
7. Se agregaron 100  $\mu$ l de solución Folín 1:1 (v:v total) y se agitó para que no se precipite.
8. Se incubó 45 minutos a temperatura ambiente en los mismos tubos.

9. Se leyó en el espectrofotómetro, en ensayo  $\lambda$  a una longitud de onda de 550 nm.
10. Se restó fondo y se calibró con un tubo con solución de folín.

#### 6.4 Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
Variables independientes					
Tratamiento	Conjunto de medidas que se aplican para aliviar o curar una enfermedad	Tipo de ácido graso al cual el grupo de estudio será sometido: Croqueta 2.9% EPA+DHA (CR) Liofilizado EPA+DHA (LI) Aceite de pescado (AP) Grasa Saturada (GSAT)	Categorica	g (CR) mg/g (LI, AP y GSAT)	ANOVA
Variables dependientes					
Peso	Peso corporal en g	Peso corporal en g	Cuantitativa continua	g	ANOVA
Longitud	Longitud en cm	Longitud en cm del ratón desde la nariz al ano	Cuantitativa continua	cm	ANOVA
IMC	Indicador simple de la relación entre el peso y la talla.	IMC= (Peso corporal en gr)/(longitud del cuerpo cm) <sup>2</sup>	Cuantitativa continua	g/cm <sup>2</sup>	ANOVA
Ingestión de agua	Acción y efecto de consumir agua.	Ingestión semanal de agua por ratón.	Cuantitativa continua	ml/semana	ANOVA
Ingestión de alimento	Acción y efecto de consumir alimento.	Ingestión semanal de alimento por ratón.	Cuantitativa continua	g/sem	ANOVA
Proteínas carboniladas en linfocitos de lámina propia	Biomarcador de estrés oxidante	Presencia de proteínas carboniladas en linfocitos de lámina propia.	Cuantitativa continúa.	Nmol/mg de proteína.	ANOVA
Proteínas carboniladas en linfocitos de las placas de Peyer	Biomarcador de estrés oxidante	Presencia de proteínas carboniladas en linfocitos de placas de Peyer.	Cuantitativa continúa.	Nmol/mg de proteína.	ANOVA
Proteínas carboniladas en linfocitos del bazo	Biomarcador de estrés oxidante	Presencia de proteínas carboniladas en linfocitos de bazo.	Cuantitativa continúa.	Nmol/mg de proteína.	ANOVA
Malonaldehído (MDA)	Producto final de peroxidación lipídica	Presencia de malonaldehído en plasma	Cuantitativa continúa.	mg/dl	ANOVA

## **6.5 Implicaciones bioéticas**

El estudio se llevó a cabo con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## **6.6 Recolección de datos**

Los datos se recabaron en el programa estadístico SPSS v.23 para Windows

## **6.7 Análisis estadístico**

Se realizaron análisis de medidas de tendencia central y de dispersión.

Para la comparación entre grupos de estudio, se realizaron pruebas de ANOVA de una vía.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Nombre del artículo

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

#### Difference between *different fat sources* on lipid peroxidation and oxidant stress markers

Luis R Garatachia-Palma<sup>1\*\*</sup>, Beatriz E. Martínez-Carrillo<sup>1\*</sup>, Roxana Valdés-Ramos<sup>1</sup>, Rosa A. Jarillo-Luna<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Research Nutrition Laboratory, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, C.P. 50180, México.

<sup>2</sup> Coordinación de Morfología, Departamento de Formación Básica Disciplinaria, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, 11340 Ciudad de México, DF, México.

\*\*Fellowship student of CONACyT.

Correspondence should be addressed to Beatriz E. Martínez-Carrillo;  
[martinez\\_elina9@hotmail.com](mailto:martinez_elina9@hotmail.com)

#### 7.1.1 Carta de envío



De **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** para mí ↕

26 oct. ⋮

Dear Dr. Luis Roberto Garatachia-Palma,

This is to inform you that your Research Article titled "Difference between different fat sources on lipid peroxidation and oxidant stress markers" by Beatriz E. Martínez-Carrillo, Luis Roberto Garatachia-Palma, Roxana Valdés-Ramos and Rosa A Jarillo-Luna has been submitted to Oxidative Medicine and Cellular Longevity by Beatriz E. Martínez-Carrillo, and it has been assigned the manuscript number 3098146.

You will be receiving a copy of all the correspondence regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the Manuscript Tracking System.

In order to view the status of your manuscript, we have created an account for you in the journal's Manuscript Tracking System at <http://mts.hindawi.com/>, which you may access after resetting your password using the link below:

[http://mts.hindawi.com/reset\\_password/7667ca22-97f2-4ee4-a7d6-ddb638f8fe6a/](http://mts.hindawi.com/reset_password/7667ca22-97f2-4ee4-a7d6-ddb638f8fe6a/)

Please feel free to contact me with any inquiries you may have.

Best regards,

--

\*\*\*\*\*  
Kalaimathy Karuppiah  
Editorial Office  
Hindawi  
<http://www.hindawi.com>  
\*\*\*\*\*

### 7.1.2 Abstract

Oxidative stress is a negative imbalance between oxidant and antioxidant systems, causing the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the body. The accumulation of ROS, in the long term can trigger the appearance of various pathologies. The *n*-3 fatty acids (EPA and DHA) appear to improve oxidant stress markers. A sustainable alternative of *n*-3 (EPA and DHA), are cultivated microalgae. Its use, would avoid the overexploitation of this resource. In addition, favourable effects have been observed with microalgae derivatives. The aim of this study was to identify the effect of different fat sources on lipid peroxidation and oxidative stress markers. We used 30th 8-week old CD1 mice for 8 weeks and freeze-dried microalgae and fish oil as sources of *n*-3. Lipid peroxidation (MDA), total antioxidant capacity (TAC) and protein carbonylation (CP) were quantified like markers of oxidative stress. The groups supplemented with freeze-dried microalgae and fish oil showed low concentrations of MDA and CP compared with the saturated fat group. On the other hand, the TAC increased significantly in the group supplemented with lyophilized microalgae, which demonstrates its powerful antioxidant effect, even above the fish oil. Greater utilization and antioxidant capacity was observed with the use of lyophilized microalgae, since it reduced lipid lipoperoxidation and direct damage to carbonylated proteins. In addition, they are a sustainable source, compared to fish oil derivatives.

