



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Estudio *in vivo* del efecto del consumo de zumo  
de tomate sobre el metabolismo lipídico en el  
hígado**

**Dña. Gala Martín-Pozuelo Del Pozo  
2015**





## **Estudio *in vivo* del efecto del consumo de zumo de tomate sobre el metabolismo lipídico en el hígado**

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos D<sup>a</sup>. Gala Martín-Pozuelo Del Pozo para optar al grado de Doctor, en el área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología.

Fdo. Gala Martín-Pozuelo Del Pozo

VB<sup>o</sup>

El Director

María Jesús Periago Castón

VB<sup>o</sup>

El Director

Francisco Javier García Alonso





**D<sup>a</sup>. María Jesús Periago Castón, Catedrática de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología, y D. Francisco Javier García Alonso, Profesor Contratado Doctor del Área de Nutrición y Bromatología, ambos adscritos al Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología,**

**AUTORIZAN:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio *in vivo* del efecto del consumo de zumo de tomate sobre el metabolismo lipídico en el hígado**”, realizada por D<sup>a</sup>. Gala Martín-Pozuelo Del Pozo, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Noviembre de 2015

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Jesús Periago Castón

Fdo.: Dr. Francisco Javier García Alonso



## Agradecimientos

Para poder completar esta Tesis, me gustaría dedicar unas palabras a todas aquellas personas que han estado a mi lado durante toda esta etapa de mi vida.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, la Dra. María Jesús Periago Castón y el Dr. Francisco Javier García Alonso, gracias por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto, por darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente en el mundo de la investigación y por supuesto, gracias por vuestro apoyo y paciencia.

Al grupo de investigación de la Universidad de Glasgow (*Institute of Cardiovascular and Medical Sciences*) donde tuve la oportunidad de realizar la estancia predoctoral, especialmente a la Dra. Amaya Albalat, Dr. William Mullen y Dr. Mischak Harald.

Al Dr. Gonzalo González Barberá del CSIC-CEBAS, por su implicación, su interés y su disposición, muchas gracias por tu ayuda y paciencia.

A la Universidad de Murcia que me concedió la beca predoctoral que me ha permitido realizar este trabajo.

A todo el equipo del servicio del animalario, gracias por vuestra ayuda.

A todos mis compañeros del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, gracias por tantos momentos buenos que hemos pasado a lo largo de estos años, ya os considero como parte de mi familia (Lorena, Amparo, Carlos Alberto, Patri, Carmen, Rubén, Guillermo, Edu, Ana Barado, Javi Santaella, Esmat, Vero, Gema, Dario, Alejandra, Laura, Tere, David...). Toñi, la madre de todos, la alegría del departamento, gracias por tus abrazos, tus consejos y como no, tu ayuda en todo lo que hemos necesitado. A Carlos Gómez, mi compañero de mesa y de viaje, que buenos ratos hemos pasado y cuanto he aprendido. A Inma, por su ayuda y su espontaneidad, que nos ha hecho pasar ratos muy divertidos. A Nieves, mi compañera de faenas, gracias por tu ayuda. A Sergio, por sus consejos y su capacidad para animar y motivar. A Francis, por todos los momentos tan divertidos que hemos pasado. A Victoria, por sus consejos, por los buenos ratos y por los que aún nos quedan por disfrutar. A Marina, gracias por esa chispa, ese sentido del humor único que te caracteriza y que nos hace pasar tan buenos momentos. A

Mamen, por la tranquilidad y la paz que trasmite. A Gaspar, por ser ejemplo de que todo es posible.

A Rocío, mi gran compañera y amiga, gracias por tu confianza y apoyo, tus sabios consejos y tu disposición a solucionar todo tipo de problemas.

A Elvira, uno de los grandes descubrimientos de esta etapa, gracias por tu amistad, tu apoyo y los ratitos tan buenos y divertidos que hemos compartido. Esto es sólo el comienzo de una gran amistad. Ánimo, que enseguida terminas tú.

A Leo, gracias por tu apoyo, tus consejos y por estar siempre ahí.

A mi familia, mis padres y mis hermanas, gracias por vuestros ánimos y comprensión, por estar ahí siempre que os he necesitado. Habéis sido un gran apoyo durante este trayecto de mi vida, como en todos los demás.

A Carmelo, por su infinita paciencia, su optimismo, su sentido del humor y sus grandes consejos.

A mis amigas del alma, Marivi, Yolanda y Margarita, gracias por vuestros consejos, especialmente los de técnicas de relajación, siempre vienen bien en estos casos, porque aunque no nos veamos tanto como quisiéramos, sé que siempre puedo contar con vosotras.

*A mi familia*



*“Los sueños parecen al principio imposibles, luego improbables, y luego, cuando nos comprometemos, se vuelven inevitables” .*

Mahatma Gandhi



---

## INDICE

---

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| <b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 5  |
| <b>1.1. METABOLISMO HEPÁTICO</b> .....  | 7  |
| 1.1.1. Función del hígado en el metabolismo de los carbohidratos .....  | 7  |
| Gluconeogénesis .....   | 8  |
| 1.1.2. Función del hígado en el metabolismo de los lípidos .....  | 8  |
| Oxidación de ácidos grasos .....  | 8  |
| Regulación de la oxidación de ácidos grasos .....   | 10 |
| Síntesis de lípidos .....   | 10 |
| Regulación de la síntesis de lípidos .....  | 11 |
| Síntesis de colesterol.....   | 12 |
| <b>1.2. ESTEATOSIS Y ALTERACIONES DEL METABOLISMO LIPÍDICO DEL HÍGADO</b> .....   | 16 |
| 1.2.1. Patogénesis de la NAFLD .....  | 17 |
| 1.2.2. Regulación de las rutas implicadas en la patogénesis de la NAFLD: Proteínas<br>transportadoras de membrana ..... | 23 |
| 1.2.3. Progresión de la NAFLD .....   | 26 |
| Estrés oxidativo .....  | 26 |
| Productos de la peroxidación lipídica .....   | 27 |
| Citoquinas proinflamatorias.....  | 27 |
| 1.2.4. NAFLD y Síndrome metabólico.....   | 28 |
| <b>1.3. ESTRATEGIAS NUTRICIONALES EN EL TRATAMIENTO DE LA NAFLD</b> .....   | 30 |
| 1.3.1. Zumo de tomate.....  | 31 |
| Composición nutricional.....  | 32 |
| 1.3.2. Licopeno: carotenoide principal del tomate .....   | 35 |
| Biodisponibilidad del licopeno .....  | 36 |
| Metabolismo del licopeno.....   | 38 |
| 1.3.3. Propiedades beneficiosas del tomate y el licopeno sobre la salud .....   | 39 |
| Prevención de la Enfermedad Cardiovascular .....  | 39 |
| Prevención de la enfermedad del hígado graso o enfermedad hepática .....  | 43 |
| Otras enfermedades.....   | 44 |
| Beneficios del zumo de tomate.....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 1.4. LA PROTEÓMICA, POSIBLE HERRAMIENTA DE DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE NAFLD..   | 46 |
| <b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b> .....  | 51 |
| <b>CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | 55 |
| 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL .....  | 57 |
| 3.1.1. ESTUDIO 1 .....  | 57 |
| 3.1.2. ESTUDIO 2 .....  | 60 |
| 3.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS.....   | 65 |
| 3.2.1. Determinación de la capacidad antioxidante hidrofílica .....   | 65 |
| Capacidad antioxidante hidrofílica: método ORAC.....  | 65 |
| Capacidad antioxidante hidrofílica: método TEAC.....  | 65 |
| 3.2.2. Parámetros bioquímicos .....   | 66 |
| 3.2.3. Examen histopatológico .....   | 66 |
| 3.2.4. Determinación de Biomarcadores de inflamación.....   | 67 |
| Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina 6 (IL-6).....  | 67 |
| Plasma .....  | 67 |
| Tejido Adiposo.....   | 68 |
| Moléculas solubles adhesión intercelular (sICAM-1) y vascular (sVCAM-1).....  | 68 |
| 3.2.5. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo. ....   | 68 |
| Isoprostanos .....  | 68 |
| Malondialdehído (MDA).....  | 69 |
| 3.2.6. Determinación de compuestos antioxidantes .....  | 70 |
| Análisis de Vitamina C .....  | 70 |
| Determinación colorimétrica de licopeno .....   | 71 |
| Determinación de licopeno y sus metabolitos por cromatografía líquida de alta eficacia<br>acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC/MS)..... | 71 |
| Compuestos fenólicos totales .....  | 72 |
| Flavonoides libres.....   | 73 |
| 3.2.7. Actividad de la enzima Hidroximetil-glutaril Coenzima A Reductasa (HMGCoA-R).....  | 74 |
| 3.2.8. Análisis de colesterol.....  | 74 |
| 3.2.9. Análisis de grasa total y ácidos grasos .....  | 75 |
| Grasa total .....   | 75 |
| Ácidos grasos de cadena larga .....   | 76 |
| Ácidos grasos de cadena corta.....  | 76 |
| 3.2.10. Parámetros normalizadores de la concentración .....   | 77 |

|   |            |
|---|------------|
| Creatinina .....  | 77         |
| Proteínas totales .....   | 78         |
| 3.2.11. Estudio de expresión génica.....  | 79         |
| 3.2.12. Análisis de metabolitos hepáticos.....  | 80         |
| 3.2.13. Biomarcadores de origen peptídico .....   | 81         |
| 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 83         |
| 3.3.1. Análisis estadístico general .....   | 83         |
| 3.3.2. Análisis estadístico específico .....  | 84         |
| Metabolitos hepáticos .....   | 84         |
| Biomarcadores de origen peptídico .....   | 84         |
| <b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>89</b>  |
| 4.1. ESTUDIO CON ANIMALES NORMOCOLESTEROLÉMICOS (ESTUDIO 1).....                                  | 91         |
| 4.2. ESTUDIO CON ANIMALES ALIMENTADOS CON UNA DIETA CON ALTO CONTENIDO EN GRASA (ESTUDIO 2) ..... | 102        |
| 4.2.1. Datos dietéticos, bioquímicos e histológicos .....   | 102        |
| 4.2.2. Parámetros relacionados con el metabolismo lipídico .....                                  | 104        |
| 4.2.3. Biodisponibilidad de licopeno .....  | 111        |
| 4.2.4. Biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo .....                                      | 112        |
| 4.2.5. Análisis de metabolitos hepáticos.....   | 116        |
| 4.2.6. Expresión génica del metabolismo de ácidos grasos .....                                    | 124        |
| 4.2.7. Biomarcadores de origen peptídico .....  | 132        |
| Resultados del análisis estadístico .....   | 132        |
| Resultados selección de biomarcadores de origen peptídico.....                                    | 140        |
| Resultados de la relación biomarcadores-enfermedad cardiovascular .....                           | 149        |
| <b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>151</b> |
| <b>CAPÍTULO 6. EXTENDED SUMMARY AND CONCLUSIONS .....</b>   | <b>155</b> |
| <b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>171</b> |
| <b>CAPÍTULO 8. RESUMEN/ABSTRACT .....</b>   | <b>193</b> |
| <b>ANEXO.....</b>   | <b>199</b> |



## *Introducción*



---

## Introducción

---

La enfermedad hepática del hígado graso (NAFLD) es la alteración hepática más común en los países desarrollados. Comprende un espectro que abarca desde una simple esteatosis, a esteatohepatitis, fibrosis e incluso cirrosis y fallo hepático. Se produce como consecuencia de una acumulación excesiva de triglicéridos en el hígado, sin el consumo de cantidades significativas de alcohol. A pesar de que la esteatosis simple pueda parecer benigna, esta puede progresar a esteatohepatitis (NASH), caracterizada por procesos de estrés oxidativo, inflamación y daño hepático, que puede avanzar a un estado de fibrosis (Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010).

Esta enfermedad solía se ha descrito habitualmente en la población adulta; sin embargo, actualmente su prevalencia está aumentando en la población juvenil e infantil, debido al aumento de obesidad en estos grupos de la población (Browning *et al.*, 2004). NAFLD está fuertemente asociada a la obesidad, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la dislipemia. De hecho, se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico (Ahmed *et al.*, 2009).

Además, esta patología representa un importante riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. El hígado de pacientes con NALD produce una mayor cantidad de factores aterogénicos como citoquinas proinflamatorias y partículas LDL, las cuales son más susceptibles de ser oxidadas por el aumento de la peroxidación lipídica generada en este estado patológico. Además, el perfil lipídico en NAFLD se ve alterado, hallándose mayores concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol LDL y menores de colesterol HDL. Todo ello supone una amenaza para el desarrollo de eventos cardiovasculares (Fon Tacer y Rozman, 2011).

La teoría propuesta más aceptada sobre la patogénesis de NAFLD es la teoría de los dos impactos o *hits*. El primer *hit* explica que la causa principal que conlleva la acumulación de triglicéridos es la resistencia a la insulina. El segundo *hit* atribuye la aparición de esteatohepatitis al aumento del estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y procesos inflamatorios (Tessari *et al.*, 2009).

Actualmente, no existe un tratamiento aceptado para esta patología (Ayala *et al.*, 2008). El tratamiento que se aplica es la modificación del estilo de vida, incluyendo cambios dietéticos y aumento de ejercicio físico, para conseguir una pérdida de peso, y en algunos casos, fármacos que puedan paliar la resistencia a la insulina o que contribuyan con la disminución del peso corporal. Respecto a las estrategias nutricionales recomendadas encontramos el consumo de una menor ingesta de grasa total, especialmente de grasas saturadas y grasas trans, aumento

de frutas y verduras y reducción de azúcares simples. En este sentido la dieta Mediterránea ha sido propuesta como un modelo adecuado a seguir. De hecho, varios estudios han observado una mejoría en aquellos pacientes con NAFLD que siguieron este modelo dietético (Ryan *et al.*, 2013; Kontogianni *et al.*, 2014).

El tomate y productos derivados son un componente fundamental de la dieta Mediterránea y suponen un importante aporte de antioxidantes como las vitaminas C y E, carotenoides, como el licopeno y el  $\beta$ -caroteno, y compuestos fenólicos (Willcox *et al.*, 2003; Periago *et al.*, 2009; García-Valverde *et al.*, 2011). El tomate es la principal fuente de licopeno, carotenoide con mayor poder antioxidante por su capacidad de protección frente a las especies reactivas de oxígeno. Esta característica ha atraído el interés de la comunidad científica por su capacidad de proteger frente a enfermedades crónicas asociadas en su mayoría a una situación de estrés oxidativo, como son el cáncer y la enfermedad cardiovascular (Mordente *et al.*, 2011). Existen numerosos estudios que demuestran efectos beneficiosos del consumo de tomate y especialmente del consumo de licopeno. Entre estos efectos destaca su acción como agente hipocolesterolémico (Navarro-González *et al.*, 2014), potente antioxidante (Visioli *et al.*, 2003; Jamshidzadeh *et al.*, 2008), modulador del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria (Riso *et al.*, 2006; Jacob *et al.*, 2008; Tsitsimpikou *et al.*, 2014). Además, algunos estudios describen que puede ejercer un efecto preventivo o paliativo de la enfermedad del hígado graso (Bahcecioglu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos exactos por los que se genera NAFLD y en relación a esta patología, los mecanismos que puede ejercer el licopeno procedente de la ingesta de tomate.

Por este motivo, en la presente Tesis Doctoral nos hemos planteado como objetivo general estudiar los posibles mecanismos que el licopeno, procedente de la ingesta de zumo de tomate, puede estar ejerciendo sobre el metabolismo lipídico en el hígado. Elucidar las formas de actuación del licopeno podría ser interesante, especialmente para mejorar las estrategias nutricionales recomendadas en la enfermedad del hígado graso. Además, conocer los mecanismos que se producen en la NAFLD y las alteraciones que conlleva, contribuiría a su prevención y/o diagnóstico precoz, evitando de ese modo muchas complicaciones.

## *Capítulo 1. Revisión Bibliográfica*



## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. METABOLISMO HEPÁTICO

El hígado es el órgano más grande del cuerpo y está implicado en numerosas rutas metabólicas, entre las que se encuentra la regulación de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Además, realiza funciones como síntesis de hormonas esteroideas, desintoxicación de fármacos y conjugación de la bilirrubina (**Figura 1.1**).

