



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



“Efectos de la suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre los factores de riesgo cardiovascular y el estrés oxidativo en ratas sanas”

Nombre: Doménica Salcedo Martínez

Tutora: Maria Rosa Nogués Llort

Dirigido por: Bernat Miralles Pérez

**Grupo De Investigación En Nutrición Funcional, Oxidación Y
Enfermedades Cardiovasculares, Departamento de Ciencias Médicas
Básicas, Universidad Rovira i Virgili**

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

REUS, 2021

Tabla de contenido

Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1. Enfermedades cardiovasculares	6
1.2. Factores de riesgo de las ECV	6
1.3. Dieta y las ECV	6
1.4. Dislipidemia y las ECV	8
1.5. Estrés oxidativo y las ECV	8
1.6. Aceite de pescado.....	9
2. Hipótesis	10
3. Objetivos	10
3.1. Objetivo general	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. Metodología	10
4.1. Animales experimentales y suplementación	10
4.2. Procesamiento de muestra	11
4.2.1. Muestras sanguíneas	11
4.2.2. Muestras de hígado.....	11
4.2.3. Muestras de músculo	12
4.3. Determinación de marcadores	12
4.3.1. Perfil Lipídico en plasma	12
4.3.2. Proteínas	13
4.3.3. Biomarcadores de estrés oxidativo	13
4.4. Análisis estadístico.....	15
5. Resultados	16
5.1. Perfil lipídico en plasma	16
5.2. Biomarcadores de estrés oxidativo	17

5.2.1. Capacidad antioxidante del plasma.....	17
5.2.2. Enzimas antioxidantes, glutatión, XO y TBARS en hígado..	18
5.2.3. Enzimas antioxidantes, glutatión y TBARS en músculo.....	18
6. Discusión	19
7. Conclusión.....	22
8. Referencias	23

Resumen

Introducción: El aceite de pescado es una fuente importante de ácido graso eicosapentaenoico (EPA) y ácido graso docosahexaenoico (DHA) al que se le han atribuido efectos beneficiosos sobre las enfermedades cardiovasculares. Se ha sugerido que el DHA tiene mayores efectos sobre los factores de riesgo cardiovasculares.

Objetivo: Evaluar los efectos de la suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre el perfil lipídico plasmático y biomarcadores del estrés oxidativo en ratas sanas en comparación a la suplementación con un aceite de soja, un aceite de coco y un aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA.

Materiales y métodos: 40 ratas macho Sprague-Dawley fueron suplementadas por 10 semanas con 4 suplementos dietarios diferentes: aceite de soja, aceite de coco, aceite de pescado 1:1 EPA/DHA y aceite de pescado rico en DHA. Se determinó el perfil lipídico plasmático, la capacidad antioxidante del plasma y biomarcadores del estrés oxidativo en hígado y músculo.

Resultados: El aceite de pescado rico en DHA disminuyó los niveles de colesterol total y del colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad y aumentó la capacidad antioxidante en plasma. En hígado, el DHA disminuyó la concentración de glutatión oxidado y en el músculo presentó menor peroxidación lipídica.

Conclusiones: La suplementación con aceite de pescado rico en DHA aporta beneficios sobre el perfil lipídico en plasma, la capacidad antioxidante del plasma y los biomarcadores de estrés oxidativo hígado y músculo.

Abstract

Introduction: Fish oil is an important source of eicosapentaenoic fatty acid (EPA) and docosahexaenoic fatty acid (DHA) to which beneficial effects on cardiovascular diseases have been attributed. Furthermore, DHA has been suggested to have greater effects on cardiovascular risk factors.

Objective: To evaluate the effects of supplementation with a fish oil rich in DHA on the plasma lipid profile and biomarkers of oxidative stress in healthy rats compared to supplementation with a soybean oil, a coconut oil and a fish oil with 1:1 EPA / DHA.

Materials and methods: 40 male Sprague-Dawley rats were supplemented for 10 weeks with 4 different dietary supplements: soybean oil, coconut oil, 1:1 EPA/DHA fish oil, and DHA-rich fish oil. The plasma lipid profile, the antioxidant capacity of the plasma and biomarkers of oxidative stress in liver and muscle were determined.

Results: Fish oil rich in DHA decreased the levels of total cholesterol and cholesterol linked to high-density lipoproteins and increased the antioxidant capacity in plasma. In liver, DHA decreased the concentration of oxidized glutathione and it presented lower lipid peroxidation in muscle.

Conclusions: The supplementation with fish oil rich in DHA provides benefits on the lipid profile in plasma, the antioxidant capacity of plasma and biomarkers of oxidative stress liver and muscle.

1. Introducción

1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), tales como la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular, son las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Particularmente, las ECV son las enfermedades más frecuentes responsables del 23% de muertes en España (1).

1.2. Factores de riesgo de las ECV

Los factores de riesgo cardiovascular pueden clasificarse en no modificables y en modificables. Primero, los factores de riesgo no modificables tales como la edad, el sexo y los antecedentes familiares son características biológicas que aumentan la posibilidad de desarrollar ECV y no se pueden modificar. Mientras que, los factores de riesgo modificables son aquellos que se pueden controlar con el objetivo de disminuir el riesgo de desarrollar ECV. Los principales factores de riesgo modificables de las ECV son el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo, el sedentarismo, el sobrepeso/obesidad, la mala alimentación y la dislipidemia (2).

1.3. Dieta y las ECV

Los patrones dietéticos desempeñan un papel importante en el desarrollo de factores de riesgo cardiovascular, tal como el sobrepeso/obesidad y la dislipidemia, y en la progresión de las ECV. Especialmente, se ha estudiado el efecto de la calidad de la grasa dietética sobre el metabolismo de los lípidos plasmáticos. Las grasas dietéticas son nutrientes compuestos por varios tipos de triglicéridos que constan de tres ácidos grasos ligados a un glicerol (3). Los ácidos grasos se pueden clasificar de acuerdo con el grado de saturación de sus cadenas de carbono. En este sentido, los ácidos grasos saturados no contienen dobles enlaces y se encuentra en aceites vegetales, lácteos y carnes (4). Por el contrario, los ácidos grasos insaturados están formados, por al menos, un doble enlace (5) y su fuente varía de acuerdo al tipo de ácido graso que lo conforme. Los ácidos grasos insaturados se dividen en base al número de dobles enlaces que contenga su cadena carbonada. Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) contienen un doble enlace y se encuentra principalmente en el aceite de oliva y de canola (6). Por el contrario, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) están

compuestos por más de dos dobles enlaces y se dividen de acuerdo con la posición de su primer doble enlace a partir del grupo metilo. Específicamente, en omega-6 (AGPI ω -6) y en omega-3 (AGPI ω -3) que contienen su doble enlace en el sexto o tercer carbono, respectivamente. La fuente de AGPI ω -6 son semillas, mientras que las de AGPI ω -3 son pescados grasos (7).