### 7.1.3 Introduction

Oxidant stress is defined as an imbalance between oxidant and antioxidant systems [1], which causes an excess of free radicals, causing alterations in the body's molecules [2]. The accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the body is the cause of diseases such as hypertension, diabetes mellitus, cancer, and Parkinson's [3, 4]. The accumulation of ROS, alters the proteins and lipids, causing the presence of carbonyl groups and lipid peroxidation products [5]. To counteract the damaging effect of the ROS, there are several mechanisms, one of them is the consumption of nutrients that favour the reduction of their concentration and therefore the harmful effect on the organism [6]. A good example of antioxidants are *n*-3 polyunsaturated fatty acids. These have various functions in the body, such as: prevention of vascular accidents, reduction of the pro-inflammatory environment of the vascular endothelium [7, 8], delimitation of the inflammatory process in obesity, increases insulin sensitivity in diabetes mellitus, as well as mobilization of triacilgicerols in liver tissue, reducing the risk of fatty liver disease and oxidative stress [9, 10, 11]. The most important *n*-3 fatty acids are alpha linolenic acid (C18: 3 ALN), eicosapentaenoic acid (C20: 5, EPA) and docosahexaenoic acid (C22: 6, DHA). EPA and DHA, are long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA-CL), both

derived from the ALN precursor [12]. The difference between them is the dietary source, ALN is only present in vegetable organisms of terrestrial origin (seeds and fruits of oilseeds). However, EPA and DHA can be found in both plant organisms (algae and microalgae) and animals of marine origin (fish, crustaceans, shellfish and some mammals) [13]. Therefore, the consumption of sea products (vegetable or animal) is essential to obtain EPA and DHA in adequate concentrations [14]. The *n*-3 fatty acids are essential for the body and must necessarily be obtained from the diet [15], which is why they are called essential fatty acids. Taking into account that most of them are obtained from marine products, such as fresh fish and fish oil concentrates [16], it is necessary to use alternative sources of production, which cover the needs of production and consumption. The above, derived from the high cost in obtaining supplements derived from fish oil [17], therefore, it is necessary to explore new and sustainable sources for obtaining *n*-3 fatty acids, that can be incorporated into the human diet [18, 19]. One of the biotechnological alternatives to replace fish as a source of *n*-3 fatty acids, is the use of marine microalgae; these are unicellular organisms that have the synthetic machinery for the production of *n*-3 fatty acids, essentially EPA and DHA [20, 21, and 22]. They have the advantage of growing rapidly in artificial culture media, which means higher production in a shorter time, with lower manufacturing costs [23, 24]. This represents a profitable, sustainable and adequate source to achieve optimal consumption [25]. The consumption in the diet of *n*-3 fatty acids can be irregular and subjective, since not all sources ensure a homogeneous consumption with the same amount, and depend on variations in diet by season and regionality [26]. Thus, supplementation is a good alternative to achieve the recommended daily intake, particularly of EPA and DHA [27]. The consumption of 250 g of fish per week against 2 g per day of *n*-3 fatty acid supplement improved the lipid profile in patients with hyperlipidemia [28]. In addition, the way to administer it, either as part of the food or in its pure form (oil or lyophilized), may vary the effect of the same in the body, which is why these differences should be evaluated. The aim of this study was to compare intake of *n*-3 fatty acids (EPA and DHA) derived from microalgae or fish oil with different administration forms and their effects on oxidant stress markers.

#### **7.1.4 Materials and methods**

##### *Study design*

This was an experimental, prospective, controlled and randomized study. We used 30 CD1 old mice for 8-weeks, obtained from the bioterium of the Faculty of Medicine, of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), using the Official Mexican NOM-062-ZOO-1999, Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals [29, 30]. The

study was carried out in the Nutrition Research Laboratory, and was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine (UAEM). The animals were housed in individual cages during the experiment, all groups received water *ad libitum* and a normal diet (Rodent Laboratory Chow 5001 of Purina), except the Modified Diet Group (MDG). They were kept under standard temperature conditions (21° C), with light/dark cycles of 12 hours. The consumption of food and water was quantified weekly; the rest of the parameters were determined at the end of 16<sup>th</sup> week old.

#### *Study Groups*

The animals were distributed in 5 groups (n = 6). Supplementation was administered for 8 weeks (from 8th to 16th weeks of age) and distributed as follows: i) Control Group (CG), without treatment, ii) Lyophilized Microalgae Group (LMG), iii) Modify Diet Group (MDG), iv) Oil Fish Group (OFG) and v) Saturated Fat Group (SFG) coconut oil was used as a source of saturated fat.

#### *Obtaining of n-3 Fatty Acids (EPA and DHA) from microalgae.*

The microalgae used in this project were native, collected and isolated by BIOMEX S.A de C.V.; the strains used were from *Chlorophyceae* and *Eustigmatophyceae* families which have a high content of EPA and DHA. The use of this microalgae for such purpose is of recent interest. The process to obtain EPA and DHA was responsibility of BIOMEX S.A de C.V. The percentage obtained of EPA and DHA were 25.7% and were provided as free fatty acids [31].

#### *Supplementation*

Supplementation to the LMG, OFG and SFG groups was administered daily at 8 a.m. by oral deposition with a micropipette, at a dose of 1 mg/g of mouse weight. The lyophilized powder of microalgae with EPA and DHA was reconstituted in 100 µl of distilled water. For the OFG, fish oil of the commercial brand GNC and pure coconut oil of the Sigma Aldrich brand (Cat. No. 8001-31-8) was used for the SFG.

The MDG was fed with a Rodent Chow diet added with microalgae EPA + DHA for total content of 2.0% *n-3* fatty acid which means 10x the original content; Chow was administered *ad libitum* [31], see table 1 and 2.



**Table 1.** Differences in percentage of nutrients between control and modify diet.

	<b>Control Diet</b>	<b>Modify Diet</b>
Carbohydrates	48.7	47.21
Lipids	10.7	12.7
Protein	23.98	23.48
<b>Total Macronutrients</b>	<b>83.38</b>	<b>83.39</b>
Fiber, minerals and vitamins	16.62	16.61
<b>Total diet content</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

Control Diet: Chow 5001 of Purina.

**Table 2.** Distribution of lipids in the control and modify diet.

	<b>Control Diet</b>	<b>Modify Diet</b>
Saturated fatty acids	1.56**	1.41**
Monounsaturated fatty acids	1.60**	1.50**
Polyunsaturated fatty acids	0.19**	0.34**
Cholesterol	200*	201*

\*\*Percentage, ppm (parts per million).

#### *Determination of Body Mass Index (BMI) and glycaemia*

The BMI was determined by quantifying the body weight and nose length of the animal, the following formula was applied:  $[\text{weight (g)/length (cm)}^2 \times 100]$  [32]. Weight was measured using a mouse Triple Beam 700/800 series Ohaus<sup>®</sup>. Blood glucose was determined with a Bayer Contour TS glucometer through tail puncture.

#### *Collection of samples*

After 8 weeks of treatment, the mice were anesthetized with pentobarbital (80 mg / kg of weight), bled by direct cardiac puncture (using a syringe with heparin), and sacrificed by cervical dislocation. Whole blood was used, which was centrifuged for 10 minutes at 2500 rpm to separate the two blood phases. The serum was collected to quantify lipid peroxidation (TBARS), Total Antioxidant Capacity (CAT) and lipid profile (PL). Spleen and small intestine dissection was performed. From the small intestine, Peyer's patches were removed. Lymphocytes were obtained from both tissues.

#### *Obtaining spleen lymphocytes*

The spleen was disintegrated and homogenized in a Petri dish with 3 ml of RPMI solution. The liquid was filtered with a fine mesh to remove the connective tissue and centrifuged for 5 minutes at 2500 rpm. Finally, the erythrocytes were lysed with Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer.

#### *Obtaining Peyer's patches lymphocytes*

Once the small intestine was obtained, the tissue was washed using a plastic cannula with 3 mL of PBS 1x and the Peyer's patches were removed. Peyer's patches were mechanically disintegrated, 2 mL of 1x PBS was added and filtered with a fine mesh to remove the connective tissue. It was adjusted to 10 mL with PBS 1x and centrifuged for 10 minutes at 1500 rpm at 4 ° C. The supernatant was discarded and one mL of PBS 1x was added to the cell button, it was frozen at -70° C until processing.