#### 1.1.1. Función del hígado en el metabolismo de los carbohidratos

El hígado ejerce una función fundamental en el metabolismo de los carbohidratos, tanto en condiciones de ayuno como tras la ingesta de alimento.

En condiciones de ingesta, la glucosa absorbida a nivel intestinal es transportada a través de la vena porta al hígado. Una vez allí, la glucosa penetra al interior del hepatocito mediante los transportadores de glucosa 2, cuya acción no depende de la insulina. Por tanto, la absorción de glucosa por los hepatocitos es proporcional a la concentración plasmática. Una vez dentro del hepatocito, la glucosa es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima glucoquinasa, que tiene la característica de que, bajo condiciones fisiológicas, no se ve afectada por su producto, G6P. Este hecho propio del hígado le otorga la característica de fosforilar la glucosa cuando las concentraciones plasmáticas son elevadas y de liberarla cuando aumentan las necesidades (Nuttall *et al.*, 2008).

La G6P puede ser empleada en la glucólisis, cuando aumenta la demanda de energía, o puede dar lugar a la síntesis de glucógeno, cuando disminuyen las necesidades energéticas. La glucólisis se produce en el citosol y da lugar a la obtención de piruvato. El glucógeno almacenado también puede ser degradado por la enzima glucógeno fosforilasa (GP) para producir G6P, que puede dirigirse a la ruta de la glucólisis o ruta de las pentosas fosfato o transformarse en glucosa por acción de la enzima glucosa 6-fosfatasa, si aumentan las necesidades. El piruvato puede entrar al ciclo de Krebs en la mitocondria por la vía del Acetil-CoA para formar citrato. El citrato también puede incorporarse a la ruta del proceso de lipogénesis por la vía del Acetil-CoA para producir triglicéridos y colesterol en el citosol. Las enzimas implicadas en los procesos de

lipogénesis están reguladas por la insulina, al igual que la formación de glucógeno. (Gyamfi *et al.*, 2010).

### ***Gluconeogénesis***

La gluconeogénesis es la ruta metabólica anabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de fuentes no glucídicas, y el hígado es el principal órgano con una función esencial en este proceso.

Los principales sustratos implicados en esta ruta son el lactato, piruvato, glicerol, aminoácidos y metabolitos intermediarios del Ciclo de Krebs. La regulación de la glucogenogénesis depende principalmente de dos factores: 1. Regulación hormonal de las enzimas implicadas en dicha ruta y 2. Tasa de producto disponible. La hormona glucagón activa la ruta de la gluconeogénesis y la insulina la inhibe (Fraysn *et al.*, 2003).

#### **1.1.2. Función del hígado en el metabolismo de los lípidos**

El hígado desempeña funciones tanto catabólicas como anabólicas en lo que respecta al metabolismo de los lípidos (**Figura 1.2**). Los ácidos grasos presentes en el organismo proceden principalmente de los lípidos ingeridos a través de la dieta. Más del 95 % de los lípidos ingeridos son absorbidos a través del intestino delgado e incorporados directamente al torrente sanguíneo, en el caso de ácidos grasos de cadena corta y media, o formando parte de quilomicrones, cuando se trata de ácidos grasos de cadena larga, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Además de los quilomicrones, las lipoproteínas VLDL, formadas en el hígado, y el proceso de lipólisis que tiene lugar en el tejido adiposo, son los responsables de la presencia de ácidos grasos en el torrente sanguíneo. En general, los ácidos grasos se incorporan al hígado para sufrir un proceso de oxidación o para dar lugar a la formación de triglicéridos (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010; Fon Tacer y Rozman, 2011).

#### ***Oxidación de ácidos grasos***

La oxidación de los ácidos grasos se lleva a cabo mediante la  $\beta$ -oxidación, proceso que tiene lugar en la mitocondria, aunque también puede darse en otros orgánulos como los peroxisomas (Reddy y Hashimoto, 2001), implicados en el metabolismo de una gran variedad de

ácidos grasos, especialmente los de cadena muy larga y los ramificados. Existen otras rutas de oxidación de ácidos grasos, como la  $\alpha$ - y  $\omega$ -oxidación mediadas por la familia del citocromo P450 4A en el retículo endoplasmático. Los citocromos P450 pertenecen a una gran familia de hemoproteínas que catalizan la oxidación de componentes endógenos y exógenos, incluyendo los ácidos grasos. Estos sistemas de oxidación fuera de la mitocondria son esenciales durante los periodos en los que el flujo de ácidos grasos al hígado se ve incrementado. Por tanto, diversos agentes, conocidos como proliferadores del peroxisoma, como los ácidos grasos y moléculas derivadas de estos, pueden actuar como estimuladores de la proliferación del peroxisoma, lo que se asocia con un incremento en la expresión de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (Wei *et al.*, 2008; Gyamfi *et al.*, 2010).

La oxidación hepática de los ácidos grasos tiene lugar del siguiente modo: los ácidos grasos procedentes del torrente circulatorio se incorporan al interior de los hepatocitos a través de la unión de una serie de transportadores presentes en la membrana externa. Una vez dentro del citosol se unen a proteínas específicas que les permiten desplazarse y poder activarse mediante la formación de un tioéster con la coenzima A, proceso catalizado por la enzima acil-CoA sintetasa presente en la membrana externa de la mitocondria para producir derivados acil-CoA de los ácidos grasos (Kalant y Cianflone, 2004). Los ácidos grasos de cadena corta y media tienen la capacidad de atravesar la membrana mitocondrial interna mediante un mecanismo de difusión, mientras que los ácidos grasos de cadena larga requieren un mecanismo de transporte especializado, ya que por sí mismos no pueden atravesarla. Por este motivo los ácidos grasos de cadena larga (ácidos grasos con más de 12 átomos de carbono) se unen a la carnitina mediante la enzima carnitina-palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), sustituyendo el grupo CoA por la molécula de carnitina, y son transportados como derivados de la carnitina (acilcarnitina) para poder acceder al interior de la membrana mitocondrial interna. Una vez allí, tiene lugar la reacción inversa, es decir, se forma de nuevo carnitina y el derivado acil CoA mediante la enzima carnitina-palmitoiltransferasa 2 (CPT-2). Finalmente, los grupos acil CoA sufren el proceso de la  $\beta$ -oxidación, siendo degradados por eliminación secuencial de dos átomos de carbono a partir del final del ácido graso, dando lugar a moléculas acetil-CoA (Wei *et al.*, 2008). Este proceso genera también una molécula de NADH y FADH<sub>2</sub>, que se emplean como fuente de energía en la cadena respiratoria. El acetil-CoA producido se dirige principalmente al ciclo tricarboxílico o ciclo de Krebs para la obtención de energía, aunque si se genera en exceso es convertido en acetoacetato e 3-hidroxiacetato mediante el proceso denominado cetogénesis. El acetoacetato puede sufrir una descarboxilación y dar lugar a acetona. Estos tres productos, 3-hidroxiacetato, acetoacetato y acetona se denominan cuerpos cetónicos y son producidos principalmente en el

hígado y liberados al torrente sanguíneo, ya que este órgano no puede utilizarlos como sustrato energético por carecer de la enzima HMG-CoA liasa, necesaria para ello. Una vez en circulación, los cuerpos cetónicos son consumidos por los tejidos periféricos, como el músculo esquelético y la corteza renal. Los cuerpos cetónicos se producen cuando la degradación de los ácidos grasos no puede completarse, bien debido a que la cantidad de ácidos grasos es muy elevada o bien porque falta glucosa. Aunque el uso principal de los cuerpos cetónicos es como sustrato energético, también pueden ser destinados a la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Cahill y Veech, 2003, Browning y Horton, 2004; Koek *et al.*, 2011).

### **Regulación de la oxidación de ácidos grasos**

La  $\beta$ -oxidación está regulada por la disponibilidad de ácidos grasos, que a su vez depende de los ácidos grasos liberados a sangre procedentes de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo y cuya regulación está a cargo de la lipasa sensible a hormonas. Otra forma de regulación consiste en la inhibición de la enzima CPT-1 por la presencia de malonil-CoA, intermediario del proceso de lipogénesis. Por otra parte, la insulina inhibe la  $\beta$ -oxidación incrementando la concentración de este sustrato mediante la activación de acetil-CoA carboxilasa (ACC) y por estimulación del proceso de esterificación para la formación de triglicéridos. Sin embargo, el glucagón ejerce un efecto contrario, ya que favorece la oxidación de los ácidos grasos, probablemente por su efecto sobre la enzima CPT-1. En la regulación a largo plazo, los receptores PPARs tienen una función esencial. Estos receptores (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$ ) se expresan principalmente en tejidos implicados en el metabolismo de ácidos grasos, entre los que se encuentra el hígado (Gyamfi *et al.*, 2010; Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010). El receptor PPAR $\alpha$  está fuertemente implicado en la regulación de la expresión de genes implicados en la oxidación hepática de ácidos grasos tanto mitocondrial como extramitocondrial, y por tanto, cualquier defecto en la expresión de estos genes supondría la alteración del grado de oxidación hepática de ácidos grasos (Rao y Reddy, 2004).

### **Síntesis de lípidos**

Los lípidos ingeridos a través de la dieta son transportados por el torrente sanguíneo unidos a unas lipoproteínas denominadas quilomicrones. Los quilomicrones van liberando triglicéridos por el torrente mediante la actuación de la lipoproteína lipasa presente en el endotelio vascular, que los degrada en ácidos grasos y glicerol para que sean incorporados en

los diferentes tejidos. El quilomicron remanente se dirige al hígado para aportar los lípidos restantes, que no han sido utilizados por los tejidos periféricos. En función del estado energético, los ácidos grasos presentes en el hígado pueden ser esterificados para formar triglicéridos y así almacenarse como reserva energética en los hepatocitos y también pueden ser secretados a la circulación mediante lipoproteínas VLDL, que transportan esta grasa a los tejidos que la requieran (Koek *et al.*, 2011). La síntesis de lípidos en el hígado tiene lugar, por tanto, a través de la utilización de los ácidos grasos procedentes del tejido adiposo blanco o mediante el proceso de lipogénesis *de novo* a partir de los glúcidos en exceso. La síntesis *de novo* de lípidos a partir de componentes no lipídicos, como la glucosa, se lleva a cabo en el citosol de los hepatocitos a partir del acetil-CoA. Debido a la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial al paso del acetil-CoA, es necesaria su conversión a citrato mediante la enzima citrato sintasa para poder lograr su entrada al citosol. Una vez en su interior, el citrato es degradado por la enzima ATP/citrato liasa para regenerar la molécula de acetil-CoA y esta es carboxilada por la enzima ACC para formar malonil-CoA. La síntesis de ácidos grasos se produce a partir de intermediarios de acetil-CoA y malonil-CoA, mediante la adición de dos unidades de carbono por la enzima ácido graso sintasa. Por otra parte, los ácidos grasos sintetizados pueden combinarse con gliceraldehido 3-fosfato (producto intermediario de la glucólisis) para formar triglicéridos y fosfolípidos (Wei *et al.*, 2008; Fon Tacer y Rozman, 2011).

### **Regulación de la síntesis de lípidos**

La enzima ACC es la enzima principal de la regulación de la síntesis de ácidos grasos debido a su función sobre la síntesis de malonil-CoA. Esta enzima se activa cuando existe abundancia de energía y se inhibe cuando se genera un déficit de energía. Estos cambios de activación y desactivación ocurren por medio de la vía de desfosforilación y fosforilación, respectivamente (Wei *et al.*, 2008; Gyamfi *et al.*, 2010).

Además, la enzima ACC puede ser regulada de forma hormonal, a través de la insulina. Cuando existe energía suficiente en el organismo los niveles de insulina se elevan y estimulan la activación de la enzima ACC, aumentando los niveles de malonil-CoA y por tanto, inhibiendo la oxidación de ácidos grasos y promoviendo la síntesis y esterificación de ácidos grasos y su almacenamiento. Por el contrario, cuando existe un déficit energético, el glucagón inhibe el proceso de desfosforilación, evitando de ese modo la activación de la enzima ACC y bloqueando la síntesis de ácidos grasos (Gyamfi *et al.*, 2010).

Por otra parte, la insulina favorece la activación de SREBP-1c, un factor importante de transcripción que regula una serie de genes que promueven el proceso de lipogénesis. Sin embargo, se ha observado que SREBP-1c no puede actuar sólo en la expresión de genes implicados en los procesos de lipogénesis y glucolisis (Denechaud *et al.*, 2008). Existe otro factor de transcripción denominado ChREBP que se activa en presencia de glucosa (Uyeda y Repa, 2006). La glucosa actúa a través de su intermediario, xilosa 5-fosfato, generado por la ruta de las pentosas fosfato no oxidativa, que favorece el proceso de desfosforilación y activa el factor ChREBP, que promueve la expresión de las regiones de los genes que participan en los procesos de glucolisis y lipogénesis. Por este motivo, cuando hay un exceso de carbohidratos, el hígado transforma la glucosa en grasa con el objetivo de controlar los niveles plasmáticos de glucosa y evitar la hiperglucemia (Ishii *et al.*, 2004; Postic *et al.*, 2007)

### **Síntesis de colesterol**

El hígado es el órgano principal regulador de la síntesis, distribución y excreción de colesterol. La mayor parte de los tejidos tienen la capacidad de sintetizar colesterol pero no llegan a desarrollarla debido al suministro continuo que el hígado proporciona a los tejidos mediante las lipoproteínas, por lo que dicha entrada de colesterol inhibe su síntesis en los tejidos periféricos (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

En el hígado la inhibición de la síntesis de colesterol tiene lugar cuando es aportado a través de la dieta, que llega al hígado transportado en los quilomicrones remanentes. Por este motivo, el hígado sólo desencadena la síntesis de colesterol cuando el aporte dietético es insuficiente (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

La síntesis de colesterol se produce a partir del hidroximetilglutaril CoA al igual que los cuerpos cetónicos pero con la diferencia del orgánulo en el que se produce. Los cuerpos cetónicos se sintetizan en las mitocondrias y el colesterol en el retículo endoplásmico. El proceso de síntesis transcurre del siguiente modo: a partir del hidroximetilglutaril CoA se forma ácido mevalónico por acción de la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA-R). El ácido mevalónico da lugar a un isopreno activo que forma la base fundamental de la estructura del colesterol. Son necesarios seis isoprenos para generar escualeno, que a su vez, se cicla formando la molécula de lanosterol y tras la pérdida de tres grupos metilo se origina finalmente la molécula de colesterol (Van der Wulp *et al.*, 2013).

La regulación de la síntesis de colesterol se lleva a cabo principalmente por la enzima HMG-CoA-R y otros mecanismos (Brown y Goldstein, 1980). Esta enzima puede activarse o desactivarse mediante procesos de fosforilación-desfosforilación por una proteína quinasa activada por AMP. De este modo, cuando los niveles de ATP son bajos, aumenta el AMP y se desactiva la síntesis. Por otro lado, la expresión de la enzima está regulada por la proteína SREBP (proteína de unión a elementos de respuesta regulados por esteroides) que se produce únicamente cuando existe escasez de colesterol. Por ello, cuando existe una cantidad adecuada de colesterol la síntesis de la enzima se desactiva (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010; Edwards y Ericsson, 1999; Itsvan y Deisenhofer, 2001).

El colesterol presente en el organismo, como se menciona anteriormente, puede proceder de la dieta o de la síntesis endógena llevada a cabo por el hígado, siendo esta última vía la principal fuente de colesterol del ser humano. Esta homeostasis implica el desplazamiento del colesterol entre los distintos tejidos periféricos y el hígado. El hígado regula la biosíntesis *de novo* de colesterol, la excreción de colesterol a través de la bilis, la secreción de colesterol al torrente sanguíneo a través de las lipoproteínas VLDL, la modulación de los receptores que median su absorción a nivel celular, la formación de ésteres de colesterol y su almacenamiento (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

En este sentido, para conseguir una adecuada homeostasis del colesterol es fundamental la función de los receptores hepáticos X de colesterol (LXRs) (Sharpe *et al.*, 2013). Se trata de receptores nucleares que se activan por la presencia de oxisteroles endógenos, es decir, derivados oxidados del colesterol. Los receptores LXRs actúan como sensores de colesterol, por tanto, cuando los oxisteroles se acumulan como resultado de un incremento de las concentraciones de colesterol, LXRs inducen la transcripción de genes que protegen a las células de la sobrecarga de colesterol. Su activación regula la síntesis de ácidos biliares y metabolismo y/o excreción, el transporte reverso de colesterol (TRC), la biosíntesis de colesterol y la absorción y excreción de colesterol en el intestino (Zhao *et al.*, 2010). El transporte reverso de colesterol (TRC) es el proceso por el cual el colesterol de los tejidos periféricos es transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) al hígado para su excreción en la bilis (Gómez Coronado, 2010).