El AGPI ω -6 procede del ácido linoleico (AL, 18:2), mientras que el precursor del AGPI ω -3 es el ácido α -linolénico (ALA, 18:3). Ambos son ácidos grasos esenciales dado que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que su aporte en la dieta es imprescindible. Por un lado, a partir del AGPI ω -6 AL se obtiene el ácido araquidónico (20:4), el cual es un componente de la membrana celular y precursor de eicosanoides que actúan como mediadores inflamatorios (8). Por otro lado, el AGPI ω -3 ALA se puede convertir en ácido graso eicosapentaenoico (EPA, 20:5) y el ácido graso docosahexaenoico (DHA, 22:6). Sin embargo, la conversión de ALA a EPA y DHA es limitada por lo que se considera que es necesario su aporte dietético. Las semillas y aceites vegetales como de soja y girasol son fuente de ALA, mientras que el EPA y el DHA abundan en pescados grasos como las sardinas, anchoas, salmón y atún (9). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria recomienda el consumo de 2 porciones de aproximadamente 110 g de pescado graso a la semana para asegurar el aporte de al menos 250 mg/día de EPA y DHA (10). Sin embargo, el consumo de fuentes ricas de EPA y DHA es limitado, lo que supondrían que su suplementación sea necesaria.

Estudios sobre los efectos de la calidad de la grasa de la dieta sobre las ECV han concluido que las dietas altas en ácidos grasos saturados se relacionan con mayor riesgo de ECV (11). Por el contrario, estudios prospectivos han observado una asociación inversa entre la ingesta de AGMI y AGPI para todas las causas de muerte por las ECV, independiente a la cantidad de ácidos grasos ingeridos (12). Así mismo, reemplazar los ácidos grasos saturados con AGPI reduce los eventos de cardiopatías coronarias y, en adultos, reduce arritmias que se han asociado a una muerte súbita (13). Específicamente, el consumo de los AGPI ω -3 se asocia a una reducción de triglicéridos (TG) plasmáticos y de los marcadores de inflamación (14). Por ello, se ha reconocido que las estrategias nutricionales enfocadas en la prevención y disminución de la progresión de las

ECV se deben basar en la calidad de la grasa dietaria ingerida. El EPA y el DHA tienen efectos cardiometabólicos con un papel importante sobre la prevención de las ECV.

1.4. Dislipidemia y las ECV

La dislipidemia aterogénica es uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de las ECV y está caracterizada por un exceso en la concentración de TG, colesterol total, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y reducción en los niveles de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) (15). El aumento de C-HDL se encuentra inversamente asociado a eventos cardiovasculares (16), y por el contrario, la reducción de las concentraciones de C-LDL disminuye la morbimortalidad asociada a las ECV (17).

1.5. Estrés oxidativo y las ECV

El estrés oxidativo se define como una alteración en el equilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa antioxidante del organismo (18). Las ERO son radicales libres producidos por enzimas como la xantina oxidasa (XO) (19). Las ERO se encuentran implicadas en procesos de señalización celular y del sistema inmunitario. Sin embargo, la producción excesiva de ERO puede resultar en daño celular.

Cantidades excesivas de ERO promueven el desarrollo de las ECV al provocar disfunción celular, daño oxidativo a lípidos, a proteínas y al ADN (20). Para evitar el daño oxidativo, el organismo tiene sistemas de defensas antioxidantes, los cuales pueden ser endógenos y exógenos. Los sistemas antioxidantes endógenos pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Por un lado, los sistemas antioxidantes enzimáticos incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR), encargadas de inactivar las ERO y atenuar sus efectos negativos (21). Por otro lado, dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos encontramos el glutatión reducido (GSH), que actúa como captador de ERO (22). Además, existen componentes derivados de la dieta que han mostrado efectos antioxidantes, como por ejemplo la vitamina C, la vitamina E y los AGPI ω -3. Concretamente, la vitamina C y E actúan como captadores de

ERO (23). Sin embargo, a pesar de los beneficios de los AGPI, éstos son propensos a la oxidación por las ERO, lo que puede llevar a un aumento en el estrés oxidativo.

1.6. Aceite de pescado

El aceite de pescado es una fuente importante de EPA y DHA al que se le han atribuido efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular. El consumo regular de aceite de pescado está asociado a la reducción de niveles de TG y un aumento significativo de C-HDL (24), además de un menor riesgo de mortalidad por ECV (25). El EPA y el DHA pueden modular la expresión de genes que codifican proteínas que estimulan la síntesis de lípidos (26). Adicionalmente, el EPA y DHA son sustrato de las enzimas ciclooxigenasas y lipoxigenasas y compiten con el ácido araquidónico. En este sentido, la suplementación con EPA y DHA disminuye la biosíntesis de los mediadores proinflamatorios como el leucotrieno B₄, la prostaglandina E₂ y el tromboxano B₂ (14). Además, modulan las vías de señalización que inactivan factores de transcripción como el NF-κB. El NF-κB es un factor de transcripción que regula la expresión génica de respuestas inflamatorias y está implicado en la patogénesis de las ECV (27). Las diversas proporciones de EPA y DHA tienen efectos diferentes sobre los factores de riesgo cardiovasculares. Al comparar diferentes ratios, el ratio 1:2 EPA/DHA tiene tendencia a aumentar las concentraciones de AGPI ω-3 y disminuir los niveles plasmáticos de TG, colesterol total, y C-LDL, mientras que el ratio 2:1 EPA/DHA tiende a aumentar los niveles de AGPI ω-6 (28). Sin embargo, el ratio 1:1 EPA/DHA muestra una mayor mejora en parámetros del estrés oxidativo en comparación con los ratio 1:2 y 2:1 de EPA/DHA (45). Particularmente, el DHA mejora los factores de riesgo cardiovasculares al incorporarse en la membrana de los eritrocitos, lo que se ha asociado a una mejora en el perfil lipídico (31). En cuanto a los beneficios de los AGPI ω-3 sobre el estrés oxidativo, éstos tienen efectos cardioprotectores al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (32). Sin embargo, no se han realizado estudios suficientes que intenten discriminar si los efectos de los AGPI ω-3 sobre el estrés oxidativo se atribuyen principalmente al EPA o al DHA.