#### *Lipid Profile determination*

The determination of the lipid profile in plasma of all the groups was carried out. Reagents from Randox's commercial house (Laboratories Ltd, County Antrim, UK) were used. The samples were processed by enzymatic methods: Total Cholesterol (CT), Very Low Density Lipoproteins (VLDL-Cholesterol), High Density Lipoproteins (HDL-Cholesterol) and Low Density Lipoproteins (LDL-Cholesterol) by direct method with elimination of chylomicrons. The triacylglycerols were quantified by enzymatic hydrolysis with lipase. The atherogenic index was obtained with the following formula [total cholesterol (TC)/HDL cholesterol (HDL-c)] [33].

#### *Measurement of oxidant stress parameters*

The concentrations of malondialdehyde (MDA) through the reaction of thiobarbituric acid (TBARS), Total Antioxidant Capacity (TAC) and carbonylated proteins (CP) were determined as oxidative stress parameters in plasma. In the lymphocytes of blood, spleen and Peyer's plates, the concentration of carbonylated proteins present in the cells was quantified.

#### *Lipid peroxidation in plasma (MDA)*

Lipid peroxidation was evaluated by the quantification of malondialdehyde (MDA), using a commercial kit (QuantiChrom™ TBARS Assay Kit DTBA-100), the measurement was made by spectrophotometry at 536 nm.

#### *Total Antioxidant Capacity*

The total antioxidant capacity in plasma was measured through a commercial kit (QuantiChrom™ Antioxidant Assay Kit DTAC-100), the measurement was made by spectrophotometry at 570 nm.

#### *Carbonylated proteins*

The quantification of the carbonylation of proteins in plasma, lymphocytes of blood, spleen and Peyer's patches was carried out with the reaction of 2-4 dinitrophenylhydrazine (2-4 DNPH) in 2-4 dinitrophenylhydrazone in an acid medium when reacting with carbonyl groups, the sample was measured by spectrophotometry at 360 nm [34].

#### *Statistical analysis*

The values are reported in mean and standard deviation. For the comparison between the studies groups, one-way ANOVA tests were performed, with a Bonferroni post-hoc test, the analyses were performed with the statistical program SPSS v 23 for windows.

### 7.1.5 Results

*The SFG mice increased the consumption of food, water and BMI, but did not alter the blood glucose level.*

The food and water consumption of the mice was quantified weekly. The FSG significantly increased their feed intake at the end of week 16 ( $p < 0.015$ ), compared with all groups (Table 3). The water consumption increased in FSG and MLG supplemented mice group ( $p < 0.001$ ), as shown in Table 3, compared with the CG.

In relation to the BMI, a significant increase in the FSG was observed ( $p < 0.001$ ) compared to the CG. In contrast, the groups that received EPA and DHA supplementation (MLG, MDG and OFG) showed a reduction in BMI ( $p < 0.016$ ). The blood glycaemia did not show differences between the treatment groups (Table 3).

**Table 3.** Modifications in the consumption of food, water, BMI, and glucose after EPA and DHA supplementation in CD1 mice.

	CG	MLG	MDG	OFG	FSG	
	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	p Value
Food Consumption (g)	55.5±3.83	51.5±3.8	50.5±1.64	51.5±1.64	58.5 ±3.8	<b>0.001</b>
BMI (g/cm <sup>2</sup> )	3.17±0.256	3.3±0.206	3.37±0.156	3.29±0.181	3.76±0.215	<b>0.001</b>
Glucose (mg/dL)	103±8.68	99±15.1	111±4.88	97±13.1	116±11.8	0.051
Water Consumption (mL)	70.5±4.93	76.5±6.02	73.5±4.93	74.5±4.93	80.5±2.73	<b>0.020</b>

The values express the mean±SD of one determination. One-way ANOVA was performed to determine the differences between the groups, they were considered significant with  $p < 0.05$ . Control Group (CG), Lyophilized Microalgae Group (LMG), Modified Diet Group (MDG), Fish Oil Group (FOG), Saturated Fat Group (SFG), and Body Mass Index (BMI).

#### *Lipid profile*

*The consumption of EPA and DHA modify the lipid profile depending origin source and administration path.*

Triacylglycerols (TG) decreased their concentration in the LMG and MDG groups, compared with the CG group. The CG showed the highest concentration of TG and food consumption compared to the FSG that consumed a lot of food, but the TG were not increased (Table 4). Total Cholesterol (TC) decreased with fish oil supplementation (FOG) ( $p < 0.013$ ), rising in the FSG, compared to CG. The high density lipoprotein (HDL) was significantly diminished in the MDG, and substantially increased with the administration of EPA and DHA in the form of lyophilized (LMG) and saturated fat (FSG) ( $p < 0.020$ ). The low density lipoprotein was

significantly reduced in the FOG, but was higher in the MDG and FSG groups ( $p < 0.039$ ), as shown in table 4.

The very low density lipoprotein (VLDL) was reduced in the groups supplemented with EPA and DHA: FOG, LMG and MDG, and increased in the FSG, in comparison with the CG. The atherogenic index (AI) was calculated in all the groups, being elevated in the MDG, even in greater proportion than the FSG. The lowest AI is observed in the LMG and FOG groups (Table 4).

**Table 4.** Lipid profile of CD1 mice supplemented with EPA and DHA.

	CG	LMG	MDG	FOG	FSG	p
mg/mL	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Value
TG	117±4.8	60±4.6	67.6±4.4	100.8±9.2	98±6.5	<b>0.001</b>
CT	94.5±6	96±6	101±5.8	76.9±3.7	117±10	<b>0.023</b>
HDL	50.3±4.7	57.9±2.8	39.3±4	50.6±3	56.7±3.8	<b>0.015</b>
LDL	20.5±4.6	26±6.3	48±12.8	13.2±1.0	43±8.3	<b>0.017</b>
VLDL	23.2±1.2	12±1.2	13.5±1.17	9.5±0.767	19.7±2.1	<b>0.001</b>
AI	1.8±0.202	1.6±0.279	2.6±0.832	1.5±0.238	2.1±0.440	<b>0.005</b>

The values express the mean  $\pm$  SD of one determination. One-way ANOVA was performed to determine the differences between groups, they were considered significant with  $p < 0.05$ . The values are expressed in mg/dL. Triacylglycerols (TG), Total Cholesterol (TC), High Density Lipoproteins (HDL), Low Density Lipoproteins (LDL), Very Low Density Lipoproteins (VLDL), and Atherogenic Index (AI). Control Group (CG), Lyophilized Microalgae Group (LMG), Modified Diet Group (MDG), Fish Oil Group (FOG), and Saturated Fat Group (SFG).

*The lyophilized microalgae group showed the highest total antioxidant capacity*

The test of malondialdehyde (MDA) in plasma showed that after 8 weeks of treatment, SFG generated a high presence of lipid peroxidation. The groups supplemented with LMG and FOG, decreased the concentrations of MDA compared with the CG (Table 5). In contrast, the total antioxidant capacity (TAC) was substantially reduced in the SFG, with a high response in the LMG.