La síntesis de bilis es otro mecanismo de excreción de colesterol. Esta secreción, necesaria para la emulsión y digestión de las grasas procedentes de la dieta, está formada entre otros componentes, por las sales biliares y el colesterol. Las sales biliares se forman a partir de

la hidroxilación del núcleo de colesterol por la acción de hidrolasas hepáticas (7-, 12- y 26-) y la modificación de su cadena lateral (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

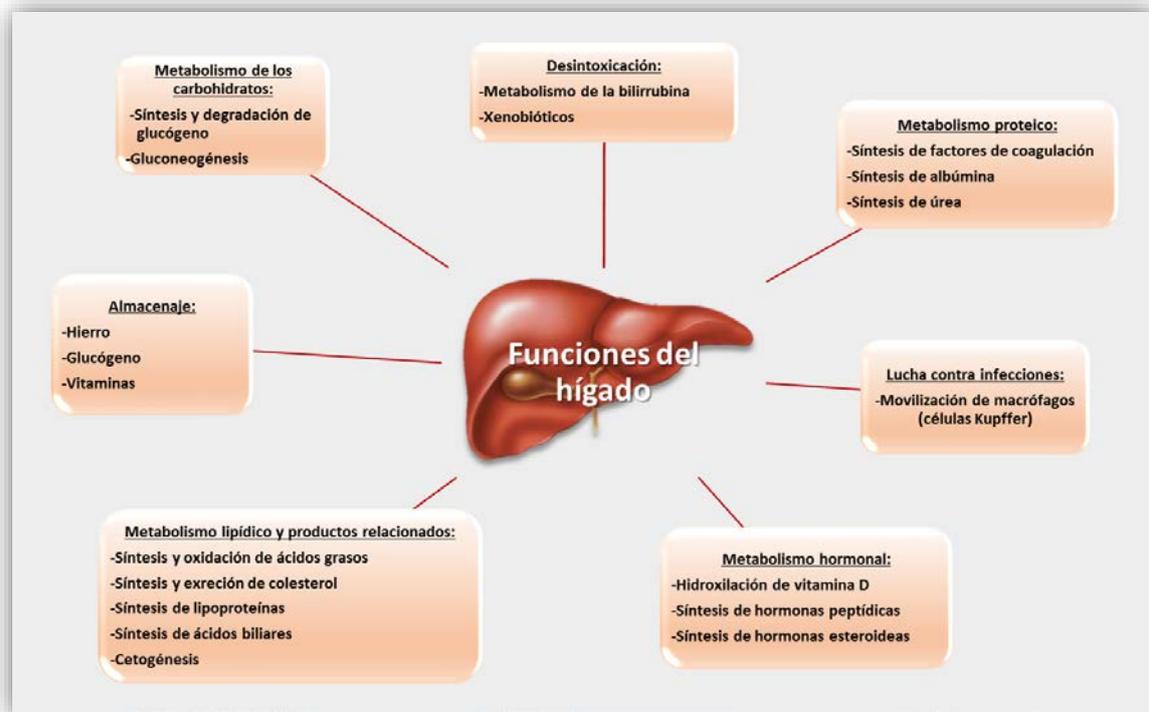


Figura 1.1. Principales funciones del hígado. Fuente: Gyamfi *et al.* (2010).

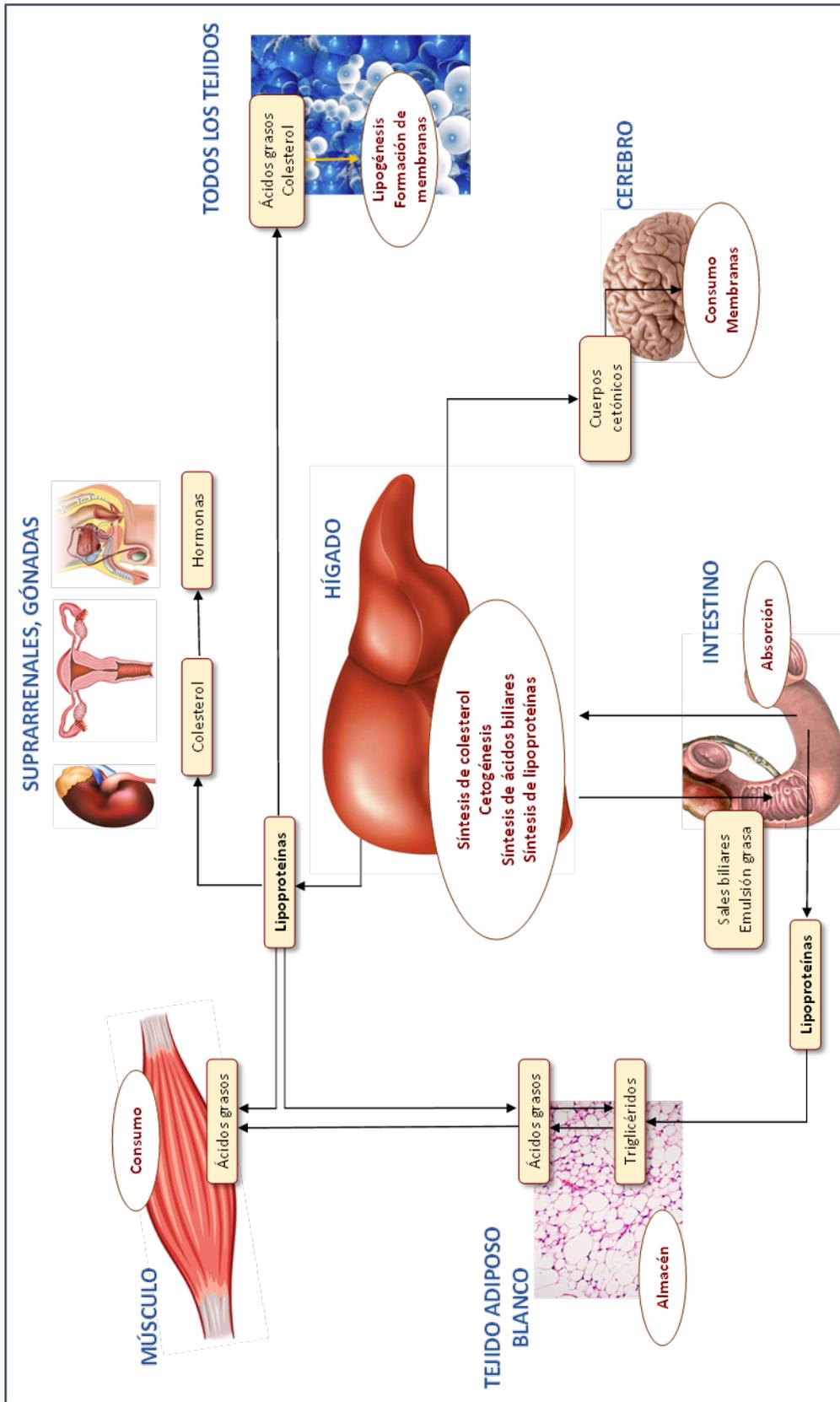


Figura 1.2. Metabolismo lipídico. Fuente: Sánchez-Pozo y Gil-Hernández, (2010).

## 1.2. ESTEATOSIS Y ALTERACIONES DEL METABOLISMO LIPÍDICO DEL HÍGADO

La enfermedad del hígado graso no alcohólico o NAFLD (de las siglas en inglés, *non-alcoholic fatty liver disease*) es un término clinicopatológico que comprende un espectro de enfermedades que abarca desde una simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) hasta esteatosis hepática acompañada de inflamación (esteatohepatitis), fibrosis e incluso cirrosis. Como el mismo término indica, se produce por causas que no implican el consumo de alcohol (menos de 140 g etanol/semana para hombres y 70 g en el caso de mujeres) ni la presencia de marcadores relacionados con enfermedad hepática de carácter vírico, congénito o autoinmune. Se trata de la alteración hepática más común a nivel mundial, con una prevalencia bastante elevada, que se ha incrementado recientemente de forma dramática y que continuará haciéndolo debido a su relación con el síndrome metabólico, puesto que la obesidad, la diabetes tipo 2, la hiperglucemia y la dislipemia son los factores de riesgo más importantes. Por este motivo, el estado de NAFLD está fuertemente asociado al consumo excesivo de calorías, la inactividad física, resistencia a la insulina y factores genéticos (Wei *et al.*, 2008; Musso *et al.*, 2009).

Esta patología se caracteriza por un exceso de lípidos en el hígado, suponiendo la presencia de vacuolas grasas en al menos un 5 % de hepatocitos, que a su vez suponen el 5-10% del peso del hígado. Esta acumulación de lípidos se genera como consecuencia de un desequilibrio entre la disponibilidad de lípidos (procedentes de los lípidos absorbidos que están presentes en la circulación o de los generados a partir del proceso de lipogénesis), y la eliminación de los mismos, a través de la oxidación de ácidos grasos o de la secreción de lipoproteínas cargadas de triglicéridos. Este desequilibrio desencadena un estrés lipoperoxidativo y por tanto, un daño hepático (Ayala *et al.*, 2008; Musso *et al.*, 2009).

La esteatosis hepática no alcohólica afecta a un 20-25% de la población adulta de los países desarrollados, siendo esta cifra más elevada en el caso de la población estadounidense, hasta un 35% en adultos y un 10% en niños. La frecuencia de la esteatosis hepática no alcohólica varía de forma significativa en función del grupo étnico (45% en hispanicos; 33% en caucásicos; 24% en afroamericanos), siendo esta prevalencia mayor en hispanicos debido a la mayor prevalencia de obesidad y resistencia a la insulina encontrada en este grupo étnico (Browning *et al.*, 2004; Miette *et al.*, 2011)

Además, como se ha descrito anteriormente, esta patología está estrechamente relacionada con el grado de obesidad. De hecho, NAFLD se encuentra presente en un 55-90% de los pacientes adultos con obesidad severa. El caso de los niños es similar, NAFLD se ha hallado presente en un 53% de los niños obesos (Wei *et al.*, 2008; Miette *et al.*, 2011). Esta patología se ha dado preferentemente en la población adulta; sin embargo, debido a la elevada prevalencia de la obesidad en la población infantil, los casos de NAFLD están aumentando, de forma paralela al incremento de niños obesos (Parekh y Anania, 2007, Fon Tacer y Rozman, 2011).

### 1.2.1. Patogénesis de la NAFLD

Actualmente, la hipótesis más apoyada defiende la existencia de dos impactos o *hits* (**Figura J**) necesarios para que se produzca la esteatosis hepática no alcohólica o hígado graso y posteriormente, esta progrese a esteatohepatitis o NASH (del inglés: *non-alcoholic steatohepatitis*), la cual conlleva lesión del hepatocito e inflamación (Day y James, 1998). El primer *hit* considera la resistencia a la insulina la causa principal de la aparición de esteatosis. Sin embargo, en el segundo, las causas principales que dirigen a la presencia de NASH son el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica, el aumento de la producción de citoquinas y el proceso de inflamación (Tessari *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2009; Byrne *et al.*, 2009).

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones metabólicas primarias que suponen la acumulación de lípidos en los hepatocitos no están del todo esclarecidas, por lo que, además de la resistencia a la insulina, la evidencia científica indica que la disfunción mitocondrial hepática es fundamental en el proceso de patogénesis de NAFLD (Wei *et al.*, 2008; Byrne *et al.*, 2009). Las alteraciones mitocondriales asociadas con la esteatosis hepática incluyen lesiones ultraestructurales, depleción del ADN mitocondrial, disminución de la actividad de complejos de la cadena respiratoria y daño de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. De hecho, al realizar pruebas de microscopía electrónica se observó que en el estado de NAFLD las mitocondrias eran más grandes e hinchadas, escasas en número, y que su matriz presentaba inclusiones paracristalinas e hipodensidad (Wei *et al.*, 2008)

El hígado desempeña una función crucial en la regulación de la glucosa y metabolismo lipídico. Por tanto, la alteración de los mecanismos normales de síntesis, transporte y eliminación/metabolismo de los ácidos grasos libres y triglicéridos constituye la base del desarrollo del hígado graso o esteatosis hepática. La acumulación de grasa en los hepatocitos se

asocia con un estado de resistencia a la insulina debido a la supresión del proceso de gluconeogénesis hepática y de la lipólisis en los adipocitos. Sin embargo, el mecanismo que enlaza la acumulación de lípidos en el hígado con la resistencia a la insulina no queda del todo claro. El incremento de evidencias científicas indica al respecto, que los factores de transcripción nuclear desempeñan una importante función en este sentido (Ayala *et al.*, 2008). Existen numerosos factores de transcripción nuclear que actúan como reguladores predominantes de la homeostasis metabólica del hepatocito. Entre ellos se encuentran: SREBP (SREBP-1c y SREBP-2), ChREBP, LXR y PPAR (PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ ), cuyas funciones y órganos o tejidos de localización se muestran en la **Tabla 1.1**. El metabolismo de los ácidos grasos en el hígado es regulado de forma transcripcional por dos sistemas recíprocos: PPAR- $\alpha$  controla la degradación de ácidos grasos, mientras que SREBP-1c, activado por LXR, regula la síntesis de ácidos grasos. La evidencia científica sugiere que la regulación recíproca de estos factores podría estar desempeñando una función fundamental en el metabolismo lipídico (Musso *et al.*, 2009; Charatcharoenwitthaya *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012).

**Tabla 1.1.** Factores de transcripción nuclear implicados en la regulación de homeostasis lipídica<sup>1</sup>

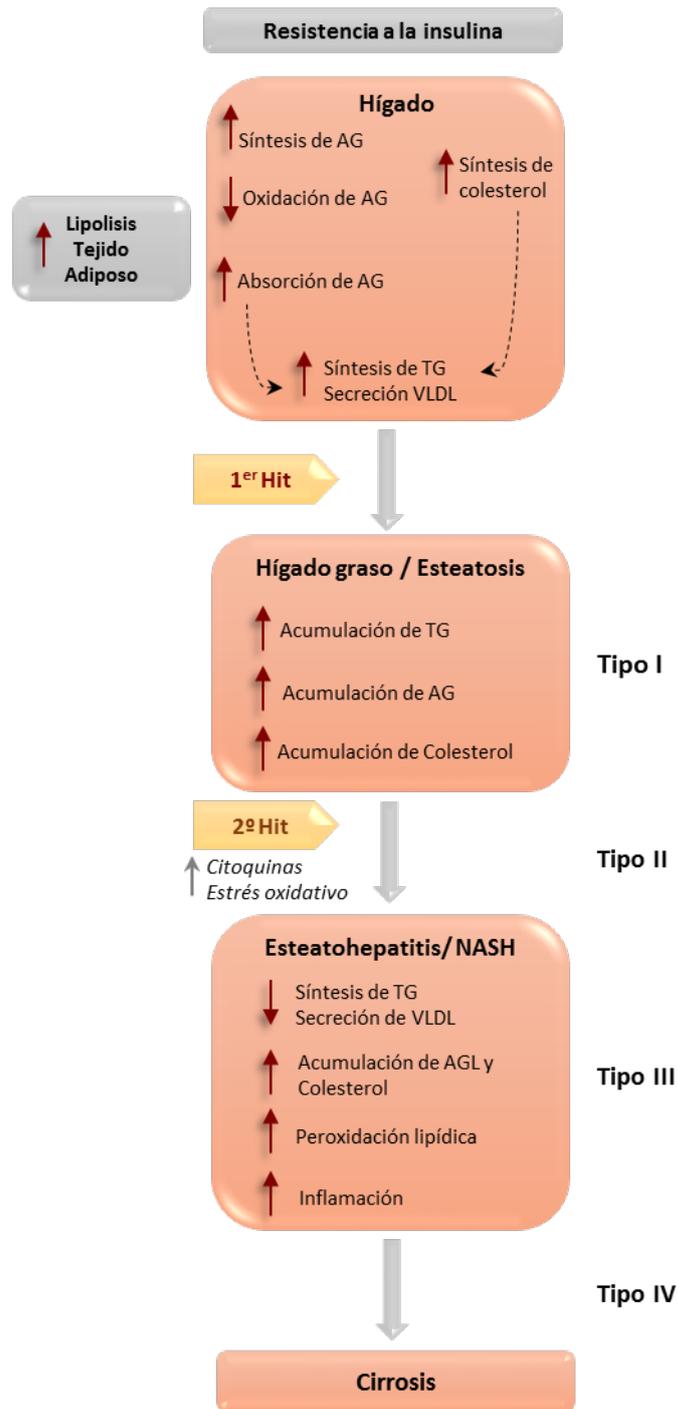
| <b>Factor de transcripción</b> | <b>Localización</b>               | <b>Función</b>   |
|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| SREBP-1c                       | Hígado                            | Aumento de la lipogénesis y disminuye la formación de partículas VLDL                        |
| SREBP-2                        | Hígado                            | Aumento de la síntesis de colesterol   |
| ChREBP                         | Hígado                            | Aumento de la lipogénesis  |
| LXR                            | Hígado, intestino, tejido adiposo | Regulación del metabolismo de colesterol, biosíntesis de lípidos y homeostasis de la glucosa |
| PPAR- $\alpha$                 | Hígado                            | Estimulación de la $\beta$ -oxidación  |
| PPAR- $\gamma$                 | Tejido adiposo                    | Estimulación de la diferenciación de adipocitos con el proceso de lipogénesis incrementado   |