2. Hipótesis

La suplementación con un aceite de pescado rico en DHA tiene efectos beneficiosos sobre los factores de riesgo cardiovascular y el estrés oxidativo en ratas sanas en comparación a la suplementación con un aceite de soja, un aceite de coco y aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre los factores de riesgo cardiovascular y el estrés oxidativo en ratas sanas en comparación a la suplementación con un aceite de soja, un aceite de coco y aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA.

3.2. Objetivos específicos

- Analizar los efectos de suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre el perfil lipídico en plasma de ratas sanas en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA.
- Analizar los efectos de suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre la capacidad antioxidante en plasma de ratas sanas en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA.
- Analizar los efectos de suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado y músculo de ratas sanas en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA.

4. Metodología

4.1. Animales experimentales y suplementación

Se utilizaron 40 ratas macho Sprague-Dawley de 22 semanas de edad y un peso aproximado de 400 g (Hsd:SD, Envigo, Indianapolis, IN, EUA). Se enjaularon dos ratas por caja (cajas de Makrolon 425 × 265 × 180 mm) a 22 ± 2 °C, 60% de humedad, ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron con una dieta estándar (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet;

Envigo, Indianapolis, IN, EUA). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales según las suplementaciones (n = 10 por grupo):

- Aceite de pescado con un contenido de 80% de DHA, distribuido por IFIGEN-EQUIP 98 S.L. (Barcelona, España);
- Aceite de pescado con un contenido de mixtura 1:1 EPA/DHA, combinando los aceites AFAMPES 121 EPA y Omega-3 RX distribuidos por AFAMSA (Vigo, España) y EnerZona (Milán, Italia) respectivamente;
- Aceite de coco, distribuido por Fauser Vitaquellwerk KG (Hamburg, Alemania), compuesto por ácidos grasos saturados, principalmente de ácido láurico;
- Aceite de soja, distribuido por Clearspring Ltd (Londres, Reino Unido), compuesto principalmente por AGPI ω -6, específicamente AL.

Se les administró una dosis de 0,8 mL de aceite/kg peso corporal dos veces por semana mediante una sonda gástrica. Después de 10 semanas, se sacrificaron las ratas por exanguinación y se extrajo el hígado y músculo gastrocnemio de cada rata. Los tejidos se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.

Todos los procedimientos cumplieron las directrices de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron revisados y aprobados por el comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

4.2. Procesamiento de muestra

4.2.1. Muestras sanguíneas

Las muestras de sangre se recogieron mediante punción cardiaca y se dispusieron en tubos con el anticoagulante ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). El plasma se obtuvo mediante una centrifugación durante 15 minutos, a una temperatura de 4 °C, a 850 x g. El plasma se dividió en alícuotas para los diferentes análisis y posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la determinación del perfil lipídico y de la capacidad antioxidante.

4.2.2. Muestras de hígado

Las muestras de hígado fueron sumergidas en tampón fosfato 200 mM, excepto para la determinación de la XO. Para la determinación de XO se utilizó

tampón fosfato 50 mM con EDTA 1 mM y antioxidante ditioneitol 0,5 mM. Posteriormente, se realizó la homogeneización con un sistema tipo Potter-Elvehjem. Los homogenados fueron centrifugados durante 1 hora, a una temperatura de 4 °C, a 129000 x g. Se recolectaron los sobrenadantes y se dividieron en alícuotas para la determinación de las proteínas, la SOD, la catalasa, la GPx, la GR, las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) y la XO. Para la determinación del GSH y glutatión oxidado (GSSG), la fracción soluble del tejido junto a ácido tricloroacético al 70% se centrifugó por 10 minutos, a una temperatura de 4 °C, a 850 x g y se alicuotó el sobrenadante, este proceso se realiza para precipitar las proteínas y evitar la oxidación del GSH. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

4.2.3. Muestras de músculo

Las muestras de músculo gastrocnemio fueron sumergidas en tampón fosfato 200 mM con antioxidante butilhidroxitolueno 0,5 M. Posteriormente, se realizó la homogeneización en un homogeneizador Polytron. Los homogenados fueron centrifugados durante 1 hora, a una temperatura de 4 °C, a 129000 x g. Se recolectaron los sobrenadantes y se dividieron en alícuotas para la determinación de las proteínas, la SOD, catalasa, la GPx, la GR y los TBARS. Para la determinación del GSH y el GSSG, la fracción soluble del tejido junto a ácido tricloroacético al 70% se centrifugó por 10 minutos, a una temperatura de 4 °C, a 850 x g y se alicuotó el sobrenadante, este proceso se realiza para precipitar las proteínas y evitar la oxidación del GSH. Las alícuotas se almacenaron a - 80 °C hasta su uso.

4.3. *Determinación de marcadores*

4.3.1. Perfil Lipídico en plasma

El colesterol total, C-HDL, C-LDL y TG en plasma se midieron mediante un método espectrofotométrico utilizando los correspondientes kits (SPINREACT, Girona, España) en un autoanalizador COBAS Mira (Roche Diagnostics System, Madrid, España). Los resultados se expresaron como mmol/L de plasma. Además, se calculó la ratio C-LDL/C-HDL.

4.3.2. Proteínas

Las proteínas del hígado y músculo se cuantificaron por el método de Bradford (33). Esta técnica colorimétrica se basa en la formación de un complejo entre las proteínas de la muestra y el reactivo de Bradford. La concentración de proteína se determinó con una recta patrón de albúmina bovina. La reacción se midió en el lector de placas *BioTek Powerwave XS2* (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se utilizaron para normalizar diferentes marcadores.