In addition, the concentration of carbonylated proteins (CP) in plasma and blood, spleen and Peyer's patches lymphocytes, were determined. In plasma, the highest CP concentration was found in the SFG, decreasing in the LMG and MDG groups. SFG increased the concentration of carbonylated proteins in all compartments, whereas LMG and FOG decreased their concentration. The MDG behaved similarly to the CG (Table 5).

**Table 5.** Effect of supplementation with EPA and DHA in lipid peroxidation and total antioxidant capacity in plasma and lymphocytes.

	CG	LMG	MDG	FOG	SFG	
	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	Mean±SD n=6	p value
MDA (mMol/g)	2.06 ±0.404	1.57±0.213	2.08±0.307	1.66±0.396	4.37±0.468	<b>0.001</b>
TAC (Trolrox eq/dL)	1041.7±55	1184±34	1015.6±76	1142.4±77	804.1±26	<b>0.001</b>
Carbonylated proteins (ng/mg of protein)						
Plasma	377±13.2	329±24	350±34	318±24	407±28	<b>0.001</b>
Blood Lymphocytes*	17.5±2.58	15.5±1.69	17.1±2.23	15.2±2.59	20.8±3.26	<b>0.005</b>
Spleen Lymphocytes*	84.8±6.3	72.2±3.7	81.4±8.3	75.1±14.1	91.6±7.8	<b>0.049</b>
PP Lymphocytes*	71.4±1.9	60.2±9.2	90.6±1.7	62.3±3	138.8±7.6	<b>0.001</b>

The values express the mean ± SD of one determination. One-way ANOVA was performed to determine the difference between groups, they were considered significant with  $p < 0.05$ . Malondialdehyde (MDA), Total Antioxidant Capacity (TAC), Peyer's Patches (PP), Control Group (CG), Lyophilized Microalgae Group (LMG), Modified Diet Group (MDG), Fish Oil Group (FOG), and Saturated Fat Group (SFG). \* $1 \times 10^6$  Lymphocytes/mL.

## 7.1.6 Discussion

*The BMI, glycaemia and food consumption were reduced by supplementation with lyophilized of microalgae and fish oil.*

After 8 weeks of supplementation with lyophilized microalgae and fish oil, a reduction in BMI and feed intake was observed compared to the control group. Conversely, the group supplemented with saturated fat, increased the same parameters. The mice in the saturated fat group increased the consumption of food, water and BMI, but did not alter the blood glucose level.

The diets rich in EPA and DHA are beneficial for the body, unlike the diets that contain saturated fat, which cause an increase in the consumption of food and therefore the BMI [35]. These differences have been observed even by mouse species. Sun et.al., reported in C57BL/6J mice a weight gains after consumption of high-fat diets, but in animals supplemented with *n-3* fatty acids showed a reduction in weight and BMI [36]. Guo et.al., obtained similar results in mice fed high-fat diets and supplemented with different combinations of *n-3* [37]. Some studies report an anti-obesogenic effect of *n-3* fatty acids [38, 39], however, there is still no clear evidence that *n-3* derived from microalgae fulfil this function.

The results of this study suggest that EPA and DHA derived from microalgae administered in the form of lyophilized (LMG), reduce feed intake and thus the BMI in a similar way to the *n-3* fish oil derivatives. This situation was not observed in the group that consumed the EPA and DHA added to the chow (MDG), which suggests that the form of administration has influence on the effect of EPA and DHA in the organism. Therefore, the use of EPA and DHA should be recommended as a supplement and ingested prior to the consumption of food, since, at higher

concentration, greater absorption and, therefore, its effectiveness increases. The consumption in the food of EPA and DHA does not provide sufficient concentrations for its use by the body.

This can be explained, since the consumption of EPA and DHA from the diet, necessarily requires a high amount of foods that contain them, since the concentration is so small that it does not favour its correct absorption in the intestine and its antioxidant effect decreases.

In the case of glycaemia, no significant differences were found between the groups. These results are similar to those reported by Haimeur, who conducted a comparative study on cardiovascular risk factors in rats supplemented with *n*-3 derived from fish oil and microalgae [40]. In the study by Gutierrez-Pliego et.al, which compared CD1 and db/db mice supplemented with EPA and DHA derived from microalgae and saturated fats, they found no changes in the concentration of glycaemia [31]. It can be concluded that EPA and DHA derived from microalgae do not participate directly in the modification of this parameter.

*The EPA and DHA consumption modify positively lipid profile.*

Supplementation with *n*-3 has been related to the decrease in the concentration of triacylglycerols, without finding a difference between the derivatives of microalgae and fish oil [41]. However, in this study, a significant decrease in triacylglycerols was observed in the group supplemented with microalgae, even compared to the fish oil derivative. A controversy exists related to the participation of *n*-3 in the metabolic pathways that are activated with this supplementation that causes the reduction of triacylglycerols, by activation of beta-oxidation and a reduction of hepatic lipogenesis [42].

In the same way, a direct relationship has been found between the concentration of triacylglycerols and VLDL [43], which coincides with the results of this study.

The group supplemented with fish oil and microalgae significantly reduced the VLDL concentration compared to the control group. Kinetic studies have been performed with VLDL radiolabels that have shown that *n*-3 fatty acids decrease the synthesis of VLDL [44], as a mechanism that promotes the elimination of triacylglycerols from VLDL and chylomicron particles. Positive regulation of enzymes, such as lipoprotein lipase [45], may be involved in this pathway.

On the other hand, there is evidence that supplementation with EPA and DHA has the capacity to reduce the atherogenic index, as well as total cholesterol and its fractions [46]. This coincides with the results of this study, since it shows reduction of atherogenic index and elevation of HDL with the consumption of lyophilized microalgae and fish oil. This is reflected in the beneficial participation of EPA and DHA in the reduction of cardiovascular risk.

In addition, supplementation with saturated fat presented a high atherogenic index, which translates into an important variable of cardiovascular risk [47]. Surprisingly in the SFG, HDL was elevated. The administration of EPA and DHA in the diet (CG and MDG), elevated TC, LDL and AI, with a reduction of TG, HDL and VLDL; which shows that the route of administration modifies the absorption thereof, rendering greater absorption and bioavailability in the form of lyophilized or pure oil than mixed with other nutrients; a situation that forces it to compete and reduces its absorption surface.

*The lyophilized supplementation group presented the best total antioxidant capacity.*

The use of lyophilized microalgae showed a high TAC, even greater than fish oil. In contrast to the MDG that reduced the TAC, which shows that the lyophilized diluted in water, is the best option of administration, but not the chow. Studies that link TAC to microalgae consumption are scarce, but studies with fish oil consumption indicate that when fish oil supplementation is performed in rats, plasma TAC is increased [48]. In the study by Razavi et.al, an increase in TAC was observed in patients with gestational diabetes supplemented with *n*-3 and vitamin D [49]. In the study by Yaqoob et.al, where healthy subjects were supplemented with fish oil enriched with  $\alpha$ -tocopherol, the activity of the total antioxidant capacity in plasma [50] did not find significant changes. Several authors report that the antioxidant capacity attributed to *n*-3 fatty acids, specifically EPA and DHA, are due to being potent activators of erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) [51, 52, 53] which plays a crucial role in the synthesis of several antioxidant enzymes, thereby increasing their activity, decreasing the action of reactive oxygen species (ROS), and preventing DNA damage [54]. However, this effect should still be studied in different cell types because there are disagreements about the antioxidant enzymes that favour its action.