<sup>1</sup>Fuente: Charatcharoenwitthaya *et al.*, 2010

Continuando con el proceso de desarrollo de esteatosis hepática, la cantidad intrahepática de triglicéridos se relaciona directamente con la acción alterada de la insulina en el hígado (la insulina favorece la supresión de la producción de glucosa), en el músculo esquelético (la insulina estimula la absorción de glucosa), y en el tejido adiposo (la insulina

contribuye a la supresión de la lipólisis) (Korenblat *et al.*, 2008). La resistencia a la insulina a nivel sistémico junto con la acción dañada de esta hormona en el músculo esquelético, tejido adiposo y hepatocito, supone un aumento del nivel de ácidos grasos libres circulantes como consecuencia de la incapacidad de las células de gestionar tanto la carga de carbohidratos como la de lípidos. Una regulación adecuada del nivel de ácidos grasos libres (AGL) supondría un aumento de las reservas de glucógeno, una disminución del proceso de lipogénesis *de novo*, un aumento de la liberación hepática de partículas VLDL y una elevación del proceso de oxidación de los AGL. Por el contrario, cuando la acción de la insulina está dañada (resistencia a la insulina) a nivel del tejido adiposo, falla su acción sobre la inhibición de la lipólisis y se genera un aumento de los niveles de AGL a través del torrente sanguíneo en dirección al hígado (Parekh y Anania, 2007).

En el hígado, la hiperinsulinemia y la hiperglucemia generadas por la resistencia a la insulina, inducen la síntesis de ácidos grasos y colesterol, lo que supone un aumento de la síntesis de triglicéridos y de la formación y secreción de partículas VLDL. Sin embargo, la síntesis de triglicéridos supera la secreción de partículas VLDL, lo que genera un exceso acumulado de triglicéridos que contribuyen con el desarrollo del hígado graso (Parekh y Anania, 2007). La síntesis *de novo* de ácidos grasos en el hígado, favorecida por la resistencia a la insulina, se ve incrementada. Sin embargo, la  $\beta$ -oxidación de AGL se encuentra disminuida y, el daño en la síntesis y secreción de ApoB-100 (paso limitante para la formación y disposición de VLDL) supone una reducción de la secreción hepática de triglicéridos en forma de partículas VLDL, agravando el estado de esteatosis y dirigiéndolo hacia un estado de esteatohepatitis (Parekh y Anania, 2007; Korenblat *et al.*, 2008; Fon Tacer y Rozman, 2011) (**Figuras 1.3 y 1.4**).



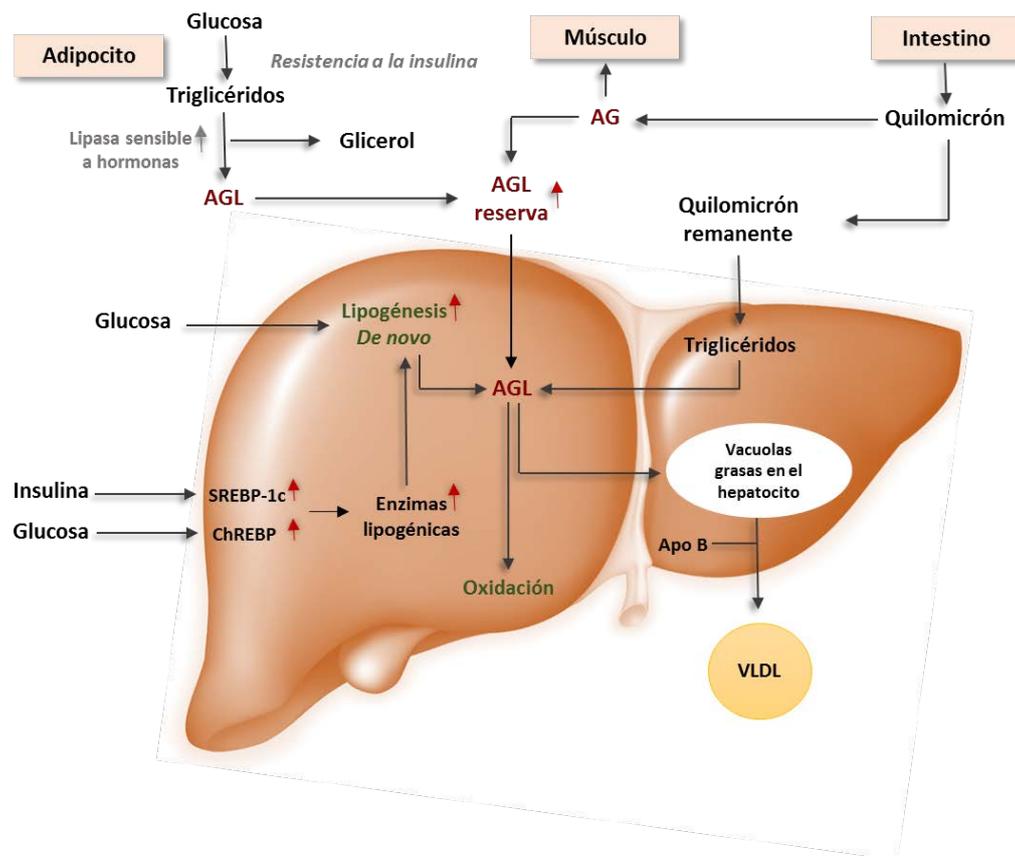
**Figura 1.3.** Esquema de las alteraciones lipídicas inducidas por la resistencia a la insulina y consecuente patogénesis de NAFLD. Los estadios de NAFLD se representan del rango más bajo (Tipo I) al más avanzado (Tipo IV). AG: ácidos grasos; TG: triglicéridos; AGL: ácidos grasos libres. Fuente: Ahmed *et al.*, 2009; Fon Tacer y Rozman, 2011.

La capacidad de la insulina para activar el proceso de lipogénesis es mediada por el factor de transcripción SREBP-1c, que actúa en el núcleo del hepatocito activando todos los genes necesarios para desencadenar la lipogénesis (Ayala *et al.*, 2008). Por tanto, se podría pensar que en un estado de resistencia a la insulina SREBP-1c no fuera activado y sin embargo, se ha observado que incluso cuando existe dicha resistencia, la insulina estimula la transcripción de este factor, favoreciendo el aumento de la biosíntesis de ácidos grasos. Además, SREBP-1c también activa la enzima ACC2, encargada de sintetizar malonil-CoA en la membrana mitocondrial. El aumento de malonil-CoA supone la disminución de la oxidación de los ácidos grasos debido a la inhibición de la enzima CPT-1, encargada del transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria. Otra de las funciones atribuidas a SREBP-1c es la activación del PPAR- $\gamma$ , que normalmente se encuentra en el hígado en niveles muy bajos, ya que se expresa principalmente en el tejido adiposo, donde favorece el proceso de lipogénesis (Browning y Horton, 2004; Fon Tacer *et al.*, 2011).

Por otra parte, el factor de transcripción ChREBP, activado por la glucosa, estimula la actividad de la enzima piruvato quinasa hepática (L-PK), enzima clave del proceso de glucólisis, ya que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, que se incorpora al ciclo de Krebs para producir citrato, fuente principal de acetil-CoA necesario para la síntesis de ácidos grasos. Además, ChREBP puede estimular la transcripción de todos los genes lipogénicos, contribuyendo por tanto a la activación de la lipogénesis (Browning y Horton, 2004).

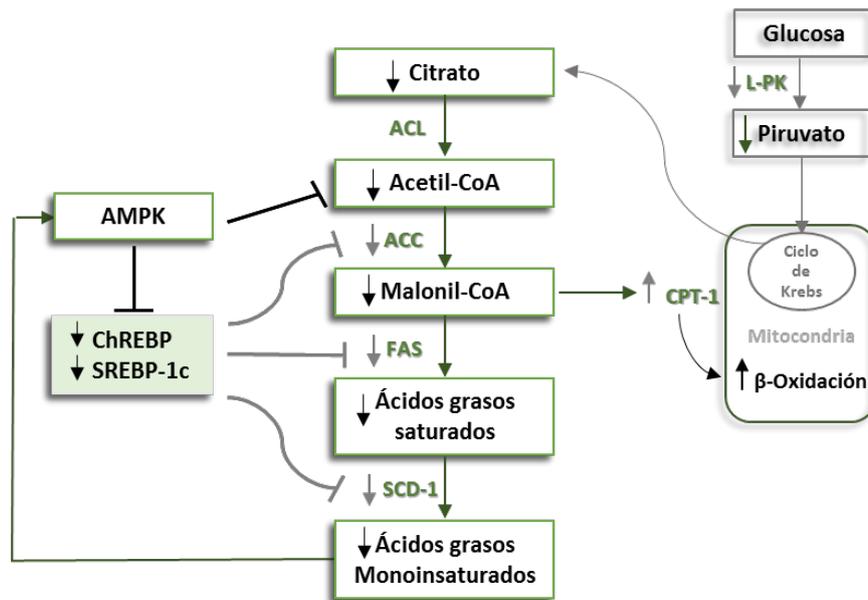
En la **Figura 1.4** se representa el esquema de la homeostasis lipídica en un hígado con esteatosis que presenta resistencia a la insulina, donde se puede observar la intervención de los factores de transcripción mencionados anteriormente

Por otro lado, se ha observado una relación entre la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la presencia de esteatosis hepática. La AMPK actúa como un sensor de los niveles celulares de energía y se activa cuando los niveles de AMP aumentan, lo que indicaría que dichos niveles de energía se encuentran disminuidos. Por tanto, la AMPK activada estimula las rutas catabólicas que suponen la producción de ATP, como la  $\beta$ -oxidación, e inhibe los procesos que consumen ATP, como la lipogénesis (Mhairi *et al.*, 2007). También se activa cuando se suprime la acción de la estearil-CoA desaturasa-1 (SCD-1), enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, y en situaciones de estrés oxidativo y mediante la acción de la adiponectina, entre otros factores (Tessari *et al.*, 2009). Los mecanismos de actuación de AMPK a nivel hepático se pueden observar en la **Figura 1.5**.



**Figura 1.4.** Homeostasis lipídica en el hígado con esteatosis no alcohólica (NAFLD). Fuente: Charatcharoenwittaya *et al.* (2010); Browning y Horton (2004).

La resistencia a la insulina se manifiesta por hiperinsulinemia, incremento de la producción de glucosa en el hígado y disminución de la eliminación de la misma. En los adipocitos, la resistencia a la insulina produce un incremento de la actividad de la enzima lipasa sensible a hormonas, lo que conlleva una elevación del proceso de lipólisis de triglicéridos y por tanto, un aumento del flujo de los ácidos grasos libres (AGL) hacia el hígado. Los ácidos grasos libres pueden ser oxidados en la mitocondria para la producción de ATP o pueden ser esterificados para producir triglicéridos destinados a la reserva o incorporados en partículas VLDL. En el hígado, la hiperinsulinemia induce la expresión del factor de transcripción nuclear SREBP-1c, permitiendo, por tanto, la activación de todos los genes lipogénicos. A su vez, la hiperglucemia activa al factor de transcripción nuclear ChREBP, produciendo el mismo efecto que el anterior. Ambos, SREBP-1c y ChREBP, de forma coordinada actúan sobre todo el grupo de enzimas necesarias para la conversión del exceso de glucosa en ácidos grasos.



**Figura 1.5.** Consecuencias de la activación de AMPK a nivel hepático. Fuente: Adaptado de Browning y Horton (2004).

La activación de AMPK reduce la lipogénesis a través de tres mecanismos independientes: 1) Inhibe la actividad de ACC, por lo que disminuye la formación de malonil-CoA; 2) Inhibe la entrada al núcleo de ChREBP, por lo que se suprime la expresión de la enzima L-PK y la expresión de genes lipogénicos; 3) Se reduce la expresión de SREBP-1c. La activación de AMPK, en este caso por la supresión genética de SCD-1, supone, una disminución de la síntesis de ácidos grasos, disminución de los niveles de malonil-CoA y un aumento de la actividad de la enzima CPT-1, que genera un aumento de la oxidación de ácidos grasos.

### 1.2.2. Regulación de las rutas implicadas en la patogénesis de la NAFLD: Proteínas transportadoras de membrana

La regulación de las rutas implicadas en el metabolismo lipídico del hígado es compleja e implica la participación de receptores nucleares y enzimas celulares, como ya se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, en este sentido, también desempeñan una importante función las proteínas transportadoras de membrana. Las principales proteínas transportadoras implicadas en la translocación a través de la membrana son: caveolinas, proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs), translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) (Musso *et al.*, 2009).

Las caveolinas participan en la señalización celular y procesos que implican el paso de proteínas, y son esenciales para la formación de vacuolas lipídicas (Pol *et al.*, 2004). Por ello, las caveolinas resultan un elemento clave en la regulación de lípidos y en la activación y regeneración celular. La familia de caveolinas está formada por tres miembros (1-3) (Fernández *et al.*, 2006).

Las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs, SLC27A1-6) son una familia de seis proteínas. Se expresan en todos los tejidos con altos niveles de absorción de ácidos grasos tanto para ser metabolizados como para ser almacenados, con diferentes patrones de distribución, es decir, las seis isoformas muestran especificidad por el órgano donde son distribuidas. FATP1 se localiza en tejido adiposo y corazón, FATP2 y FATP5 se expresan en hígado, FATP4 se expresa en intestino y tejido adiposo y por último FATP6, en el corazón. Los niveles de transcripción de ARN y/o proteínas de las diferentes FATPs son regulados por hormonas, como la insulina, por mediadores de inflamación, como TNF- $\alpha$  e IL-1, y de forma muy importante para la homeostasis hepática de ácidos grasos, por los PPAR- $\alpha$  y - $\gamma$  (Doege y Stahl, 2006; Schaiff *et al.*, 2005). FATP5 está asociada al metabolismo lipídico del hígado, por lo que se encuentra situada en la membrana plasmática del hepatocito. Además, al igual que el resto de miembros de esta familia, FATP5 incrementa la absorción de ácidos grasos cuando está sobreexpresada (Doege *et al.*, 2006).

La translocasa de ácidos grasos FAT/CD36 acelera la disociación de los ácidos grasos de la albúmina y cataliza su integración dentro de la bicapa externa de la membrana plasmática. Se encuentra en un compartimento vesicular (endosomal) en el interior de la célula de algunos tejidos como el músculo, tejido adiposo, corazón y otros. Sin embargo, se expresa muy poco en los hepatocitos. Se trata de una proteína multifuncional, ya que además de aumentar la absorción de ácidos grasos a nivel celular, también actúa como receptor para diferentes ligandos, como el colágeno I y IV, VLDL y partículas oxidadas LDL, y favorece la formación de células en espuma a partir de los macrófagos (Febbraio y Silverstein, 2007).