4.3.3. Biomarcadores de estrés oxidativo

4.3.3.1. *Determinación de la capacidad antioxidante del plasma*

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) evalúa la capacidad antioxidante no enzimática del plasma para atrapar ERO. Este método fluorimétrico se determinó utilizando el ensayo descrito por Ou, et al. (34). Este método se basa en determinar la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína causada por el daño de los radicales libres. El AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro) se utiliza como generador de radical peróxido que disminuye la capacidad fluorescente de la fluoresceína. Los antioxidantes no enzimáticos en la muestra de plasma evitan esta oxidación. La capacidad antioxidante de las muestras se midió utilizando una recta patrón de Trolox (T-Eq), un análogo de la vitamina E hidrosoluble. La pérdida de fluorescencia se monitorizó en un lector de placas *Fluoroskan Ascent* (Labsystems, Helsinki, Finlandia) en una longitud de onda de excitación de 485 nm y 538 nm de emisión. Los resultados se expresaron en mmols de T-Eq/mL de plasma.

4.3.3.2. *Determinación de la actividad de la SOD en hígado y músculo*

La SOD es una enzima antioxidante que cataliza la degradación del superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), actuando como un sistema de defensa celular endógeno (35). La actividad enzimática de la SOD en hígado y músculo se determinó utilizando el método descrito por Misra y Fridovich (36). Este método se basa en determinar la capacidad inhibitoria de la SOD sobre la formación de adenocromo. El adenocromo es producto de la autooxidación de la epinefrina por radicales superóxidos. La reacción se midió en un

espectrofotómetro *Lambda 25 UV/VIS* (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) a una longitud de onda de 480 nm. Los resultados se expresaron en U/g de tejido, donde una unidad corresponde a la cantidad de la SOD en la muestra que tiene la capacidad de inhibir el 50% de la transformación de la epinefrina en adenocromo.

4.3.3.3. Determinación de la actividad de la catalasa en hígado y músculo

La catalasa es una enzima que cataliza la degradación del H_2O_2 en oxígeno y agua (52). La actividad enzimática de la catalasa en hígado y músculo se determinó utilizando el método descrito por Cohen (53). Este método se basa en medir la desaparición del H_2O_2 durante 1 minuto en el espectrofotómetro *Lambda 25 UV/VIS* (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) a una longitud de onda de 240 nm. Los resultados se expresaron como mmol de H_2O_2 transformados/g de tejido.

4.3.3.4. Determinación de la actividad de la GPx y la GR en hígado y músculo

La GPx es una enzima antioxidante que cataliza la oxidación del GSH a GSSG para reducir el H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos utilizando $NADP^+$ y transformarlos en agua (37). La GR cataliza la reducción de GSSG a GSH utilizando NADPH (38). La actividad enzimática de la GPx y la GR en hígado y músculo se determinó utilizando el método descrito por Wheeler et al. (39). Este método valora la generación de $NADP^+$ a partir de NADPH. La reacción se midió en el autoanalizador COBAS Mira (Roche Diagnostics System, Madrid, España) a una longitud de onda de 340 nm. Los resultados se expresaron en U/g de tejido.

4.3.3.5. Determinación del GSH y el GSSG en hígado y músculo

El GSH es el principal agente redox del organismo capaz de eliminar ERO (38). El ratio GSSG/GSH se utiliza como marcador de toxicidad celular (40). La cuantificación del GSH y la GSSG en hígado y músculo se determinó utilizando el método fluorimétrico descrito por Hissin y Hilf (41). Las concentraciones del GSH y GSSG se midieron utilizando sus respectivas rectas patrón. La reacción se midió en un espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) a una longitud de onda de excitación de 350 nm y 420 nm de emisión. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ de tejido. Además, se calculó la ratio GSSG/GSH.

4.3.3.6. Determinación de la actividad de la XO en hígado

La XO es una enzima productora de ERO que cataliza la oxidación de la xantina a ácido úrico (59). La actividad de la XO en hígado se determinó utilizando el método descrito por Maia et al. (60). Este método se basa determinar la hidroxilación oxidativa de sustratos de purina catalizada por la XO. La cantidad de ácido úrico producido durante esta reacción se midió en el espectrofotómetro Lambda 25 UV/VIS (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) a una longitud de onda de 295 nm. Los resultados se expresaron en mU/g de tejido.

4.3.3.7. Determinación de las TBARS en hígado y músculo

Las TBARS son sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y se producen a consecuencia del daño a lípidos inducido por el estrés oxidativo (42). La cuantificación de los TBARS en hígado y músculo se determinó utilizando el método descrito por Buege y Aust (43) pero se midió por fluorescencia, como lo describe Richards et al. (44). El método se basa en la medición de los niveles de productos de degradación de hidroperóxidos lipídicos, especialmente de malondialdehído (MDA). El MDA, formado a partir de la descomposición de los AGPI, sirve como un índice para determinar el grado de peroxidación lipídica. La concentración de TBARS se midió utilizando una recta patrón de MDA. La reacción se midió en un espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) a una longitud de onda de excitación de 515 nm y 548 nm de emisión. Los resultados se expresaron en nmol MDA-Eq/g de tejido.

4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó en el programa estadístico IBM SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, EUA) versión 25. La distribución de las variables se evaluó con la prueba Shapiro-Wilk. Cuando la distribución de las variables era normal, los grupos se compararon utilizando el ANOVA y se aplicó el método post hoc Scheffé para determinar la diferencia significativa entre grupos. Cuando la distribución de las variables era no normal, los grupos se compararon utilizando el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis y se aplicó Mann-Whitney para determinar las diferencias significativas entre grupos. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$. Los

resultados se presentan como la media aritmética de los valores y la desviación estándar.

5. Resultados

A continuación, se presentan los resultados del perfil lipídico en plasma, de la capacidad antioxidante del plasma y de los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado y músculo de acuerdo con los 4 grupos.

5.1. Perfil lipídico en plasma

La suplementación con aceite de pescado rico en DHA afectó el perfil lipídico en plasma (Figura 1). Concretamente, el aceite de pescado rico en DHA disminuyó significativamente la concentración de colesterol total respecto al grupo suplementado con aceite de soja y al grupo suplementado con aceite de coco (Figura 1.A). Además, el aceite de pescado rico en DHA disminuyó la concentración de C-HDL comparado con todos los grupos (Figura 1.B). El aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA también disminuyó los niveles de C-HDL respecto al aceite de coco (Figura 1.B). El aceite de pescado rico en DHA no moduló la concentración de C-LDL, mientras que el aceite de soja disminuyó el C-LDL comparado con los aceites de coco y el aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA (Figura 1.C). En lo referente a la ratio C-LDL/C-HDL, la suplementación con aceite de pescado rico en DHA aumentó la ratio en comparación con el grupo suplementado con aceite de soja (Figura 1.D). El aceite de soja también disminuyó la ratio C-LDL/C-HDL en comparación con el aceite de coco y el aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA. No observamos diferencias significativas en la concentración de TG entre los grupos.