The increase in total antioxidant capacity in plasma in the group supplemented with EPA and DHA derived from microalgae could be due to the fact that microalgae are also a rich source of natural pigments such as astaxanthin [55] and other carotenoids that are recognized by their antioxidant properties [56], which could increase its effect on free radicals. In the study by Ryckeboesch et.al., where they compared the stability of *n*-3 fatty acids from microalgae against commercial supplements, they showed that *n*-3 derived from microalgae are more stable to oxidation than other supplements; therefore, they are better used by the organism [57]. The lyophilized microalgae reduced the effects of lipid peroxidation in greater proportion than fish oil. The SFG and MDG groups presented a high level of lipid peroxidation. Derived from the above, lipid peroxidation is a point of discussion in studies with supplementation with polyunsaturated fatty acids as some studies show that *n*-3 fatty acids, being less stable are more

prone to lipid peroxidation [58], other authors have observed that *n*-3 fatty acids allow lipid turnover in the cell membrane and therefore decrease cell damage caused by lipid peroxidation [59]. The consumption of EPA and DHA derived from lyophilized microalgae in this case, reduced the levels of molecules with lipid peroxidation, which coincides with the study of Haimeur who supplemented rats with microalgae and showed a decrease in the levels of lipid peroxidation (MDA) in platelets compared against the group fed a high-fat diet [60]. Firat, on the other hand, showed similar results in a model of liver regeneration in rats supplemented with *n*-3 fatty acids [61]. In a study performed in paediatric patients with regular haemodialysis treatment and supplemented with EPA and DHA, no significant differences were observed in the concentration of MDA [62]. However, the lymphocytes of women with hypertension, cultured *in vitro* in media enriched with EPA and DHA, significantly decreased the concentration of MDA when compared to an unenriched medium [63].

*The lyophilized microalgae diminished the carbonylated proteins concentration in lymphocytes.* Protein damage was determined through the quantification of carbonylated proteins. In plasma, groups of fish oil and lyophilized of microalgae reduced the concentration of carbonylated proteins, but CG and MDG significantly increased their concentration. These results are consistent with the study conducted by Méndez et.al, in rats supplemented with EPA and DHA derived from fish oil, where they observed a lower carbonylation of plasma proteins [64]. In patients undergoing dialysis and supplemented with DHA, no alterations were found in protein carbonylation [65]. The consumption of EPA and DHA at different doses, avoids the generation of carbonylated proteins [66], in this study, EPA and DHA were administered in different presentations, lyophilized microalgae, fish oil and mixed in the chow of the animals, which could be the cause of the different effects we observed. In this case, the antioxidant effect of lyophilized microalgae is notorious, even in a greater proportion than fish oil, as well as the poor effect of EPA and DHA added to the chow (MDG) and the almost null effect of these on the normal diet (CG). The evidence of the effect of *n*-3 fatty acids derived from microalgae on the production of carbonylated proteins in plasma is still poor, but the results obtained in this study are encouraging.

In blood, spleen and Peyer's patches lymphocytes, the concentration of carbonylated proteins decreased in greater proportion with the lyophilized microalgae supplementation, followed by FOG. Saturated fat increased the CP concentration, probably due to increased production of ERO's. When comparing the MDG with the CG, there was no difference between the groups, this suggests that the diet is not an adequate route of consumption of EPA and DHA, perhaps due to the variation in the absorption or to modifications of oxide-reduction in the molecules.



However, there is conflicting evidence about the role of *n*-3 in the prevention of protein oxidation in lymphocytes and even on the molecular mechanisms involved. Some authors explore the possibility that *n*-3 have a protective activity to avoid irreversible damage to lymphocyte proteins [67], while others report no differences in protein oxidation in lymphocytes of subjects supplemented with fish oil [68], results with microalgae derivatives are scarce.

Fish oil selectively modulates the carbonylation of body proteins, since the concentration of carbonylated proteins depends on the proportion of EPA and DHA consumed. This was observed in the study by Muñoz S et.al, where the level of carbonylation of each individual protein was modulated by the consumption of marine lipids [69], even though the studies do not show results with microalgae. The content of carbonylated proteins in rats with damage to the hind limb were reduced with the consumption of EPA and DHA compared to the consumption of mineral oil [70].

The effect of EPA and DHA is evident in the cells, since the consumption of these increases its proportion in cell membranes [13], mainly in lymphocytes. This may mean that, the higher consumption, generate higher concentration of these at the level of the cell membranes and therefore the protective effect is greater. This effect is more evident when the supplement is administered pure and alone, than when consumed in the diet. They can therefore be considered protective of the oxidative damage of the cells. In our results, the lymphocytes of the three compartments: blood, spleen and Peyer's patches, showed a protective effect with the consumption of lyophilized microalgae to the damage of proteins.

### **7.1.7 Conclusions**

In conclusion, the consumption of *n*-3, EPA and DHA derived from microalgae can be considered as powerful antioxidants and commercially sustainable compared to fish oil. The best administration route is lyophilized, because it is pure, concentrated and easily absorbed and used. The inclusion of EPA and DHA in the diet, may cause accelerated oxidation and thus the antioxidant effect is nullified, becoming even harmful to the body, perhaps because they are oxidized faster when interacting with other components of the diet, reducing its effect.

### **7.1.8 Data Availability**

The data base used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

### 7.1.9 Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this paper.

### 7.1.10 Funding Statement

This work was supported by Universidad Autonoma del Estado de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

### 7.1.11 References

- [1] R. Thanan, S. Oikawa, Y. Hiraku et.al, “Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.* vol. 16, no. 1, pp. 193–217, 2015.
- [2] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shumabukuro, et.al, “Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome,” *J. Clin. Invest.* Vol.114, no.12, pp 1752-61, 2004.
- [3] S.C. Dyall “Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA,” *Front Aging Neurosci*, vol. 7, no. 52, 2015. doi: 10.3389/fnagi.2015.00052.
- [4] Q. Liu, D. Wu, N. Ni, et.al., “Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect neural progenitor cells against oxidative injury,” *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 5, pp 2341-56, 2014.
- [5] P. Poprac, K. Jomova, M. Simunkova, et.al., “Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases,” *Trends Pharmacol Sci*, vol. 38, no. 7, pp 592-607, 2017.
- [6] M. Rodríguez-Cruz, A.R. Tovar, Del Prado M, and N. Torres, “Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud,” *Rev Invest Clin*, vol. 57, no. 3, pp 457-472, 2005.
- [7] M. Arca, C. Borghi, R. Pontremoli, “Hypertriglyceridemia and omega-3 fatty acids: Their often overlooked role in cardiovascular disease prevention,” *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, vol. 28, no. 3, pp 197-205, 2018.
- [8] C.H.S. Ruxton, S.C. Reed, M.J.A. Simpson, and K.J. Millington, “The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence,” *J Hum Nutr Diet*, vol. 17, no. 5, pp 449-59, 2004.
- [9] G. Sailaxmi and K. Lalitha, “Impact of a stress management program on stress perception of nurses working with psychiatric patients,” *Asian J. Psychiatr.* Vol. 14, pp 42-5, 2015. doi: 10.1016/j.ajp.2015.01.002
- [10] H.N. Siti, Y. Kamisah, and J. Kamsiah, “The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review),” *Vascul Pharmacol*, vol.71, pp 40-56, 2015. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.005.
- [11] H. Sies, “Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine.” *Redox Biol.* Vol. 4, pp 180-3, 2015. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- [12] J. Morales, R. Valenzuela, D. González, et.al., “Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica,” *Rev Chil Nutr*, vol. 39, no. 3, pp 79-87, 2012.
- [13] A. Valenzuela, J. Sanhueza, and R. Valenzuela, “Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal.” *Rev Chil Nutr*, vol. 42, no. 3, pp 306-10, 2015.
- [14] A.-M. Cikoš, S. Jokić, D. Šubarić, and I. Jerković: “Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae,” *Mar. Drugs*, vol.16, no. 348, pp 1-20, 2018. Doi: 10.3390/md16100348.