La evidencia científica ha sugerido que la inducción de transportadores específicos FAT/CD36 en el hígado conlleva hepatomegalia e hígado graso, lo que sugiere que desempeñan una función en la absorción de ácidos grasos (Bradbury, 2006). En particular, recientes estudios han propuesto que el incremento de la actividad de este transportador en el hígado puede ser un factor crítico en el desarrollo de esteatosis bajo condiciones patológicas, como pueden ser la ingesta de una dieta alta en grasa, la obesidad y la diabetes (Koonen *et al.*, 2007). Además, en

pacientes con NAFLD, la expresión génica de CD36 en el hígado se vio incrementada y se correlacionó con el contenido de grasa hepática (Greco *et al.*, 2008). La activación de los receptores nucleares PPAR, LXR y PXR (*pregnane X receptor*) aumentan la expresión del transportador CD36 (Zhou *et al.*, 2008).

Por otra parte, las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) pueden facilitar el transporte de ácidos grasos y otros mediadores lipídicos a través de las membranas celulares. Se localizan en el citosol, donde pueden facilitar el transporte intracelular de ácidos grasos y otras moléculas lipofílicas a través del citosol a sus receptores nucleares (PPARs, RAR, LXR- $\alpha$  y NF-KB), por lo tanto controlan la disponibilidad de ligandos para regular la transcripción de genes implicados en importantes procesos metabólicos e inflamatorios (Helledie *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2001, Tan *et al.*, 2002). Existen 9 tipos de FABP (1-9) (**Tabla 1.2**) que se encuentran distribuidos en diferentes tejidos específicos, aunque también se pueden encontrar en otros tejidos en menor concentración (Musso *et al.*, 2009).

**Tabla 1.2.** Distribución de las FABPs en los distintos órganos o tejidos\*

| FABPs            | Órgano o tejido  |
|------------------|--|
| Fabp 1 / L-Fabp  | <b>Hígado, intestino delgado, páncreas, riñón</b>                      |
| Fabp 2 / I-Fabp  | <b>Intestino delgado</b>   |
| Fabp 3 / H-Fabp  | <b>Corazón, músculo esquelético, glándula mamaria, blastocitos</b>     |
| Fabp 4 / A-Fabp  | <b>Adipocitos, macrófagos</b>  |
| Fabp 5 / E-Fabp  | <b>Piel, lengua, ojos, glándula mamaria, riñón, hígado, adipocitos</b> |
| Fabp 6 / IL-Fabp | <b>Íleon</b>   |
| Fabp 7 / B-Fabp  | <b>Cerebro</b>   |
| Fabp 8 / MP2     | <b>Mielina</b>   |
| Fabp 9 / T-Fabp  | <b>Testículos</b>  |

\*Los órganos o tejidos en negrita son aquellos en los que se halla la FABP en mayor abundancia.  
Fuente: Musso *et al.* (2009).

### 1.2.3. Progresión de la NAFLD

La esteatosis hepática, como se ha mencionado anteriormente, podría progresar a un estado de esteatohepatitis o NASH, mediante los mecanismos propuestos en la hipótesis del segundo impacto o *hit*. Como hemos visto, el primer *hit* supone la acumulación de triglicéridos en el hígado; sin embargo, en el segundo *hit* comienzan a manifestarse daños provocados por el estrés oxidativo y el aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias.

#### ***Estrés oxidativo***

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan de forma normal durante el metabolismo intracelular y también a partir de sustancias exógenas y pueden reaccionar con compuestos biológicos como, las proteínas, los ácidos grasos y el ADN. Las mitocondrias, los peroxisomas y el metabolismo del citocromo P450 son las principales fuentes de producción de ROS. En NASH, la sobrecarga de lípidos en el hígado supone un incremento de la oxidación de los ácidos grasos y por tanto, una importante fuente de generación de ROS. El exceso formado de ROS desencadena una disfunción mitocondrial y, como resultado, se produce la pérdida de electrones durante la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, que reaccionan con moléculas de oxígeno dando lugar a aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (Dowman *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2008), contribuyendo por tanto, al desarrollo del estrés oxidativo.

A su vez, la generación de ROS en un entorno enriquecido de lípidos induce la peroxidación lipídica (especialmente a partir de ácidos grasos poliinsaturados), que libera derivados reactivos de los aldehídos, como el malondialdehído (MDA), que tienen efectos perjudiciales sobre los hepatocitos y otras células hepáticas. En los hepatocitos, ROS, especies reactivas de nitrógeno y productos de la peroxidación lipídica dañan la cadena respiratoria, tanto de forma directa (como se ha comentado anteriormente) como de forma indirecta, mediante el daño oxidativo del genoma mitocondrial (Koek *et al.*, 2011). Por otra parte, ROS y productos de la peroxidación lipídica incrementan la generación de citoquinas que desempeñan una función crucial en la aparición de inflamación, fibrosis y muerte celular. Además, el estrés oxidativo no sólo afecta al hígado, sino que produce alteraciones en la síntesis de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias secretadas por el tejido adiposo (Parekh y Anania, 2007).

### **Productos de la peroxidación lipídica**

La peroxidación lipídica o reacción de oxígeno con ácidos grasos insaturados produce una amplia variedad de productos oxidados, como alcanos, aldehídos, peróxidos o radicales peroxilo. Entre los aldehídos que pueden ser formados como productos secundarios de la peroxidación lipídica se encuentra el malondialdehído (MDA). El MDA es un producto final generado por descomposición del ácido araquidónico y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Koek *et al.*, 2011). Posee una elevada capacidad de reacción con múltiples biomoléculas, como las proteínas o el ADN, dando lugar a la producción de aductos. Estos aductos de MDA son de gran importancia biológica debido a su poder de participación en reacciones deletéreas mediante alteraciones cruzadas de proteínas y ADN, tanto a nivel intra como intercelular, generando profundas alteraciones en las propiedades bioquímicas de biomoléculas que se acumulan durante el envejecimiento y las enfermedades crónicas (Ayala *et al.*, 2014). Además, el MDA presenta una vida media más larga que ROS, lo que supone una mayor extensión de los efectos causados por el estrés oxidativo. Cuando la formación de este compuesto se lleva a cabo en la membrana mitocondrial debido a la presencia del ácido docosahexanoico (DHA), se produce una disminución de la actividad de la cadena respiratoria como consecuencia del estrés oxidativo causado a nivel celular (Browning y Horton, 2004)

Otro de los compuestos secundarios derivados de la peroxidación lipídica son los F<sub>2</sub>-isoprostanos o también denominados 8-iso-PGF<sub>2</sub>α (Koek *et al.*, 2011). Estos compuestos se generan por oxidación del ácido araquidónico presente en los fosfolípidos. Inicialmente se forman *in situ* sobre los fosfolípidos y después son liberados por acción de una fosfolipasa. Poseen una importante actividad biológica y pueden ser medidores de algunos de los efectos adversos producidos por el daño oxidativo. De hecho, su determinación se considera el estándar de oro para la evaluación del daño oxidativo *in vivo* (Guha *et al.*, 2003).

### **Citoquinas proinflamatorias**

El daño generado por ROS en los hepatocitos, afectando membranas, proteínas y ADN, junto con los productos de la peroxidación lipídica, induce una respuesta inflamatoria que implica una producción excesiva de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF-α), y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6).

Los efectos de TNF- $\alpha$  en NASH se encuentran aumentados debido a la alteración del perfil de citoquinas y el aumento de la expresión de su receptor a nivel hepático, causando una peroxidación lipídica adicional en las membranas mitocondriales que supone la alteración de su función y la inducción de estrés oxidativo. Además, TNF- $\alpha$  se ha encontrado sobreexpresada en el hígado de ratones obesos y se ha observado su intervención en la resistencia a la insulina. Por otra parte, se ha demostrado que TNF- $\alpha$  activa la síntesis de colesterol e inhibe su eliminación a través de los ácidos biliares, por lo que contribuye al aumento de los niveles de colesterol LDL y a la disminución de los niveles de colesterol HDL (Fon Tacer *et al.*, 2011). Su expresión se encuentra aumentada en hígado y tejido adiposo.

Los miembros de la familia de citoquinas IL-1 se producen en macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. Dentro de esta familia se encuentran las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y ambas han mostrado tener una implicación en el progreso de una esteatosis simple a NASH y fibrosis hepática (Stojsavljević *et al.*, 2014).

IL-6 es una citoquina proinflamatoria producida por adipocitos, hepatocitos, células endoteliales y células del sistema inmune. A pesar de su reducido tamaño, los adipocitos viscerales son los mayores productores de esta citoquina en comparación con los adipocitos subcutáneos, hecho observado en pacientes con NAFLD tanto obesos como delgados que mostraron un perfil similar de IL-6. Su implicación en el metabolismo de la glucosa, en la resistencia a la insulina, así como en la patogénesis de NASH ha sido demostrada en numerosos estudios, tanto en modelos animales como en humanos (Stojsavljević *et al.*, 2014)

#### **1.2.4. NAFLD y Síndrome metabólico**

La enfermedad del hígado no alcohólica es considerada como un componente del síndrome metabólico o su manifestación hepática, debido a la fuerte asociación existente entre esta patología y las manifestaciones propias de dicho síndrome (Kotronen y Yki-Järvinen, 2007, Vanni *et al.*, 2010). El síndrome metabólico está formado por un conjunto de alteraciones metabólicas que implican un aumento del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2, entre las que se encuentran la obesidad, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la dislipemia (Albornoz-López y Pérez Rodrigo., 2012). De hecho, la prevalencia de NAFLD aumenta hasta un 70-90% en personas que padecen obesidad o diabetes mellitus tipo 2 (Targher *et al.*, 2007). En relación a la obesidad, se ha observado que la distribución de la grasa

también puede desempeñar una importante función en el desarrollo de NAFLD, ya que la obesidad troncal se ha asociado con NAFLD incluso en pacientes con un índice de masa corporal (IMC) normal (Parekh y Anania, 2007).

La importancia de NAFLD y su relación con el síndrome metabólico ha estimulado el interés sobre la posible implicación de esta patología en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (EC). En pacientes con NAFLD, el hígado genera varios factores de carácter aterogénico, como las citoquinas y determinadas lipoproteínas. De este modo, el hígado graso está asociado con un incremento plasmático de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos, combinado con unas concentraciones disminuidas de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que supone una amenaza para el desarrollo de EC (Targher *et al.*, 2007, Vanni *et al.*, 2010).

Las alteraciones del metabolismo lipídico en el hígado graso se caracterizan por un sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Por otra parte, las partículas LDL pequeñas y densas (sdLDL) son la subclase de LDL consideradas como más aterogénicas y sus concentraciones se encuentran elevadas en el síndrome metabólico y el hígado graso. Por tanto, el perfil dislipémico asociado al hígado graso se caracteriza por elevadas concentraciones de VLDL y LDLs y una disminución de partículas HDL correlacionadas con el contenido de lípidos intrahepático (Fon Tacer y Rozman, 2011).

Además, recientes estudios han sugerido que el aumento de la enzima hepática alanina aminotransferasa (ALT) puede suponer un aumento del riesgo de EC. En concreto, el estudio Hoorn (Schindhelm *et al.*, 2007) mostró que ALT es capaz de predecir eventos cardiovasculares independientemente de los factores de riesgo y las características del síndrome metabólico. Otro estudio realizado por Targher *et al.* (2007) observó que los principales resultados obtenidos en pacientes diabéticos tipo 2 eran la presencia de NAFLD y EC. En este sentido, existe una mayor evidencia que sostiene que la relación entre NAFLD y aterosclerosis refleja principalmente el impacto del síndrome metabólico, particularmente por el incremento de la resistencia a la insulina y la grasa abdominal visceral, posiblemente a través de la secreción de sus múltiples factores, como son los ácidos grasos libres, el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), interleuquina-6 (IL-6) y otras citoquinas proinflamatorias (Targher *et al.*, 2007). Por ello, se sostiene que NAFLD mediante su posible capacidad de acelerar la progresión de la dislipemia, la resistencia a la insulina, el proceso de aterosclerosis, la disfunción endotelial, la inflamación y el estrés oxidativo, dirige hacia un aumento del riesgo de EC (Byrne *et al.*, 2009).

NAFLD y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) coexisten con frecuencia debido a los factores de riesgo que comparten (exceso de adiposidad y resistencia a la insulina). La prevalencia de DM2 o la alteración de la glucosa en ayunas, se presenta en un 18-33% de los pacientes con NAFLD, mientras que esta patología hepática presenta una prevalencia de entre 49-62% de DM2. Por tanto, DM2 es un factor de riesgo de la progresión de la enfermedad hepática y mortalidad en pacientes con NAFLD, mientras que NAFLD podría ser un marcador de riesgo cardiovascular y mortalidad en individuos con DM2. Ambos, NAFLD y DM2 están relacionados con las alteraciones adversas del otro. Por ello, el diagnóstico y evaluación del hígado graso es una parte importante del tratamiento de la diabetes (Obika *et al.*, 2012).

La mayoría de los pacientes con NAFLD presentan una alteración de las aminotransferasas con concentraciones elevadas de ALT y AST. El grado de transaminitis se manifiesta con frecuencia en un grado ligero y con frecuencia dentro de 1-4 veces su límite normal, con ALT mayor que AST. Sin embargo, el grado de aumento de ALT no se correlaciona con la severidad histológica de esteatosis o fibrosis. De hecho, una gran proporción de pacientes con NAFLD presentan niveles normales de las enzimas hepáticas, y una parte de ellos padecen fibrosis relacionada con esteatohepatitis a pesar de que los niveles de ALT se encuentren dentro de la normalidad (Kotronen y Yki-Järvinen, 2007; Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010; Miette *et al.*, 2011).

### 1.3. ESTRATEGIAS NUTRICIONALES EN EL TRATAMIENTO DE LA NAFLD

La modificación del estilo de vida constituye una parte imprescindible del tratamiento de la enfermedad del hígado graso. El objetivo general de la modificación del estilo de vida es conseguir, de forma progresiva, la pérdida de peso en los pacientes obesos mediante la realización de ejercicio físico y modificaciones dietéticas. Los factores principales que contribuyen con el aumento del flujo de ácidos grasos a través del hígado de pacientes con NASH se han identificado mediante la detección de alteraciones en la lipólisis del tejido adiposo y el proceso de lipogénesis *de novo* producida en el hígado debido a un consumo excesivo de hidratos de carbono (Anderson y Borlak, 2008). Dentro de estos factores se encuentra la resistencia a la insulina, ya que la insulina favorece la supresión postprandial de la lipólisis en el adipocito. La hiperinsulinemia junto con el metabolismo periférico de la glucosa dañado favorece la estimulación de la lipogénesis *de novo* en el hígado (Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010).

Las modificaciones dietéticas implican la reducción de aquellos alimentos que estimulan la resistencia a la insulina o la toxicidad lipídica en el hígado. Además, se ha observado cómo la pérdida de peso disminuye la resistencia a la insulina y el contenido de lípidos en el hígado (Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010). En este sentido, la ingesta de una dieta con bajo contenido en grasas totales y, especialmente reducida en grasas saturadas y grasas trans, así como una adecuada ingesta de fibra dietética y de alimentos con elevado contenido en compuestos antioxidantes suponen una mejora del estado de NAFLD (Vitaglione *et al.*, 2004; Hui-Hui y Jason Pik-Eu., 2010).

Un modelo de dieta, bien conocido, que abarca todas estas características es la dieta Mediterránea. De hecho, un estudio llevado a cabo en individuos con NAFLD observó fuertes evidencias de los beneficios de la dieta Mediterránea en la mejora de la esteatosis hepática y de la sensibilidad a la insulina, después de consumirla durante 6 semanas (Ryan *et al.*, 2013). La dieta Mediterránea se caracteriza por un elevado consumo de frutas y verduras, legumbres y carbohidratos complejos, con un consumo moderado de pescado y de aceite de oliva como fuente principal de grasa, y una cantidad baja-moderada de vino tinto durante las comidas (Sofi *et al.*, 2010). La dieta Mediterránea, al incorporar una amplia variedad de frutas y verduras, proporciona cantidades adecuadas de compuestos bioactivos con conocidos efectos beneficiosos debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Vitaglione *et al.*, 2004; Dongiovanni *et al.*, 2015).

En este sentido, numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la función tan importante que desempeña el consumo de compuestos antioxidantes a través de la dieta para mejorar la salud hepática, ya que una de las principales causas de la patogénesis de NAFLD es el estrés oxidativo (Vitaglione *et al.*, 2004; Dongiovanni *et al.*, 2015). Dentro de estos compuestos, se encuentran los compuestos fenólicos, las vitaminas C y E, y los carotenoides como el  $\beta$ -caroteno y el licopeno, entre otros (Vitaglione *et al.*, 2004; Pisoschi y Pop, 2015;).