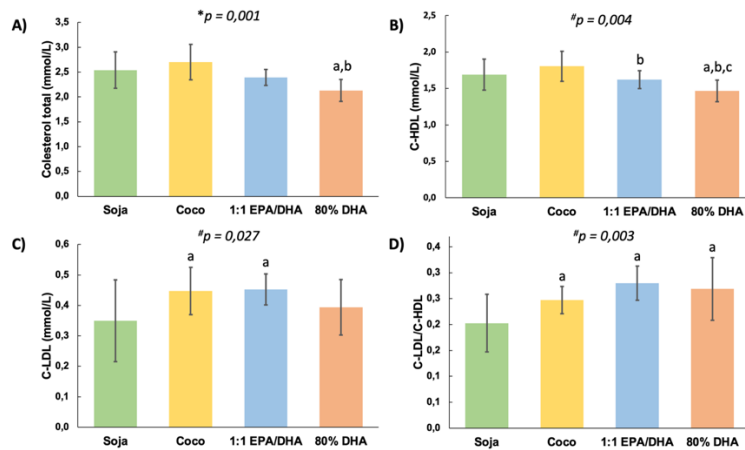


Figura 1. Efectos de la suplementación con aceite de pescado rico en DHA en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y un aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA sobre **A)** colesterol total, **B)** C-HDL, **C)** C-LDL y **D)** C-LDL/C-HDL en plasma de ratas. Abreviaciones: C-HDL, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; C-LDL, colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad. a vs. Soja, b vs. Coco, c vs. 1:1 EPA/DHA. Se presentan los valores de las medias, con errores estándar representados por barras verticales. * El valor de p fue determinado por ANOVA. # el valor de p fue determinado con la Prueba Kruskal-Wallis. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

5.2. Biomarcadores de estrés oxidativo

5.2.1. Capacidad antioxidante del plasma

La suplementación con el aceite rico en DHA aumentó considerablemente el valor de la prueba ORAC respecto al aceite de soja y al aceite de coco (Figura 2). Además, el aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA aumentó el valor de ORAC en relación con el aceite de soja.

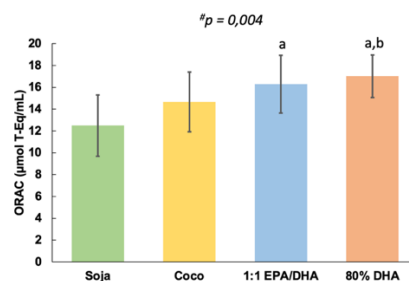


Figura 2. Efectos de la suplementación con aceite de pescado rico en DHA en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y un aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA sobre sobre ORAC en plasma. Abreviaciones: ORAC, capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno. a vs. Soja, b vs. Coco. Se presentan los valores de las medias, con errores estándar representados por barras verticales. # El valor de p fue determinado con la Prueba Kruskal-Wallis. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

5.2.2. Enzimas antioxidantes, glutatión, XO y TBARS en hígado

La suplementación con el aceite rico en DHA disminuyó la cantidad de GSSG en hígado con respecto al aceite de coco (Figura 3.A). Con respecto a los biomarcadores de producción de ERO en el hígado, la actividad de la XO mostró una tendencia de disminución en el grupo suplementado con aceite de pescado rico en DHA en relación con el aceite de soja, pero la diferencia no fue significativa ($p = 0,058$) (Figura 3.B). No observamos diferencias significativas en la SOD, la catalasa, la GPx, la GR, el GSH ni en los TBARS entre los grupos.

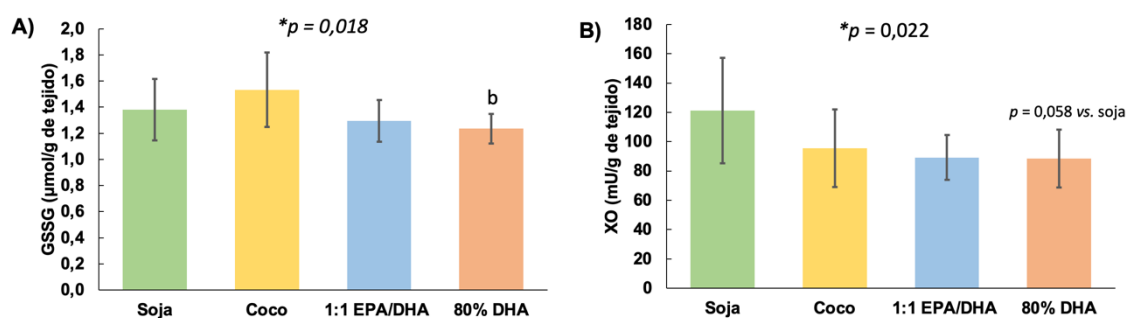


Figura 3. Efectos de la suplementación con aceite de pescado rico en DHA en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y un aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA sobre **A)** cantidad de GSSG en hígado y **B)** actividad de la XO. Abreviaciones: GSSG, glutatión en forma oxidada; XO, xantina oxidada. b vs. Coco. Se presenta los valores de las medias, con errores estándar representados por barras verticales. * El valor de p fue determinado por ANOVA. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

5.2.3. Enzimas antioxidantes, glutatión y TBARS en músculo

La suplementación con el aceite rico en DHA, el aceite de pescado con el 1:1 EPA/DHA y el aceite de soja disminuyeron la actividad de la catalasa respecto al aceite de coco (Figura 4.A). Además, el grupo suplementado con aceite de pescado con el 1:1 EPA/DHA mostró menor cantidad de GSSG (Figura 4.B) y menor ratio GSSG/GSH (Figura 4.C) en comparación con el grupo de aceite de soja. Las ratas suplementadas con el aceite de pescado rico en DHA y el aceite de pescado 1:1 EPA/DHA exhibieron cantidades más bajas de TBARS en músculo con respecto a las ratas suplementadas con aceite de soja (Figura 4.D). No observamos diferencias significativas en la SOD, la GPx, la GR ni en el GSH entre los grupos.