- [15] R. Valenzuela, G. Tapia, M. González, and A. Valenzuela, "Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas," *Rev Chil Nutr*, vol. 38, no. 3, pp 356-67, 2011.
- [16] R. Arthur, "Omega-3 sources," *J Complement Med*, vol. 8, no. 3, pp 28-32, 2009.
- [17] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), "The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals," Rome, 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/publications/sofia/en/>
- [18] X. Raimann, L. Rodriguez, P. Chavez, and C. Torrejon, "Mercury in fish and its importance in health," *Rev Med Chil*, vol. 142, no. 9, pp 1174-80, 2014. Doi: 10.4067/S0034-98872014000900012.
- [19] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, "Commercial applications of microalgae," *J Biosci Bioeng*, vol. 101, no. 2, pp 87-96, 2006.
- [20] M.L. Hamilton, R.P. Haslam, J.A. Napier, and O. Sayanova, "Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids," *Metab Eng*, vol. 22, pp 3-9, 2014.
- [21] T. Adarme-Vega, D.K.Y. Lim, M. Timmins, et.al., "Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production," *Microb Cell Fact*, vol. 11, 2012. Doi: 10.1186/1475-2859-11-96.
- [22] E. Peltomaa, M.D. Johnson, and S.J. Taipale, "Marine cryptophytes are great sources of EPA and DHA." *Mar. Drugs*. Vol. 16, no. 1, pp E3, 2018. Doi: 10.3390/md16010003.
- [23] W. Zhou, B. Hu, Y. Li, et.al., "Mass cultivation of microalgae on animal wastewater: A sequential two-stage cultivation process for energy crop and omega-3-rich animal feed production," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 168, no. 2, pp 348-63, 2012.
- [24] E. Ryckebosch, C. Bruneel, K. Muylaert, and I. Foubert, "Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids," *Lipid Technol*, vol. 24, no. 6, pp 128-130, 2012.
- [25] T.C. Adarme-Vega, S.R. Thomas-Hall, and P.M. Schenk, "Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 26, pp 14-8, 2014.
- [26] B.J. Meyer, N.J. Mann, J.L. Lewis, et.al, "Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids," *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp 391-8, 2003.
- [27] H.M. Vidgren, J.J. Ågren, U. Schwab, et.al., "Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men," *Lipids*, vol. 32, no. 7, pp 697-705, 1997.
- [28] M.J. Zibaenezhad, M. Ghavipisheh, A. Attar, and A. Aslani, "Comparison of the effect of omega-3 supplements and fresh fish on lipid profile: A randomized, open-labeled trial," *Nutr Diabetes*, vol. 7, no. 12, pp 1-8, 2017. Doi: 10.1038/s41387-017-0007-8.
- [29] A. Aluja, "Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana," *Gac Méd Méx*, vol. 138, no. 3, pp 295-98, 2002.
- [30] L. Ochoa, "Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio," *Nom-062-Zoo*. 1999.
- [31] L.E. Gutiérrez-Pliego, B.E. Martínez-Carrillo, A.A. Reséndiz-Albor, et.al., "Effect of Supplementation with n -3 Fatty Acids Extracted from Microalgae on Inflammation Biomarkers from Two Different Strains of Mice," *J. Lipids*, 2018.
- [32] E.L. Novelli, Y.S. Diniz, C.M. Galhardi, et.al, "Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats," *Lab Anim*, vol. 41, no. 1, pp 111-9, 2007.
- [33] A.S. Adekunle, J.O. Fatoki, and T.I. Adelusi, "Antihyperlipidemic and antiatherogenic activity of simvastatin may involve modulation of the expression of lecithin: Cholesterol acyl transferase," *Acta Biochim Pol*, vol. 60, no. 4, pp 579-83, 2013.

- [34] B. E. Martínez-Carrillo, R. A. Jarillo-Luna, R. Campos-Rodríguez, R. Valdés-Ramos, and V. Rivera-Aguilar, "Effect of Diet and Exercise on the Peripheral Immune System in Young Balb/c Mice," *BioMed Res Int*, 2015.
- [35] P. Janovská, P. Flachs, L. Kazdová, and J. Kopecký, "Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis," *Physiol Res*, vol. 62, no. 2, pp 153-61, 2013.
- [36] D. Sun, L. Zhang, H. Chen, R. Feng, P. Cao, and Y. Liu: "Effects of Antarctic krill oil on lipid and glucose metabolism in C57BL/6J mice fed with high fat diet." *Lipids Health Dis.* vol. 16, pp. 218, 2017. Doi: 10.1186/s12944-017-0601-8.
- [37] X. fei Guo, A.J. Sinclair, G. Kaur, and D. Li: "Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, pii: S0952-3278(17)30120-5, 2017. Doi: 10.1016/j.plefa.2017.09.011.
- [38] L. Martinez-Fernandez, L.M. Laiglesia, A.E. Huerta, et.al., "Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome," *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, vol. 121, no. Pt A, pp 24-41, 2015. Doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.07.003.
- [39] T. Belchior, V.A. Paschoal, J. Magdalon, et.al., "Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent actions." *Mol Nutr Food Res*, vol. 59, no. 5, pp 957-67, 2015.
- [40] A. Haimeur, V. Mimouni, L. Ulmann, et.al., "Fish Oil and Microalga Omega-3 as Dietary Supplements: A Comparative Study on Cardiovascular Risk Factors in High-Fat Fed Rats," *Lipids*, vol. 51, no. 9, pp 1037-49, 2016.
- [41] K.C. Maki, K. Yurko-Mauro, M.R. Dicklin, et.al., "A new, microalgal DHA- and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 91, no. 4, pp 141-8, 2014.
- [42] W.S. Harris and D. Bulchandani, "Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?," *Curr Opin Lipidol*, vol. 17, no. 4, pp 387-93, 2006.
- [43] G.C. Shearer, O.V. Savinova, and W.S. Harris, "Fish oil -- how does it reduce plasma triglycerides?," *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1821, no. 5, pp 843-51, 2012.
- [44] E. Ros and J.C. Laguna, "Tratamiento de la hipertrigliceridemia: Fibratos frente ácidos grasos omega-3," *Rev Esp Cardiol*, vol. 6, no. Supl D, pp 52-61, 2006.
- [45] H.E. Bays, A.P. Tighe, R. Sadovsky, and M.H. Davidson, "Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: Physiologic mechanisms of action and clinical implications," *Expert Rev Cardiovasc Ther*, vol. 6, no. 3, pp 391-409, 2008.
- [46] P.N. Gondim, P.V. Rosa, D. Okamura, et.al, "Benefits of fish oil consumption over other sources of lipids on metabolic parameters in obese rats," *Nutrients*, vol. 10, no. 1, pp E65, 2018. Doi: 10.3390/nu10010065.
- [47] J.A. Nettleton, I.A. Brouwer, J.M. Geleijnse, and G. Hornstra, "Saturated Fat Consumption and Risk of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke: A Science Update," *Ann Nutr Metab*, vol. 70, no. 1, pp 26-33, 2017.
- [48] H. Erdogan, E. Fadillioglu, S. Ozcocmen, et.al., "Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats," *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, vol. 71, no. 3, pp 149-152, 2004.
- [49] M. Razavi, M. Jamilian, M. Samimi, et.al., "The effects of vitamin D and omega-3 fatty acids c supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in patients with gestational diabetes," *Nutr Metab*, vol. 14, pp 80, 2017.
- [50] P. Yaqoob, H.S. Pala, M. Cortina-Borja, et.al, "Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions." *Eur J Clin Invest*, vol. 30, no. 3, pp 260-74, 2000.