### **1.3.1. Zumo de tomate**

El tomate y sus productos derivados constituyen una fuente fundamental de la alimentación para la población mundial, y además, son un componente esencial de la dieta Mediterránea. El tomate, al igual que otros vegetales que forman parte de nuestra dieta, supone una importante fuente de compuestos beneficiosos para la salud, como son los carotenoides, compuestos fenólicos y vitaminas (García-Valverde *et al.*, 2011; Raiola *et al.*, 2014). A

continuación se detallan aspectos relacionados con su composición nutricional y los beneficios aportados a la salud derivados de su consumo.

### **Composición nutricional**

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) está constituido principalmente de agua (93-95%). El resto de componentes (5-7%) lo forman azúcares, proteínas, fibra, ácidos orgánicos, minerales, pigmentos, vitaminas y lípidos (Jones *et al.*, 1991).

Entre los azúcares simples, destacan principalmente la glucosa, la fructosa y la sacarosa y su concentración depende de la variedad y de las condiciones de cultivo. Entre los hidratos de carbono indigestibles, su contenido en fibra dietética oscila en un rango de 0.8-1.3 g por 100 g de tomate, destacando principalmente la porción insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina) y en menor proporción la fibra soluble (pectinas) (Hedges y Lister, 2005; Navarro-González *et al.*, 2011). Respecto a la grasa, su contenido es muy bajo (0.2%) y aproximadamente la mitad la componen ácidos grasos poliinsaturados, mostrando también un bajo contenido en proteínas (1%). Todo ello contribuye a que se trate de un alimento con poco valor energético, ya que 100 g de tomate aportan alrededor de 20 Kcal. Respecto al contenido de vitaminas y minerales, destacan principalmente las vitaminas A, C, E, el ácido fólico y el potasio, por su elevado contenido (Jones *et al.*, 1991; Willcox *et al.*, 2003; Hedges y Lister, 2005; Iniesta *et al.*, 2009; Periago *et al.*, 2009).

Dentro de los pigmentos se encuentran presentes: las clorofilas (pigmentos verdes), los carotenoides (principalmente licopeno) y las xantofilas (pigmentos amarillos). El licopeno, compuesto responsable del color rojo característico de este fruto, es el carotenoide más abundante, ya que constituye el 75-83 % del total de carotenoides. También destaca el  $\beta$ -caroteno por su actividad como provitamina A y supone un 3-7% de los carotenoides presentes en el tomate (Rao y Agarwal, 1999; Dorais *et al.*, 2001). También contiene otros carotenoides como el fitoeno, fitoflueno, neurosporeno,  $\alpha$  y  $\gamma$ - caroteno, luteína y zeaxantina (Khachik *et al.*, 2002).

El tomate por su contenido en compuestos bioactivos, entre los que se encuentran los carotenoides y compuestos fenólicos, así como por el aporte de vitaminas C (ácido ascórbico) y E ( $\alpha$ -tocoferol), es considerado un alimento de gran importancia nutricional debido a sus

propiedades antioxidantes. Además, aporta elementos traza como el selenio y el zinc, que también contribuyen al aumento de la actividad antioxidante (Thompson *et al.*, 2000; Martínez-Valverde *et al.*, 2002). En lo que respecta a dicha capacidad antioxidante, el tomate ha sido situado como primera fuente de licopeno, segunda fuente de vitamina C,  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides y en tercer lugar como fuente de vitamina E (García-Closas *et al.*, 2004), los cuales, a excepción de la vitamina C, contribuyen con la actividad antioxidante de carácter lipofílico (García-Alonso *et al.*, 2009). Además, contiene cantidades moderadas de compuestos fenólicos entre los que se encuentran fenoles, flavonoides (quercetina, Kaempferol, miricetina, rutina y naringenina), y ácidos hidroxicinámicos (ácido caféico, clorogénico, ferúlico y  $p$ -cumárico), concentrados principalmente en la piel (Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Minoggio *et al.*, 2003; García-Valverde *et al.*, 2011), los cuales contribuyen principalmente con la actividad antioxidante hidrófila.

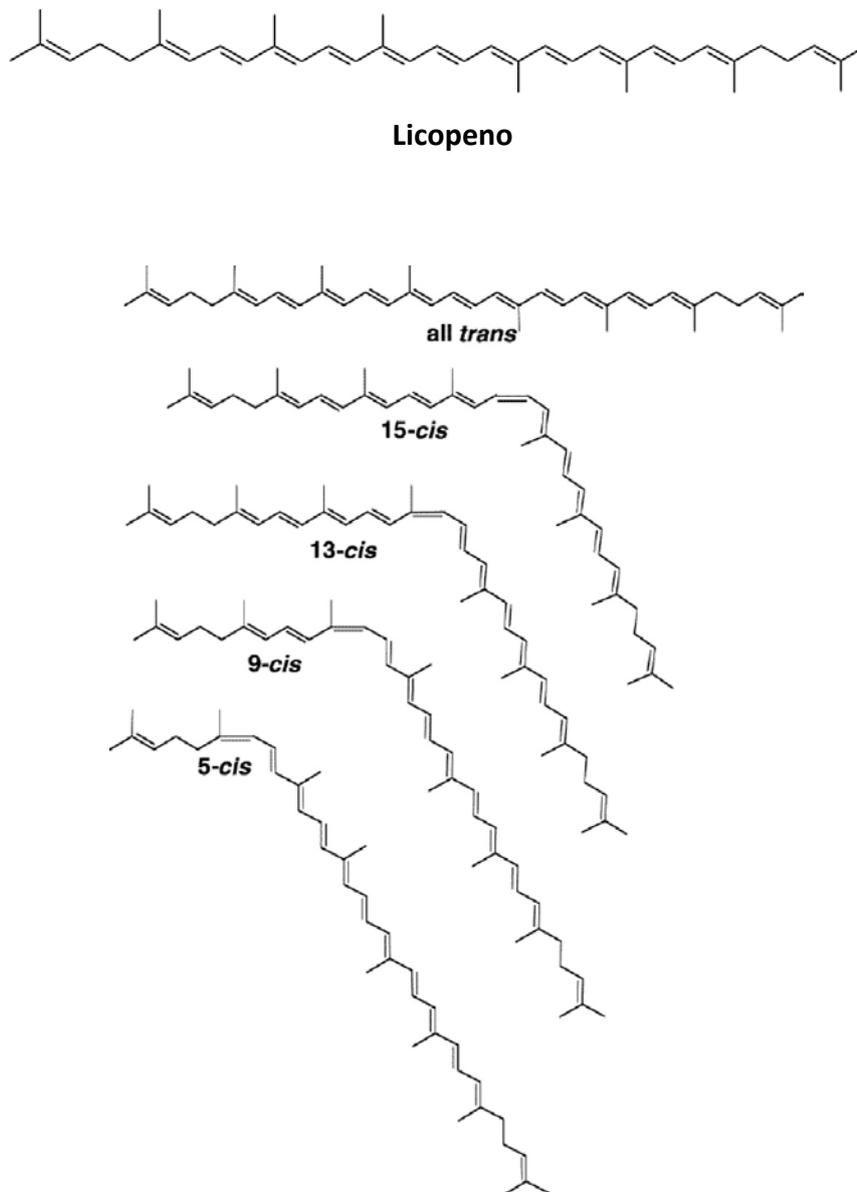
Más del 80 % de los tomates producidos se consumen en forma de productos procesados, entre los cuales se encuentra el zumo de tomate. El zumo de tomate se obtiene a partir del triturado de los tomates enteros a los cuales se les retira la piel y las semillas (Hayes *et al.*, 1998). Su composición nutricional (**Tabla 1.3**) es similar a la del tomate, aunque en algunos casos puede variar en función del procesado y las condiciones de almacenamiento (Shi y Le Maguer, 2000; Anese *et al.*, 2002). El proceso de homogenización, el tratamiento térmico y la incorporación de aceite durante el procesado suponen un incremento de la biodisponibilidad del licopeno, mientras que, a su vez, podría suponer la pérdida de otros nutrientes (Wilcox *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 1998).

**Tabla 1.3.** Contenido de los principales antioxidantes en el zumo de tomate (USDA 2006, Tonucci *et al.*, 1995).

| <b>Componentes</b>               | <b>Concentración<br/>(mg/100 g)</b> |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Ácido ascórbico</b>           | 18.3                                |
| <b>Vitamina E</b>                | 0.32                                |
| <b>Carotenoides:</b>             |                                     |
| <i><b>β-caroteno</b></i>         | 0.27                                |
| <i><b>Licopeno</b></i>           | 9.04                                |
| <i><b>Luteína+Zeaxantina</b></i> | 0.06                                |
| <i><b>Fitoeno</b></i>            | 1.90                                |
| <i><b>Fitoflueno</b></i>         | 0.83                                |
| <b>Compuestos fenólicos:</b>     |                                     |
| <i><b>Kaempferol</b></i>         | 0.06                                |
| <i><b>Miricetina</b></i>         | 0.05                                |
| <i><b>Quercetina</b></i>         | 1.46                                |

### 1.3.2. Licopeno: carotenoide principal del tomate.

El licopeno es el carotenoide más abundante presente en el tomate y el responsable de su coloración rojiza. Además, el licopeno se encuentra presente en otras fuentes como la sandía, el pomelo rosa, guayaba y la papaya. Es uno de los antioxidantes más potentes debido a su capacidad para captar radicales libres. Se trata de un poliisoprenoide de cadena abierta formado por 40 átomos de carbono y 11 dobles enlaces conjugados (**Figura 1.6**), cuya estructura acíclica le impide desarrollar actividad vitamínica A (Shi y Le Maguer, 2000).



**Figura 1. 6.** Estructura química del licopeno y sus isómeros. Fuente: Agarwal y Rao (2000); Kopsell y Kopsell (2006).

El licopeno presente en el tomate se encuentra principalmente en configuración *all-trans* (94-96%), aunque también se pueden encontrar isómeros *cis* en la naturaleza, incluyendo 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-*cis*, debido a la influencia del calor, la luz o determinadas reacciones químicas. Sin embargo, el procesado del tomate para la elaboración de productos derivados como el zumo, ketchup, pasta o salsa de tomate, favorece la transformación de la forma *trans* a la forma *cis*. Las principales causas de degradación durante el procesado son la isomerización y la oxidación. Los isómeros *cis* incrementan con la temperatura, el tiempo de procesado y la presencia de componentes de la matriz del alimento como son aceites o grasas (Shi y Le Maguer, 2000). Los isómeros *cis* presentan características físicas y químicas diferentes a las del isómero *trans*, entre las que se encuentran, una disminución de la intensidad del color, menor punto de fusión, mayor polaridad, menor tendencia a la cristalización y mayor solubilidad en aceite y solventes hidrocarbonados, así como una menor estabilidad (Nguyen y Schwartz, 1999). La presencia de aceite o grasa enlentece la reacción de isomerización y protege a los isómeros *cis* y *trans* de la oxidación (Nguyen y Schwartz, 1998). En los productos procesados del tomate, la oxidación es un proceso complejo que depende de muchos factores, tales como, las condiciones de procesado, exposición al aire, el contenido de humedad del producto, la temperatura, la presencia de sustancias prooxidantes o autooxidantes y el tipo de lípidos. Los factores más importantes que pueden determinar la degradación del licopeno son el calor, la luz y el oxígeno, aunque también la favorecen parámetros como la presencia de iones metálicos y un pH ácido (Agarwal *et al.*, 2001; Lee y Chen, 2002; Shi *et al.*, 2002).

### ***Biodisponibilidad del licopeno***

La biodisponibilidad del licopeno, es decir, su absorción en el organismo, puede verse afectada por varios factores (Kopsell y Kopsell, 2006). Los isómeros *cis* presentes en los alimentos tienen una mayor biodisponibilidad que los isómeros *trans*. La biodisponibilidad del licopeno en productos procesados es mayor que en los tomates frescos sin procesar. La composición y la estructura del alimento también influyen en la biodisponibilidad y pueden afectar a la liberación del licopeno de la matriz del tejido del tomate. De hecho, la adición de lípidos, incrementa su absorción, debido a su naturaleza lipofílica y, sin embargo, la presencia de un elevado contenido en fibra puede disminuirla (Goñi *et al.*, 2006; Fernández-García *et al.*, 2012). Además, el procesado del alimento puede mejorar la biodisponibilidad del licopeno a través de la ruptura de las paredes celulares, lo que debilita las fuerzas de unión entre el licopeno

y la matriz del tejido, aumentando, por tanto, la accesibilidad de este e incrementando la isomerización a *cis*-licopeno (Shi y Le Maguer, 2000).

El licopeno, por su naturaleza lipofílica, requiere ser solubilizado para poder atravesar la barrera intestinal tras ser liberado de la matriz del alimento. Su absorción se ve facilitada por la presencia de lípidos procedentes de la dieta, como triglicéridos, colesterol y fosfolípidos, que forman micelas de diverso tamaño y composición (Baskaran *et al.*, 2003). Al contrario que ocurre con otros carotenoides más polares procedentes de la dieta, el licopeno se incorpora en la zona más lipofílica de estas micelas, donde forma un gran número de interacciones hidrofóbicas con sus constituyentes. Tras la acción de la lipasa pancreática sobre la micela lipídica, el licopeno es transferido a las micelas formadas por las sales biliares, las cuales atraviesan la fase acuosa del lumen intestinal hacia las membranas de los enterocitos y posteriormente se dirigen por difusión pasiva al citoplasma. Además de este sistema de incorporación al enterocito, diversos estudios *in vitro* han observado la implicación de transportadores de membrana específicos (SB-RI, CD36) que facilitan la absorción intracelular de los carotenoides (Reboul *et al.*, 2005; During y Harrison, 2005), lo que también supondría la participación de un transporte activo. Una vez en los enterocitos, el licopeno es transportado a través de los quilomicrones hacia el hígado por el sistema linfático y portal (During y Harrison, 2005). Una vez en el hígado, este es transportado hacia el resto de tejidos periféricos mediante su unión a lipoproteínas, especialmente a través de las partículas LDL (Clinton, 1998; Kopsell y Kopsell, 2006). Las proteínas intestinales de unión facilitan la absorción de otros carotenoides y podrían también reforzar la absorción del licopeno o sus metabolitos (Borel *et al.*, 2005).

El 90% del licopeno dietético se encuentra en configuración *all-trans*, sin embargo, en los tejidos y fluidos corporales humanos predominan los isómeros *cis* (25-70%) (Richelle *et al.*, 2010). La evidencia científica indica que los isómeros *cis* se absorben más rápidamente a través de los enterocitos y tienen mayor preferencia para acumularse en los tejidos que los isómeros *trans* (Boileau *et al.*, 2002, Stahl y Sies, 1992). Los mecanismos responsables de la absorción favorecida de los isómeros *cis* pueden explicarse mediante dos teorías: 1) la longitud reducida de los isómeros *cis* les permite su rápida incorporación a las micelas; 2) y/o los isómeros *trans* forman cristales con mayor facilidad, reduciendo de ese modo la absorción a través de las micelas (Boileau *et al.*, 2002). También es posible que la configuración *cis* posea una mayor afinidad por los transportadores de membrana encargados de la absorción de los carotenoides situados en el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales (During *et al.*, 2005). La elevada proporción de isómeros *cis* en los tejidos humanos podría generarse por tratarse de una

conversión a la forma biológicamente más efectiva (Richelle *et al.*, 2010). Además, Böhm *et al.* (2002) observaron que algunos isómeros *cis* tenían una actividad antioxidante *in vitro* mayor que la de la forma *trans*, lo que ha llevado a pensar que la forma *cis* podría ejercer mayores beneficios sobre la salud que la forma *trans*, aunque no es posible comparar la eficacia de ambos isómeros *in vivo* debido a la conversión metabólica de una forma a la otra (Richelle *et al.*, 2010).