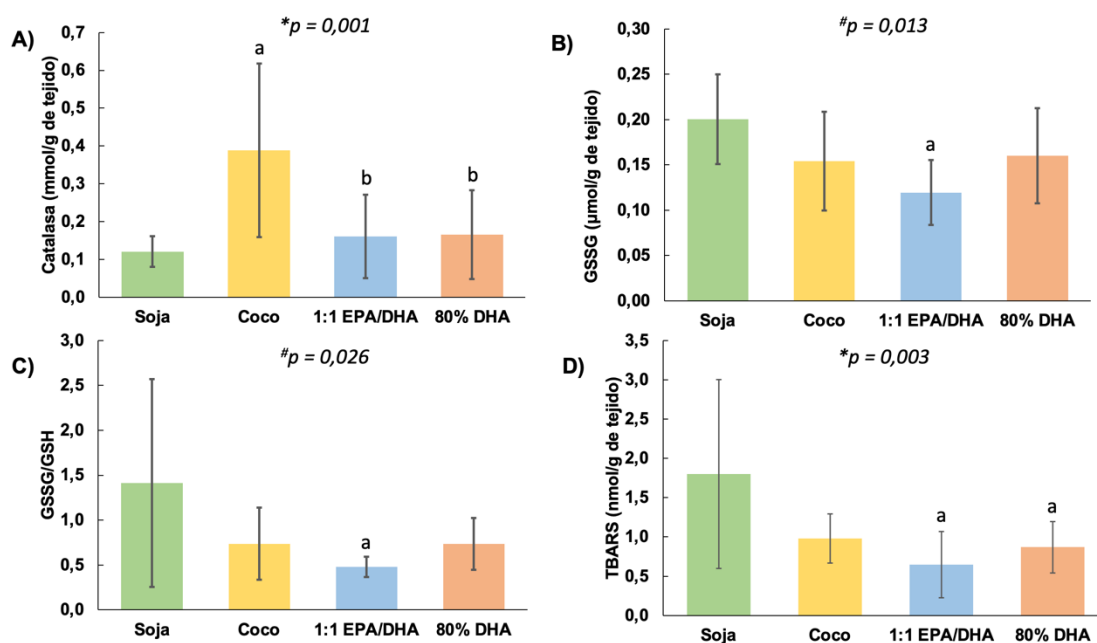


Figura 4. Efectos de la suplementación con aceite de pescado rico en DHA en comparación con un aceite de soja, un aceite de coco y un aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA sobre **A)** actividad de la catalasa, **B)** cantidad de GSSG, **C)** ratio GSSG/GSH, **D)** cantidad de TBARS en músculo de ratas. Abreviaciones: GSSG, glutatión en forma oxidada; TBARS, sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico. a vs. Soja, b vs. Coco. Se presenta los valores de las medias, con errores estándar representados por barras verticales. * El valor de p fue determinado por ANOVA. # El valor de p fue determinado con la Prueba Kruskal-Wallis. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

6. Discusión

En este estudio evaluamos los efectos de la suplementación con un aceite de pescado rico en DHA sobre el perfil lipídico plasmático, la capacidad antioxidante del plasma y los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado y músculo de ratas sanas en comparación con la suplementación con un aceite de soja, un aceite de coco y un aceite de pescado con 1:1 EPA/DHA. El aceite de pescado rico en DHA disminuyó significativamente la concentración de colesterol total en plasma y el estrés oxidativo.

El aceite de pescado rico en DHA disminuyó el colesterol total en plasma comparado con el aceite de soja y el aceite de coco, principalmente por la reducción en C-HDL. Nishimoto, et al. también reportaron que la alimentación

con aceite de pescado a ratas disminuyó los niveles de C-HDL plasmático, redujo la esterificación hepática del C-HDL e incrementó su excreción fecal en comparación con un aceite de soja y un aceite de coco (45). El DHA se ha asociado a la mejora de los factores de riesgo asociados a las ECV al modular el metabolismo lipídico y la expresión de genes. Un mecanismo protector del DHA contra la aterosclerosis es el transporte reverso de colesterol (TRC). El aceite de pescado afecta el TRC al promover el transporte del colesterol en C-HDL al hígado para su posterior excreción en la bilis (46). Por otro lado, estudios han observado que el DHA inhibe el SREBP-2 acompañado con la reducción del colesterol total (47). El SREBP-2 es un factor de transcripción que estimula la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis del colesterol (48). Además, la suplementación con aceite de pescado reduce la esterificación de C-HDL al disminuir la expresión de ARNm de la esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD-1) en el hígado. La SCD-1 es la enzima clave en la biosíntesis de ácidos grasos y ratones deficientes en SCD-1 han mostrado que esta enzima tiene un papel importante en los mecanismos de homeostasis de colesterol (49). En este sentido, la reducción en el colesterol podría explicar, también, la reducción en los niveles de C-HDL en el grupo suplementado con un aceite rico en DHA. En nuestro estudio, la suplementación de ratas con aceites de diferente composición no afectó las concentraciones de TG en plasma. Aunque, la suplementación con AGPI ω -3 disminuyen los niveles de lípidos plasmáticos, los efectos hipotriglicerolémicos de los AGPI ω -3 no siempre se reportan en animales (50).

Referente a la capacidad antioxidante del plasma, el aceite de pescado rico en DHA aumentó los valores de ORAC comparado con el aceite de soja y el aceite de coco. La suplementación con AGPI ω -3 ejerce efectos antioxidantes reduce eventos cardiovasculares y retarda la progresión de aterosclerosis. Estudios en humanos han identificado que la capacidad antioxidante de la dieta está asociados a menor riesgo de insuficiencia cardíaca. Referente a esto, se ha encontrado una correlación positiva entre la capacidad antioxidante total del plasma y la proporción de AGPI ω -3 (51). La propiedad antioxidante de los AGPI ω -3 se relaciona con sus efectos sobre la disfunción endotelial. Específicamente, el DHA estimula la actividad del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a través

de la activación de la vía PKB/Akt (52). La eNOS produce óxido nítrico, molécula importante para la vasodilatación con acción anti-aterosclerótica (53).