- [51] C.L. Saw, A.Y. Yang, Y. Guo, and A.N. Kong, "Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway," *Food Chem Toxicol*, vol. 62, pp 869-75, 2013. Doi: 10.1016/j.fct.2013.10.023.
- [52] C.H. Tsai, Y.C. Shen, H.W. Chen, et.al, "Docosahexaenoic acid increases the expression of oxidative stress-induced growth inhibitor 1 through the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in breast cancer cells." *Food Chem Toxicol*, vol. 108, no. Pt A, PP 276-288, 2017.
- [53] E. Zgórzyńska, B. Dziedzic, A. Gorzkiewicz, et.al., "Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve the antioxidative defense in rat astrocytes via an Nrf2-dependent mechanism," *Pharmacol Rep.* vol. 69, no. 5, pp 935-42, 2017.
- [54] C. Sakai, M. Ishida, H. Ohba, et.al., "Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells," *PLoS One*, vol. 12, no. 11, pp e0187934, 2017. Doi: 10.1371/journal.pone.0187934.
- [55] J.P. Yuan, J. Peng, K. Yin, and J.H. Wang, "Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae," *Mol Nutr Food Res*, vol. 55, no. 1, pp 150-65, 2011.
- [56] Y. Lemoine and B. Schoefs, "Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress," *Photosynth Res*, vol. 106, no. 1-2, pp 155-77, 2010.
- [57] E. Ryckebosch, C. Bruneel, R. Termote-Verhalle, "Stability of omega-3 LC-PUFA-rich photoautotrophic microalgal oils compared to commercially available omega-3 Lc-PUFA oils." *J Agric Food Chem*, vol. 61, no. 42, pp 10145-55, 2013.
- [58] E. Giordano and F. Visioli, "Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions." *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, vol. 90, no. 4, pp 1-4, 2014.
- [59] M. Moloudizargari, E. Mortaz, M.H. Asghari, et.al, "Effects of the polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA, on hematological malignancies: a systematic review," *Oncotarget*, vol. 9, no. 14, pp 11858-11875, 2018.
- [60] A. Haimeur, L. Ulmann, V. Mimouni, "The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats," *Lipids Health Dis*, vol. 11, pp 147, 2012. doi: 10.1186/1476-511X-11-147.
- [61] O. Firat, O. Makay, L. Yeniay, et.al., "Omega-3 fatty acids inhibit oxidative stress in a rat model of liver regeneration," *Ann Surg Treat Res*, vol. 93, no. 1, pp 1–10, 2017.
- [62] A.M. Ateya, N.A. Sabri, I. El Hakim, and S.M. Shaheen, "Effect of Omega-3 Fatty Acids on Serum Lipid Profile and Oxidative Stress in Pediatric Patients on Regular Hemodialysis: A Randomized Placebo-Controlled Study," *J Ren Nutr*, vol. 27, no. 3, pp 169–174, 2017.
- [63] F.Z. Baba Ahmed, S. Bouanane, H. Merzouk, and N. Soufi: "Effect of N-3 polyunsaturated fatty acids on the modulation of T lymphocytes in vitro and redox status in obese women with hypertension," *Ann Cardiol Angeiol*, vol. 65, no. 3, pp 126-30, 2016.
- [64] L. Méndez, M. Pazos, J.M. Gallardo, et.al, "Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine  $\omega$ 3 PUFAs," *Free Radic Biol Med*, vol. 55, pp 8-20, 2013.
- [65] J. Himmelfarb, S. Phinney, T.A. Ikizler, et.al, "Gamma-Tocopherol and Docosahexaenoic Acid Decrease Inflammation in Dialysis Patients," *J Ren Nutr*, vol. 17, no. 5, pp296-304, 2007.
- [66] R.C. Wander and S.H. Du, "Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids," *Am J Clin Nutr*, vol. 72, no. 3, pp 731–737, 2000.
- [67] M. Oarada, T. Gono, T. Tsuzuki, et.al, "Effect of Dietary Oils on Lymphocyte Immunological Activity in Psychologically Stressed Mice," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 71, no. 1, pp 174-82, 2007.
- [68] R. Otton, D.P. Marin, A.P. Bolin, et.al, "Combined fish oil and astaxanthin supplementation modulates rat lymphocyte function." *Eur J Nutr*, vol. 51, no. 6, pp 707-18, 2012.

[69] S. Muñoz, L. Méndez, G. Dasilva, et.al., “Targeting Hepatic Protein Carbonylation and Oxidative Stress Occurring on Diet-Induced Metabolic Diseases through the Supplementation with Fish Oils,” *Mar Drugs*, vol. 16, no. 10, pp E353, 2018. Doi: 10.3390/md16100353.

[70] G.N. Marzuca-Nassr, K.F. Vitzel, L.G. De Sousa, et.al., “Effects of high EPA and high DHA fish oils on changes in signaling associated with protein metabolism induced by hindlimb suspension in rats.” *Physiol Rep*, vol. 4, no. 18, pp e12958, 2016.

## **8. CONCLUSIONES GENERALES**

### **8.1 Conclusiones**

Los ácidos grasos *n*-3 derivados de las microalgas se presentan como una alternativa al uso de *n*-3 de fuentes marinas, presentando características antioxidantes benéficas similares en sujetos sanos, especialmente frente a aquellos suplementados con grasa saturada.

### **8.2 Limitaciones**

A pesar de que se demostró un efecto antioxidante similar en ratones sanos, no se puede saber con certeza si bajo condiciones de estrés físico y metabólico los *n*-3 van a mantener su actividad antioxidante o si se puede ver afectada su función por el aumento de la lipoperoxidación característica en condiciones de altas concentraciones de moléculas oxidantes.

### **8.3 Recomendaciones**

Es importante realizar estudios con sujetos en condiciones que comprometan el equilibrio oxidante/antioxidante para conocer si existen cambios significativos sobre *n*-3 de diferentes fuentes.

## **9. REFERENCIAS**

1. Aguilera García C, Artacho Martín-Lagos R, Burgos Peláez R. Tratado de nutrición. 2° ed. Madrid: Panamericana. 2017:364.
2. FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición. 2008: 23-80.
3. Mathews C, Van Holde KE, Applin D. Bioquímica. 4° ed. Madrid: Pearson educación. 2013: 360-362.