Respecto a la distribución de este carotenoide en los diversos tejidos, el licopeno se ha hallado en elevadas concentraciones en el hígado, glándulas adrenales, testículos, piel, próstata, pulmones, colon y retina. También ha sido detectado en fluidos corporales como el suero y la leche (Khachik *et al.*, 2002) y en heces y orina (Zaripheh *et al.*, 2003). Sin embargo, los órganos de mayor acumulación varían dependiendo de la especie, por ejemplo, en humanos se han hallado mayores concentraciones en las glándulas adrenales y los testículos y en rata, son el hígado y el bazo los órganos en los que se produce una mayor acumulación de licopeno (Agarwal y Rao, 2000).

### ***Metabolismo del licopeno***

Los apo-licopenales son moléculas hidrofóbicas con poca o ninguna solubilidad en agua, aunque son más polares que la molécula originaria. Por este motivo, estos metabolitos se unen a las porciones lipídicas de las células, principalmente a las membranas y vacuolas lipídicas y se unen a proteínas para ser transportadas por el organismo. Además, la porción de aldehído que los constituye puede interactuar fácilmente con otros compuestos presentes. Por ello, cabría esperar que los apo-licopenales fueran reducidos fácilmente a apo-licopenoles y quizás oxidados hasta ácidos licopenoicos, por lo que su estudio supone un gran interés para poder identificar su función biológica *in vivo* (Lindshield *et al.*, 2007).

Los carotenoides, además de incorporarse a las lipoproteínas pueden sufrir conversiones enzimáticas en el interior de los enterocitos. Las enzimas con mayor probabilidad de implicación en el metabolismo del licopeno son las monooxigenasas de carotenoides I y II (CMO I y CMO II), las cuales son consideradas como las enzimas más importantes responsables de la degradación de carotenoides presentes en los mamíferos. En el caso del licopeno, la enzima CMO II es la responsable de la formación de apolicopenales (Kiefer *et al.*, 2001). Por otra parte, también es posible que las enzimas del citocromo P450 estén implicadas en la degradación de este carotenoide (Breinholt *et al.*, 2000).

Los metabolitos pueden producirse por acción enzimática, mediante procesos de oxidación o incluso pueden tener un origen dietético. El estudio de los metabolitos procedentes de los carotenoides resulta complejo debido a la gran inestabilidad de estos compuestos y a su elevada vulnerabilidad para ser oxidados. Respecto a los metabolitos procedentes del licopeno, unos pocos han sido identificados *in vivo*. El apo 8'-licopenal y apo 12'-licopenal fueron identificados en el hígado de ratas alimentadas con dietas enriquecidas en licopeno (Gajic *et al.*, 2006) y el apo-10'-licopenal fue hallado en los pulmones de hurones tras consumir una dieta suplementada con licopeno (Hu *et al.*, 2006). En humanos, el estudio realizado por Khachik *et al.* (1997) halló el metabolito 2,6-ciclicopeno-1,5-diol procedente de la oxidación del licopeno, en muestras de suero y leche. Se han propuesto diversas teorías sobre la acción fisiológica de estos metabolitos, sin embargo, aún se necesita llevar a cabo más investigaciones que permitan elucidar sus rutas metabólicas y sus funciones sobre la salud.

### **1.3.3. Propiedades beneficiosas del tomate y el licopeno sobre la salud**

El licopeno es el carotenoide más común hallado en el organismo y uno de los antioxidantes más potentes. Su poder antioxidante se debe a la fuerte capacidad de atrapar al oxígeno singlete así como de neutralizar la acción de otras especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta característica se debe al elevado número de dobles enlaces conjugados que posee en su estructura. Por ello, la mayoría de los beneficios atribuidos al licopeno se derivan de su capacidad para proteger a las células del daño oxidativo (Sies y Stahl 1998; Alshatwi *et al.*, 2010).

La ingesta de tomates y productos derivados que contienen licopeno se ha asociado con un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas, como el cáncer y la enfermedad cardiovascular, enfermedades en las que el estrés oxidativo desempeña una importante función en su etiología. Aunque los efectos beneficiosos atribuidos al licopeno se asocian principalmente a su poder antioxidante, la evidencia científica sugiere la existencia de otros mecanismos que también podrían estar implicados (Agarwal y Rao, 2000).

#### ***Prevención de la Enfermedad Cardiovascular***

La fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares está promovida por factores de riesgo que promueven el estrés oxidativo y causan disfunción endotelial, lo que a su vez supone

la alteración de los mediadores vasoactivos y de la respuesta inflamatoria (Libby *et al.*, 2009). El estrés oxidativo induce la expresión de mediadores proinflamatorios como las moléculas de adhesión vascular (VCAM), moléculas de adhesión intracelular (ICAM) y proteínas quimioatrayentes, que participan en el proceso de aterogénesis (Victor *et al.*, 2009). Además, uno de los factores de riesgo de eventos cardiovasculares es la obesidad, que lleva asociada un proceso de inflamación con la consecuente elevación de las concentraciones de marcadores circulantes de inflamación, como son las citoquinas proinflamatorias y la proteína C reactiva (CRP) (Mathieu *et al.*, 2010).

En este sentido, el licopeno contribuye a la prevención de las enfermedades cardiovasculares a través de diversos mecanismos, ya que puede actuar como agente hipocolesterolémico, puede proteger a las células y tejidos del daño generado por ROS y a las lipoproteínas LDL de la oxidación, así como modular la respuesta inmune, entre otras. A continuación se detallan algunos de estos mecanismos.

#### 1. Agente hipocolesterolémico

Numerosos estudios han observado una acción hipocolesterolémica del licopeno, explicada a través de la inhibición *in vivo* e *in vitro* de la enzima hidroximetilglutaril CoA Reductasa (HMGCoA-R) (Brown y Goldstein, 1980; Fuhrman *et al.*, 1997; Edwards y Ericsson, 1999). El paso limitante de la biosíntesis de colesterol e isoprenoides es catalizado por la enzima HMGCoA-R que promueve la transformación de hidroximetilglutaril CoA a mevalonato (Brown y Goldstein, 1980). La regulación de la actividad de dicha enzima ha mostrado, en células animales, ser sensible a la regulación negativa tanto por productos esteroides como no esteroides de la ruta del mevalonato (Edwards y Ericsson, 1999). La evidencia científica sugiere que el licopeno podría inhibir la síntesis de colesterol en macrófagos de humano mediante la inhibición de la actividad (Fuhrman *et al.*, 1997) y expresión de HMGCoA-R (Palozza *et al.*, 2011). El estudio realizado por Palozza *et al.* (2011) demostró que el licopeno puede reducir los niveles intracelulares de colesterol en macrófagos THP-1 de humano, a través de una disminución de la actividad enzimática de HMGCoA-R y un aumento de la salida de colesterol. Este último proceso se debe a la activación de los receptores PPAR- $\gamma$  y LXR- $\alpha$ , que a su vez inducen la sobreexpresión de las proteínas ABCA 1 y caveolina, que favorecen la salida celular del colesterol.

En relación a este efecto hipocolesterolémico del licopeno, en un estudio realizado en nuestro grupo de investigación, observamos que tras el consumo de zumo de tomate, y la acumulación de licopeno en el hígado de ratas, la actividad de la enzima HMGCoA-R estaba disminuida aunque no su expresión génica. Además utilizando métodos *in silico*, se describió una gran afinidad de la molécula del licopeno por el centro activo de la enzima, superior incluso a la de su propio sustrato (HMGCoA), lo que indicaría que el licopeno puede competir con el sustrato e inhibir la actividad de la enzima y como consecuencia reducir la síntesis de colesterol (Navarro-González *et al.*, 2014).

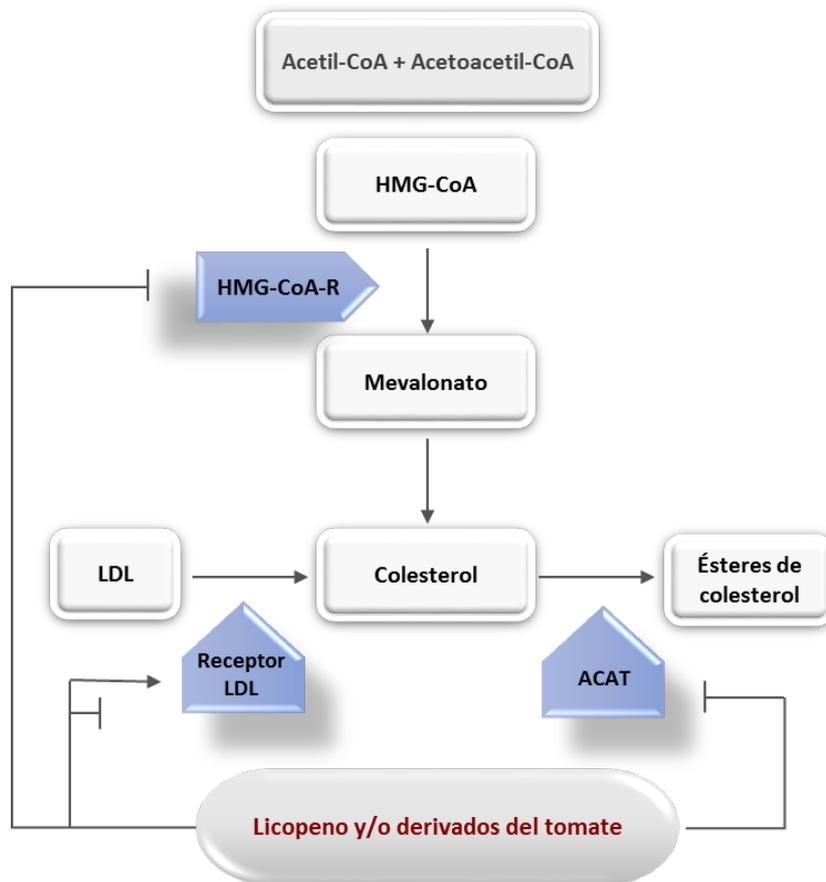
Otro mecanismo propuesto del licopeno como agente hipocolesterolemizante es su efecto sobre la actividad de los receptores de colesterol LDL. Los resultados de Furhman *et al.* (1997) describieron un aumento de la absorción de colesterol LDL en macrófagos enriquecidos con licopeno o  $\beta$ -caroteno, a diferencia del resto de macrófagos. Por ello, es probable que la inhibición de la actividad de la enzima HMGCoA-R por acción de los carotenoides, de forma similar a como actúan las estatinas, desencadene una expresión coordinada de genes que codifican el receptor LDL (Palozza *et al.*, 2012).

La acción del licopeno sobre la actividad ACAT (acil-CoA colesterol aciltransferasa), enzima responsable de la esterificación intracelular de colesterol, es otro de los mecanismos propuestos para reducir los niveles de colesterol. Esta acción fue observada por Fujiwara *et al.* (2007) en cultivos celulares.

Los tres mecanismos propuestos sobre la acción hipocolesterolémica del se representan en la **Figura 1.7**.

Además del efecto hipocolesterolémico del licopeno, también se ha observado que la fibra dietética presente en el zumo de tomate puede producir una disminución de los niveles de colesterol a través de los ácidos grasos volátiles de cadena corta producidos durante su fermentación por la microbiota en el colón, especialmente por el ácido propiónico. Los principales ácidos grasos obtenidos como consecuencia de dicha fermentación son el ácido acético, el ácido butírico y el ácido propiónico (Cummings *et al.*, 1987), los cuales desempeñan importantes funciones sobre la morfología y función intestinal (Scheppach, 1994). El butirato es empleado como fuente de energía por los colonocitos y ha recibido especial atención como potencial agente anticancerígeno, ya que actúa disminuyendo el crecimiento y activando la apoptosis de las células cancerígenas del colon (Scharlau *et al.*, 2009). Además, ejerce

interesantes efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Qiao *et al.*, 2014). El acetato es empleado para la síntesis de colesterol y ácidos grasos a nivel hepático. Además, favorece el incremento del flujo sanguíneo y la absorción de oxígeno en el colon y mejora la motilidad del ileón (Hosseini *et al.*, 2011). Respecto al ácido propiónico, en estudio *in vivo* con animales, se ha observado un efecto hipocolesterolémico y reductor de la acumulación de ácidos grasos, mediante la disminución de la síntesis de ácidos grasos y las cantidades de grasa en el hígado y plasma, aunque se cree que este efecto puede ser similar al que se produciría en humanos, no hay suficiente evidencia científica que lo demuestre (Al-Lahham *et al.*, 2010).



**Figura 1.7.** Posibles mecanismos implicados en la reducción intracelular de colesterol por el licopeno o derivados del tomate. Fuente: Palozza *et al.* (2012).

## 2. Agente antioxidante

El licopeno podría actuar protegiendo de la oxidación a biomoléculas celulares que ejercen una función crítica en el organismo y cuya alteración podría desencadenar el proceso de aterogénesis, entre los que se encuentran los lípidos y las lipoproteínas. Este mecanismo de

protección fue hallado en los estudios realizados por Agarwal y Rao (1998), en los que se observó en humanos que el licopeno protegía a las partículas LDL de la oxidación, resultados que se corresponden con los hallados previamente por Furhman *et al.* (1997) en macrófagos.

Por otra parte, se ha observado en ratas que el licopeno puede ejercer un efecto antiaterogénico mediante la inhibición de la expresión de agentes inflamatorios (VCAM, MCP (proteína quimioatrayente de monocitos) y la citoquina proinflamatoria IL-8), mejorando de ese modo la función endotelial y protegiendo del proceso de aterogénesis (Liu *et al.*, 2007). Este efecto también se ha hallado en estudios con humanos, en los que se sugiere que el licopeno podría modular la respuesta inmune mediante la disminución de mediadores inflamatorios (Watzl *et al.*, 2005; Jacob *et al.*, 2008; Palozza *et al.*, 2010; Gouranton *et al.*, 2011), así como, mejorar el estrés oxidativo mediante la reducción de isoprostanos e ICAM) (Hozawa *et al.*, 2007; García-Alonso *et al.*, 2012).

Bose y Agrawal (2007) observaron en individuos con enfermedad cardiovascular un incremento de los niveles de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y una reducción de la peroxidación lipídica, tras consumir una dieta suplementada con tomate durante 60 días. Previamente, Maruyama *et al.* (2001) hallaron una protección de los fosfolípidos de las partículas LDL frente a la oxidación en individuos que tomaron licopeno a partir del zumo de tomate.

### ***Prevención de la enfermedad del hígado graso o enfermedad hepática***

En lo que respecta a la esteatosis hepática no alcohólica, Bahcecioglu *et al.* (2010) observaron, tras la administración de diferentes dosis de licopeno en ratas con esteatosis inducida por el consumo de una dieta alta en grasa, una disminución del grado de inflamación y esteatosis, una mejora del estrés oxidativo, mediante la disminución de MDA y mayores niveles de glutatión y también se observó una disminución de los niveles de TNF- $\alpha$ . Además, el licopeno mejoró la resistencia a la insulina. Por todo ello, el licopeno ejerció un efecto preventivo en el desarrollo de esteatohepatitis independiente a la dosis de licopeno administrada (2 mg y 4 mg /Kg).

En esta misma línea Wang *et al.* (2010) también observaron un efecto preventivo del licopeno y de un extracto de tomate en la progresión a esteatohepatitis en ratas con esteatosis

hepática inducida por la administración de dietilnitrosamina (carcinógeno hepático), principalmente mediante la reducción del estrés oxidativo.

Los resultados hallados por Sheriff y Devaki (2013) en ratas con hepatitis inducida por la administración de galactosamina y lipopolisacáridos, revelaron que la administración de licopeno ayuda a restaurar la función hepática alterada, a través del aumento de la actividad de enzimas hepáticas (AST, ALT, lactato deshidrogenasa,  $\gamma$ -glutamil transferasa), bilirrubina y sustratos de la gluconeogénesis.

Por otra parte, Jamshidezadeh *et al.* (2008) también observó efectos beneficiosos del licopeno administrado a través de una pasta de tomate en ratas que recibieron acetaminofén, fármaco analgésico que en casos de sobredosis puede causar necrosis e incluso fallo hepático. Los efectos beneficiosos se manifestaron principalmente a través de un aumento de los niveles de glutatión.

Estos hallazgos descritos en la bibliografía científica determinan que el tomate o productos derivados podrían, mediante el aporte de compuestos bioactivos y principalmente licopeno, mitigar la situación hepática en la enfermedad del hígado graso a través de una mejora del estrés oxidativo, entre otros beneficios, tal y como se ha mencionado en los diferentes estudios.