De la misma forma, la suplementación con el aceite de pescado rico en DHA disminuyó la cantidad de GSSG en hígado en comparación con el aceite de coco, junto a una tendencia a disminuir la actividad de la XO en comparación con el aceite de soja. En músculo, la suplementación con el aceite de pescado rico en DHA disminuyó la actividad de la catalasa en comparación con el aceite de coco. Arumina, et al. reportaron que el aceite de coco aumenta los niveles de catalasa e indican que este efecto antioxidante se puede deber a sus compuestos fitoquímicos (54). Por su lado, la suplementación con aceite de pescado 1:1 EPA/DHA exhibió una disminución en las cantidades de GSSG, una menor ratio GSSG/GSH. El tratamiento con AGPI ω -3 tiene efectos beneficiosos sobre las ECV al disminuir los mediadores pro-inflamatorios y aumentar las enzimas antioxidantes. Los AGPI ω -3 mejoran la capacidad antioxidante al provocar una regulación positiva de la expresión y la actividad de la enzima antioxidante mitocondrial tioredoxina reductasa-2 (TrxR) (55). La inhibición de la TrxR disminuye la eliminación de H_2O_2 por parte de las mitocondrias, lo que potencia el estrés oxidativo (56). Además, el DHA regula funciones y biogénesis mitocondrial a través de una mayor replicación y transcripción del mtDNA (57), induce la expresión de enzimas antioxidantes, reduce la cantidad de ERO y disminuye el daño oxidativo de lípidos de la membrana celular al modular la expresión de la GPx (58). El EPA y el DHA atenúan el daño oxidativo al ADN en células endoteliales vasculares mediante la regulación positiva de la respuesta antioxidante mediada por el factor de transcripción NRF2 (59). El NRF2 modula el estrés oxidativo al controlar la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante (60). Además, Li, et al. mostraron que el aceite de pescado reduce los niveles de estrés oxidativo y aumenta las actividades antioxidantes en el hígado de ratas (61).

Los AGPI están sujetos a la peroxidación lipídica, proceso en el cual las ERO atacan los lípidos que contienen dobles enlaces. Se observó que el aceite de pescado rico en DHA y 1:1 EPA/DHA llevaron a una disminución de niveles de TBARS comparado con el aceite de soja, aunque los efectos de este último sobre los TBARS no es claro dado que presentan mucha dispersión de datos. El

aceite de soja es fuente de AL que es precursor del ácido araquidónico. El ácido araquidónico se ha relacionado con un mayor daño oxidativo a lípidos al ser sustrato de enzimas que generan eicosanoides proinflamatorios (62). En cuanto a la suplementación con EPA o DHA, se ha reportado que mejoran el estado antioxidante y la resistencia a la peroxidación de lípidos en ratas (63). Uno de los mecanismos de acción es la capacidad del DHA de modular el estrés oxidativo al ser precursor de resolvinas, protectinas y maresinas de la serie D, mediadores protectores que evitan una respuesta inflamatoria excesiva (64). Por otro lado, una menor actividad de XO en el grupo suplementado con un aceite de pescado rico en DHA indicaría menor producción de ERO. Las ERO se han asociado a las ECV ya que promueven la formación de placa aterosclerótica (65). Además, las ROS provocan arritmias al tener efectos negativos en el manejo del calcio miocárdico e indican la señalización hipertrófica llevando a insuficiencia cardíaca (66). Concretamente, se ha propuesto que la XO puede contribuir a la fisiopatología del aumento en la presión arterial a través de ERO (67).

7. Conclusión

Nuestros resultados sugieren que la suplementación con aceite de pescado rico en DHA aporta beneficios sobre el perfil lipídico en plasma, la capacidad antioxidante del plasma y los biomarcadores de estrés oxidativo, fundamentalmente sobre el sistema del glutatión, en hígado y músculo. Concretamente, los AGPI ω -3 procedentes del aceite de pescado, especialmente el DHA, mejora el perfil lipídico al disminuir los niveles de colesterol total y aumentar la capacidad antioxidante en plasma con respecto a los ácidos grasos saturados y a los AGPI ω -6 aceite de soja y el aceite de coco. Adicionalmente, disminuye la concentración de GSSG y tuvo menor peroxidación lipídica en comparación con el AGPI ω -6. De la misma manera, la suplementación con aceite de pescado 1:1 EPA/DHA exhibió una disminución en las cantidades de GSSG, una menor ratio GSSG/GSH. Estos resultados apoyan el uso de aceite de pescado rico en DHA como agente terapéutico contra las ECV. Es necesario realizar estudios que permitan dilucidar los mecanismos moleculares que asocian el consumo de DHA y sus efectos beneficiosos sobre las ECV.

8. Referencias

1. Instituto Nacional de Estadísticas (INE). Defunciones según la Causa de Muerte . 2020. Obtenido de: https://www.ine.es/prensa/edcm_ene_may_19_20.pdf
2. Baena J, del Val J, Tomàs J, Martínez J, Martín R, González I, et al. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Rev Española Cardiol*. 2005;58(4):367–73.
3. Lenighan Y, McNulty B, Roche H. Dietary fat composition: Replacement of saturated fatty acids with PUFA as a public health strategy, with an emphasis on α -linolenic acid. *Proc Nutr Soc*. 2019;78(2):234–45.
4. De Oliveira M, Mozaffarian D, Kromhout D, Bertoni A, Sibley C, Jacobs D, et al. Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(2):397–404.
5. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. Fatty Acids [Internet]. *Encyclopedia Britannica*. 2020. Obtenido de: <https://www.britannica.com/science/fatty-acid>
6. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: Synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*. 2012;4(12):1989–2007.
7. Forouhi NG, Krauss RM, Taubes G, Willett W. Dietary fat and cardiometabolic health: Evidence, controversies, and consensus for guidance. *BMJ*. 2018;361:k2139.
8. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *J Adv Res*. 2017;11:33–41.
9. Carrillo L, Dalmau J, Martínez J, Solà R, Pérez F. Grasas de la dieta y salud cardiovascular. *Atención Primaria*. 2011;43(3):157.e1-157.e16.
10. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA J*. 2012;10(7):2815.
11. Mensink R. Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis. World Health Organization.