4. Mataix Verdú F, Gil A. Libro blanco de los Omega-3. 4th ed. Madrid: Panamericana; 2004: 154.
5. Carrillo Fernández L, Dalmau Serra J, Martínez Álvarez J, Solà Alberich R, Pérez Jiménez F. Grasas de la dieta y salud cardiovascular. Aten Primaria. 2011; 43(3):157.e1-157.e16.
6. Rodríguez Cruz M, Tovar Armando R, del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. Rev invest clín. 2005; 57(3): 457-472.
7. Morales E. Acidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la nutrición del lactante. Rev Hosp Mat Inf Ramón Sardá. 1994;13(2): 73-75
8. Ronayne de Ferrer P. Importancia de los ácidos grasos saturados en la alimentación del lactante. Arch argen Pediatr. 2000; 98(4) 231-238
9. López M, Cárdenas DL, Quintero Laverde JN. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la alimentación del lactante: cuantificación de éstos en algunas fórmulas lácteas para bebés de 0 a 6 meses, comercializadas en la ciudad de Medellín, 2012. Rev Salud Publica (Bogota). 2014; 32(3):322-331.
10. Bourre JM. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. J Nutr Health Aging. 2004; 8(3):163-74.
11. Valenzuela B R, Tapia O G, González E M, Valenzuela B A. Ácidos grasos omega-3 (epa y dha) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. Rev Chil Nutr. 2011; 38(3):356-367.
12. Valenzuela BR, Morales IG, González AM, Morales PJ, Sanhueza CJ, Valenzuela BA. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 y enfermedad cardiovascular. Rev Chil Nutr. 2014; 41(3):319-327.
13. Kalupahana N, Claycombe K, Newman S, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N et al. Eicosapentaenoic Acid Prevents and Reverses Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice via Modulation of Adipose Tissue Inflammation. J Nutr. 2010; 140(11):1915-1922.
14. Bowen K, Harris W, Kris Etherton P. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Are There Benefits? Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2016; 18(11): 69.
15. Husson M, Ley D, Portal C, Gottrand M, Hueso T, Desseyn J et al. Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids. J Infect. 2016; 73(6):523-535.

16. Leghi G, Muhlhausler B. The effect of n-3 LCPUFA supplementation on oxidative stress and inflammation in the placenta and maternal plasma during pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016; 113:33-39.
17. Castellanos TL, Rodriguez DM. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. *Rev Chil Nutr*. 2015; 42(1):90-95.
18. Nasiff Hadad A, Meriño Ibarra E. Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado. Lo bueno y lo malo. *Rev cubana med*. 2003; 42(2): 128-133.
19. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010 Roma. 2014: 1-219.
20. SAGARPA. Comunicado de prensa Aumenta México en 2.5 kilos consumo per cápita en pescados y mariscos. 2015: NUM. 413/15
21. Adarme Vega T, Lim D, Timmins M, Vernen F, Li Y, Schenk P. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb Cell Fact*. 2012; 11(1):96.
22. Go R E, Hwang K A, Park G T, et al. Effects of microalgal polyunsaturated fatty acid oil on body weight and lipid accumulation in the liver of C57BL/6 mice fed a high fat diet. *Biomed Res*. 2016; 30(3):234-242.
23. Cehreli R, Akpınar H, Artmann A, Sagol O. Effects of Glutamine and Omega-3 Fatty Acids on Erythrocyte Deformability and Oxidative Damage in Rat Model of Enterocolitis. *Gastroenterology Res*. 2015; 8(5):265-273.
24. Mazereeuw G, Herrmann N, Andreazza A, Scola G, Ma D, Oh P et al. Oxidative stress predicts depressive symptom changes with omega-3 fatty acid treatment in coronary artery disease patients. *Brain Behav Immun*. 2017; 60:136-141.
25. Kalupahana N, Claycombe K, Newman S, Stewart T, Siriwardhana N, Matthan N et al. Eicosapentaenoic Acid Prevents and Reverses Insulin Resistance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice via Modulation of Adipose Tissue Inflammation. *J Nutr*. 2010; 140(11):1915-1922.
26. Riediger N, Othman R, Suh M, Moghadasian MA. Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *J Am Diet Assoc*. 2009;109(4):668-679.
27. Khaddaj Mallat R, Morin C, Rousseau É. Novel n-3 PUFA monoacylglycerides of pharmacological and medicinal interest: Anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Eur J Pharmacol*. 2016; 792:70-77.
28. Coronado Herrera M, Vega y León S, Gutiérrez Tolentino R, García Fernández B, Díaz González G. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *REB*. 2006;25(3): 72-79.



29. Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil.* 2002; 31(2): 126-133.
30. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016; 360(1):201-205.
31. Calderón Salinas J V, Muñoz Reyes E G, Quintanar Escorza M A, Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev educ bioquím.* 2013; 32(2): 53-66.
32. K. Koltover V. Free Radical Timer of Aging: from Chemistry of Free Radicals to Systems Theory of Reliability. *Curr Aging Sci.* 2017; 10(1):12-17.
33. Membrillo Ortega A, Córdova Izquierdo A, Hicks Gómez JJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *Interciencia.* 2003; 28(12): 699-704.
34. Clapés S, Torres O, Companioni M. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2001; 20(2): 93-98.
35. Pospíšil P, Yamamoto Y. Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochim Biophys Acta.* 2017; 1861(2):457-466.
36. Ahmad S, Khan H, Shahab U, Rehman S, Rafi Z, Khan MY, et.al. Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front Biosci.* 2017; 9:71-87.
37. Madian A, Regnier F. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *J Proteome Res.* 2010; 9 (8):3766-3780.
38. Membrillo-Hernández J, Díaz Acosta AE. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2006; 9: 34-44.
39. Irazusta V, Moreno Cermeño A, Ros J, Tamarit J. Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. *Proteomica.* 2008; 2: 51-58.
40. Zaldívar Ochoa M. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2002; 8: 352–354.
41. Ferrufino JC, Taxa L, Angeles G. Histología normal del intestino delgado. *Rev Medica Hered.* 1996;7(1):46–57.
42. Ramos A, Guapillo MRB, López Monteon A. La inmunología de las mucosas. *La Ciencia y el Hombre.* 2008; 2 (21):19-24.
43. Zambrano Villa S. *Inmunología.* 2º ed. México: McGraw-Hill; 2007.

44. Kierszenbaum AL. *Histología y Biología Celular*. 2 ed. Madrid:Elsevier Mosby; 2008: 231.
45. Ferrufino, J., Taxa L., Angeles G. *Histología normal del intestino delgado*. *Rev Med Hered*. 1996; 7: 46-57.
46. Hill D, Artis D. *Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis*. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28(1):623-667.
47. Vargas Viveros P, Hurtado Monroy R, Villalobos Alva JÁ. *Esplenomegalia*. *Rev Fac Med*. 2013; 56(2): 37-45.
48. Palas J, Matos A, Ramalho M. *The Spleen Revisited: An Overview on Magnetic Resonance Imaging*. *Radiol Res Pract*. 2013; 2013:1-15.
49. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. 1999.
50. Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F et al. *Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats*. *Lab Anim*. 2007; 41(1):111-119.