- 2016;1–14.
12. Guasch M, Babio N, Martínez M, Corella D, Ros E, Martín S, et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(6):1563–73.
 13. Clifton P, Keogh J. A systematic review of the effect of dietary saturated and polyunsaturated fat on heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017;27(12):1060–80.
 14. Mozaffarian D, Wu J. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(20):2047–67.
 15. Candás B, Pocoví M, Romero C, Vella J, Esteban M, Castro M, et al. Estrategia para el diagnóstico de las dislipidemias: Recomendación 2018. *Rev del Lab Clínico.* 2019;12(4):e21–33.
 16. Liu S, Wu Y, Fan Z, Tian Y, Liu S. Relation between high density lipoprotein particles concentration and cardiovascular events: A meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):142.
 17. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland L, Reith C, Bhalra N, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010;376(9753):1670–81.
 18. Rodrigo R, González J, Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(4):431–40.
 19. Battelli M, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016(3527579):1–8.
 20. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2011;301(6):2181–90.
 21. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59(4):459–69.
 22. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:761264.
 23. Muñoz A, Costa M. Nutritionally Mediated Oxidative Stress and

- Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:610950.
24. Wilkinson P, Leach C, Ah-Sing E, Hussain N, Miller G, Millward D, et al. Influence of α -linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis*. 2005;181(1):115–24.
 25. Li Z, Zhong W, Liu S, Kraus V, Zhang Y, Gao X, et al. Associations of habitual fish oil supplementation with cardiovascular outcomes and all cause mortality: Evidence from a large population based cohort study. *BMJ*. 2020;368:m456.
 26. Davidson M. Mechanisms for the Hypotriglyceridemic Effect of Marine Omega-3 Fatty Acids. *Am J Cardiol*. 2006;98(4A):27i-33i.
 27. Kromhout D, Yasuda S, Geleijnse J, Shimokawa H. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? *Eur Heart J*. 2012;33(4):436–43.
 28. Liu L, Hu Q, Wu H, Wang X, Gao C, Chen G, et al. Dietary DHA/EPA Ratio Changes Fatty Acid Composition and Attenuates Diet-Induced Accumulation of Lipid in the Liver of ApoE $-/-$ Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;14(2018):6256802.
 29. Taltavull N, Muñoz-Cortés M, Lluís L, Jové M, Fortuño À, Molinar-Toribio E, et al. Eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis*. 2014;13(31):1–12.
 30. Lluís L, Taltavull N, Muñoz-Cortés M, Sánchez-Martos V, Romeu M, Giralt M, et al. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids Health Dis*. 2013;12(140):1–8.
 31. Milte CM, Coates AM, Buckley JD, Hill AM, Howe PRC. Dose-dependent effects of docosahexaenoic acid-rich fish oil on erythrocyte docosahexaenoic acid and blood lipid levels. *Br J Nutr*. 2008;99(5):1083–8.
 32. Calder P. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6 Suppl):1505S-1519S.
 33. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal*

- Biochem. 1976;72:248–54.
34. Ou B, Hampsch M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*. 2001;49(10):4619–26.
 35. Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res*. 2006;55(9):359–63.
 36. Hara M, Fridovich I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170–5.
 37. Yang M, Chan H, Yu L. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*. 2006;226(2–3):126–30.
 38. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3217–66.
 39. Wheeler C, Salzman J, Elsayed N, Omaye S, Korte D. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem*. 1990;184(2):193–9.
 40. Townsend D, Tew K, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(3–4):145–55.
 41. Hissin P, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214–26.
 42. Ghani A, Barril C, Bedgood D, Prenzler P. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem*. 2017;230:195–207.
 43. Buege J, Aust S. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302–10.
 44. Richard M, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem*. 1992;38(5):704–9.
 45. Nishimoto T, Pellizzon M, Aihara M, Stylianou I, Billheimer J, Rothblat G, et al. Fish oil promotes macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1502–8.
 46. Pizzini A, Lunger L, Demetz E, Hilbe R, Weiss G, Ebenbichler C, et al. The

- role of omega-3 fatty acids in reverse cholesterol transport: A review. *Nutrients*. 2017;9(10):1099.
47. Chen J, Jiang Y, Liang Y, Tian X, Peng C, Ma KY, et al. DPA n-3, DPA n-6 and DHA improve lipoprotein profiles and aortic function in hamsters fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):397–404.
 48. Madison B. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J Lipid Res*. 2016;57(3):333–5.
 49. Paton C, Ntambi J. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009;297(1):E28–37.
 50. Harris W. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: Animal studies. *Am J Clin Nutr*. 1997;65(5 Suppl):1611S-1616S.
 51. Thorlaksdottir A, Skuladottir G, Petursdottir A, Tryggvadottir L, Ogmundsdottir H, Eyfjord J, et al. Positive association between plasma antioxidant capacity and n-3 PUFA in red blood cells from women. *Lipids*. 2006;41(2):119–25.
 52. Oppedisano F, Macrì R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, et al. The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. *Biomedicines*. 2020;8(9):306.
 53. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 2009;32(Suppl 2):S314-21.
 54. Arunima S, Rajamohan T. Effect of virgin coconut oil enriched diet on the antioxidant status and paraoxonase 1 activity in ameliorating the oxidative stress in rats – a comparative study. *Food Funct*. 2013;4(9):1402–9.
 55. Anderson E, Thayne K, Harris M, Shaikh S, Darden T, Lark D, et al. Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPAR γ activation? *Antioxidants Redox Signal*. 2014;21(8):1156–63.
 56. Lopert P, Day B, Patel M. Thioredoxin Reductase Deficiency Potentiates Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Dopaminergic Cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e50683.
 57. Li G, Li Y, Xiao B, Cui D, Lin Y, Zeng J, et al. Antioxidant Activity of Docosahexaenoic Acid (DHA) and Its Regulatory Roles in Mitochondria. *J Agric Food Chem*. 2021;69(5):1647–55.

58. Casañas V, Pérez J, Fabelo N, Quinto D, Díaz M. Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (Gpx4) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. *Front Physiol.* 2015;6:203.
59. Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187934.
60. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401–26.
61. Li Y, Zhao F, Wu Q, Li M, Zhu Y, Song S, et al. Fish oil diet may reduce inflammatory levels in the liver of middle-aged rats. *Sci Rep.* 2017;7(6241):1–11.
62. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Metab.* 2012;2012:539426.
63. Frenoux J, Prost E, Belleville J, Prost J. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2001;131(1):39–45.
64. Leuti A, Maccarrone M, Chiurchiù V. Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8107265.
65. Qiao J, Arthur J, Gardiner E, Andrews R, Zeng L, Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biol.* 2018;14:126–30.
66. Hafstad A, Nabeebaccus A, Shah A. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(4):359.
67. Yoshida S, Kurajoh M, Fukumoto S, Murase T, Nakamura T, Yoshida H, et al. Association of plasma xanthine oxidoreductase activity with blood pressure affected by oxidative stress level: MedCity21 health examination registry. *Sci Rep.* 2020;10(1):4437.