### **Otras enfermedades**

Además de los efectos beneficiosos descritos anteriormente, también se ha observado un efecto del licopeno en la inhibición de varios tipos de células cancerígenas (próstata, mama, pulmón, endometrio), mediante la regulación del crecimiento celular a través de la apoptosis y la inhibición del ciclo celular (Bowen *et al.*, 2002; Seren *et al.*, 2008). Además inhibe la peroxidación lipídica y protege al ADN de la oxidación (Sies y Stahl, 1998).

También podría ejercer un efecto beneficioso en las enfermedades neurodegenerativas, ya que se cree que el licopeno puede atravesar la barrera hematoencefálica y ser efectivo en la reducción del daño causado por las especies reactivas de oxígeno (Sinclair *et al.*, 1998). La evidencia científica sugiere que el licopeno podría reducir el riesgo de padecer osteoporosis mediante sus propiedades antioxidantes (Rao *et al.*, 2007a).

### **Beneficios del zumo de tomate**

Aunque ya se ha mencionado algún efecto beneficioso de la ingesta de tomate, zumo u otro derivado, en este apartado se pretende resaltar la importancia de consumir el licopeno dentro de su matriz alimentaria, ya que en muchos casos el efecto beneficioso hallado podría deberse a la compleja interacción o efecto sinérgico entre el licopeno y otros componentes como varios carotenoides, vitaminas C y E, compuestos fenólicos y otros micronutrientes, presentes conjuntamente en el alimento (Jacob *et al.*, 2008; García-Alonso *et al.*, 2012).

Los resultados hallados por Alshatwi *et al.* (2010) muestran que el consumo de polvo de tomate fue más eficaz que la administración de un suplemento de licopeno, proporcionando por ambas vías la misma dosis de licopeno, contra la peroxidación lipídica en ratas. Este hecho se reflejó especialmente a través de menores concentraciones de MDA en suero y una menor cantidad de triglicéridos a nivel hepático, encontradas en el grupo que consumió el extracto de tomate, aunque en ambos casos se observó una mejora de los parámetros plasmáticos lipídicos.

Por otra parte, en un estudio realizado en pacientes diagnosticados con síndrome metabólico se observó una mejora del estado de inflamación y de la disfunción endotelial, tras la suplementación con zumo de tomate durante un periodo de dos meses. También se observó una mejora de la resistencia a la insulina y una disminución de LDL y aumento de HDL, lo que sugiere un efecto beneficioso del consumo de zumo de tomate con respecto a factores de riesgo asociados al síndrome metabólico (Tsitsimpikou *et al.*, 2014). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Silaste *et al.* (2007), que hallaron una disminución de colesterol LDL plasmático y un aumento de la resistencia a la oxidación de estas lipoproteínas, tras el consumo de una dieta con elevadas cantidades de tomate en individuos sanos.

Riso *et al.* (2006) observaron una disminución de mediadores de inflamación, especialmente de TNF- $\alpha$  en individuos sanos que habían consumido una bebida elaborada a base de tomate y enriquecida en carotenoides. Este mismo grupo de investigación observó, previamente, que tras el consumo de una dieta rica en tomate y productos derivados, se produjo una reducción de la peroxidación lipídica a través de una disminución de la excreción de isoprostanos y un aumento de la resistencia a la oxidación de las partículas LDL (Visioli *et al.*, 2003)

Otro estudio realizado con un zumo de tomate enriquecido en vitamina C observó, en individuos sanos, efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo y la inflamación, a través de una reducción de colesterol total, de los niveles de CRP y de la peroxidación lipídica (Jacob *et al.*, 2008).

#### **1.4. LA PROTEÓMICA, POSIBLE HERRAMIENTA DE DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA NAFLD**

La proteómica es la disciplina que estudia todas las proteínas expresadas en un genoma y abarca tanto su identificación como determinación de su localización, modificaciones e interacciones, actividades y funciones. Pertenece al grupo de ciencias denominadas 'ómicas' (-omics), entre las que se encuentra también la genómica y la metabolómica. Los análisis de proteómica examinan miles de patrones proteicos expresados como consecuencia de una función anormal de la célula o de interacciones celulares (Dominguez *et al.*, 2007). Por lo que en su conjunto, estas ciencias permiten obtener un enfoque biológico de las enfermedades y contribuyen enormemente a la investigación de nuevos mecanismos (Barallobre-Barreiro *et al.*, 2013).

Una rama de la proteómica es la proteómica clínica, cuyo objetivo principal es identificar proteínas implicadas en procesos patológicos, comprender cómo los cambios que se generan en ellas producen alguna enfermedad y desarrollar biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como marcadores terapéuticos (Dominguez *et al.*, 2007).

Según el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH), un biomarcador es una característica que se puede medir objetivamente y que se puede evaluar como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a un agente terapéutico. (Martín-Gómez *et al.*, 2010)

Los fluidos biológicos contienen una gran información del estado fisiológico de un organismo, ya que presentan un elevado número de sustancias, entre ellas péptidos y proteínas, que podrían modificarse en función del tiempo o en diferentes circunstancias, como en un estado patológico. Por ello, muchas proteínas y/o péptidos, cuyo estudio se conoce como proteómica y peptidómica, se han utilizado como únicos biomarcadores de enfermedad en aplicaciones clínicas con diferentes grados de éxito. La principal limitación de este enfoque es que en muchos casos un único biomarcador carece de especificidad. Por este motivo, la

proteómica se centra en la identificación y validación de paneles de biomarcadores más que en la identificación de un único biomarcador ideal de diagnóstico (Fliser *et al.*, 2007).

El proteoma de la sangre es uno de los principales objetivos de la investigación de biomarcadores. Sin embargo, se trata de un fluido altamente complejo y dinámico, lo que ha provocado un cambio en la investigación de biomarcadores dirigiéndola al empleo de otros fluidos corporales más estables como la orina, bilis y fluido cerebroespinal (Shen *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2007b)

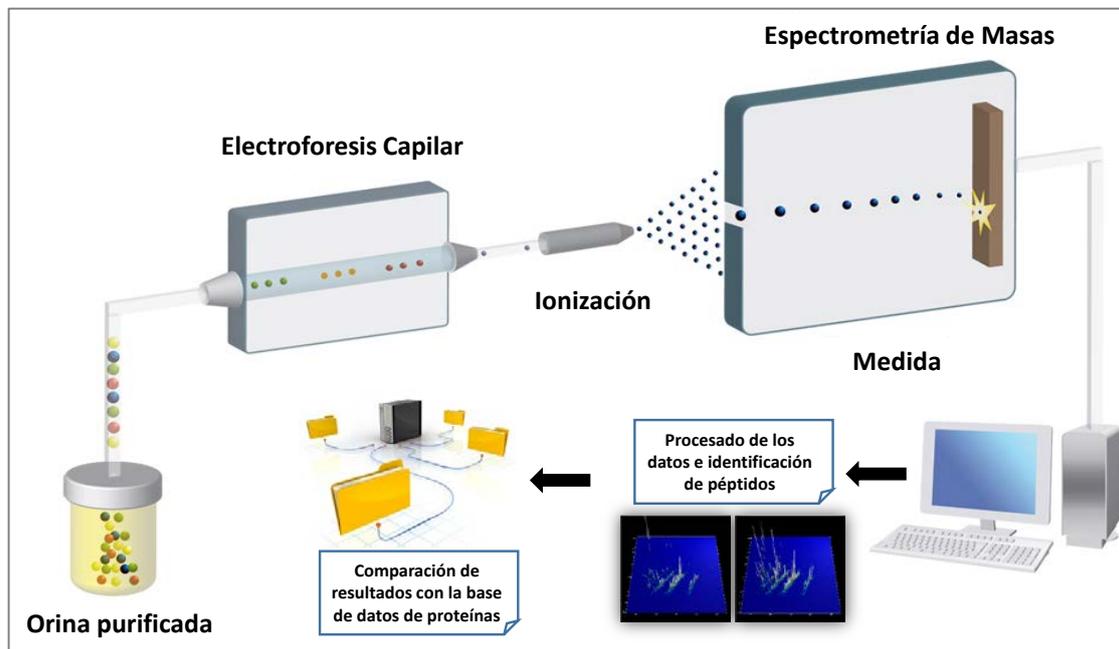
Debido a su disponibilidad, fácil recolección y su correlación con la fisiopatología de distintas enfermedades, la orina resulta un medio adecuado para su uso en la proteómica clínica. La orina, al contrario que la sangre, no contiene un número importante de células, lípidos y proteínas de gran tamaño, lo que disminuye la complejidad del análisis. Además, se trata de un fluido relativamente estable, probablemente debido al hecho de que la orina se almacena durante un tiempo en la vejiga, lo suficiente para que se completen los procesos proteolíticos llevados a cabo por proteasas endógenas (Weissenger *et al.*, 2004).

La metodología para definir los biomarcadores debe combinar el empleo de un tiempo razonable de análisis con una alta resolución, para conseguir, de ese modo, un perfil adecuado de muestras y el reconocimiento de características suficientes que permitan obtener paneles de diagnóstico robustos. Debido a su alto poder de resolución, robustez y reproducibilidad, y tiempo aceptable requerido para los análisis rutinarios, la electroforesis capilar acoplada a un espectrómetro de masas (CE-MS) ha demostrado ser una excelente plataforma para la identificación de biomarcadores en orina para un uso clínico (Neuhoff *et al.*, 2004; Dakna *et al.*, 2009).

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, separados por su relación masa/carga ( $m/z$ ) y posteriormente detectados y registrados. Esta técnica presenta numerosas ventajas: 1) elevada especificidad en la determinación del peso molecular, ya que puede medir con exactitud la masa molecular y obtener información de los fragmentos iónicos de un analito; 2) elevada sensibilidad; es capaz de detectar moléculas en cantidades de attomoles ( $10^{-18}$ ) y femtomoles ( $10^{-15}$ ); 3) se trata de una técnica muy versátil, aplicable a todo tipo de muestras (volátiles, no volátiles, polares, apolares, líquidos y gases). Cuando se combina con técnicas de separación de alta resolución, como la electroforesis capilar, es la más cualificada para el análisis de muestras complejas, ya que se consigue simultáneamente la separación y la identificación (Martín-Gómez *et al.*, 2010).

Las ventajas que proporciona la CE-MS son especialmente beneficiosas cuando se trabaja con un elevado número de muestras heterogéneas que presentan componentes que pueden interferir, como lípidos, precipitados, etc. (Stutz, 2005; Kolch *et al.*, 2005).

Por todo ello, la CE-MS permite reproducir y comparar análisis de muestras que presentan una elevada complejidad. De hecho, la CE-MS permite el análisis de varios cientos de polipéptidos presentes en la muestra en un tiempo aproximado de 60 minutos con una elevada sensibilidad (Dakna *et al.*, 2009, Theodorescu *et al.*, 2005). La separación de los analitos presentes en la compleja mezcla se basa en la migración diferencial a través de un capilar relleno de líquido en un fuerte campo eléctrico. Dentro de sus desventajas se incluye su limitada capacidad para separar proteínas de gran tamaño y la pequeña capacidad de carga de muestra, que compromete la secuencia del MS/MS. A pesar de ello, el CE-MS está siendo empleado con gran éxito en el análisis del proteoma de bajo peso molecular con el objetivo de la identificación de biomarcadores (Albalat *et al.*, 2011). El esquema del proceso de separación de péptidos por CE acoplado a un MS para la detección de las masas partir de una muestra de orina previamente tratada, así como los pasos sucesivos para el descubrimiento de biomarcadores se representa en la **Figura 1.8**.



**Figura 1.8.** Esquema del proceso de separación y detección de péptidos procedentes de una muestra de orina previamente purificada empleando un CE-MS. Fuente: Albalat *et al.*, 2011.

La cuantificación de péptidos presentes en una muestra supone un importante desafío en el campo de la proteómica dadas las tecnologías actualmente disponibles. Se han probado

diferentes métodos de cuantificación basados en la MS, obteniéndose diferentes grados de éxito. Una de las técnicas más simples y con una buena relación coste-eficacia es la cuantificación basada en la señal-intensidad-recuento de iones. A pesar de que este método no permite la cuantificación absoluta, se ha demostrado que la cuantificación relativa presenta un alto grado de similitud con la absoluta, por lo que se podría llevar a cabo esta cuantificación relativa mediante el uso de una selección de fragmentos de colágeno presentes de forma natural y abundante, que pueden ser utilizados como patrones internos (Jantos-Siwy *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos tras la cuantificación son procesados mediante el uso de software específicos, como MosaiquesVisu y MosaCluster (Mosaiques Diagnostics, Hannover, Alemania) (Neuhoff *et al.*, 2004; Dakna *et al.*, 2009), que permiten su clasificación por grupos de individuos con diferentes estados fisiológicos y la identificación de las proteínas de las que provienen. Además, como parte del procesado de los datos se requieren complejos análisis estadísticos que permitan seleccionar aquellos péptidos que puedan ser definidos como biomarcadores de un estado fisiopatológico concreto (Lê Cao *et al.*, 2011; Theodorescu *et al.*, 2006), esto es la herramienta que se conoce como bioinformática.

Finalmente los péptidos son incorporados en bases de datos de proteínas urinarias que recopilan información de biomarcadores característicos de una determinada patología. Hasta la fecha, las bases de datos de análisis del proteoma clínico permiten la detección precoz, a partir de la orina, de enfermedad cardiovascular, renal, biliar, urogenital, Alzheimer, diabetes y cáncer, entre otras. Sin embargo, al tratarse de una ciencia en continuo avance, estas bases de datos siguen creciendo gracias a la colaboración de científicos de todo el mundo que trabajan en el campo de la proteómica (<http://mosaiques-diagnostics.de/>). En lo que respecta a la esteatosis hepática, actualmente no existen biomarcadores incluidos en la base de datos de proteínas urinarias, aunque se están estudiando posibles biomarcadores presentes en muestras de tejido hepático y suero (Lim *et al.*, 2014).



## *Capítulo 2. Objetivos*



## 2. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral, nos hemos propuesto como hipótesis de partida que el consumo de tomate y sus productos derivados, gracias a su alto contenido en licopeno, pueden desarrollar un efecto beneficioso para la salud hepática, al acumularse en el hígado y desarrollar su actividad antioxidante. En la actualidad, la enfermedad de hígado graso no alcohólica presenta una elevada incidencia en los países desarrollados, y como consecuencia se producen alteraciones del metabolismo lipídico, incrementando el riesgo de padecer determinadas enfermedades.

Por ello, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar el efecto del consumo de zumo de tomate, y principalmente del licopeno, sobre el metabolismo lipídico hepático, mediante un estudio *in vivo* con ratas Sprague-Dawley, con la finalidad de conocer sus posibles mecanismos de acción.

Para la consecución del objetivo general se plantean los siguientes **objetivos específicos** distribuido de acuerdo a los dos estudios del diseño experimental:

### **Estudio 1: Ensayo con animales normocolesterolémicos**

1. Evaluar el efecto hipocolesterolémico del zumo de tomate, en ratas alimentadas con dieta estándar de mantenimiento de roedores y suplementada con zumos de tomate con diferentes concentraciones de licopeno, mediante el estudio de la biodisponibilidad del licopeno, el análisis de las concentraciones de lípidos plasmáticos y colesterol hepático, así como de la actividad de la enzima HMG-CoA-Ren hígado.
2. Determinar el efecto prebiótico del zumo de tomate, mediante el análisis de ácidos grasos de cadena corta en heces, evaluando si las diferencias en el contenido de fibra dietética entre los zumos modifica el perfil de estos metabolitos, prestando especial atención al ácido propiónico.

**Estudio 2: Ensayos con animales con esteatosis inducida a través de la dieta**

3. Evaluar la biodisponibilidad de licopeno y su acumulación en el hígado, tras la ingesta de zumo de tomate.
4. Estudiar el efecto del consumo de zumo de tomate sobre el contenido de lípidos plasmáticos y la actividad de la enzima HMGCoA-R a nivel hepático.
5. Determinar metabolitos hepáticos en ratas con enfermedad del hígado graso no alcohólica tras la ingesta de zumo de tomate, empleando la metabolómica como herramienta para obtener una mejor comprensión de la función que el licopeno puede desempeñar sobre el metabolismo hepático.
6. Evaluar los cambios producidos en el metabolismo lipídico hepático a través de la regulación de la expresión génica de los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, en ratas con esteatosis inducida que consumieron zumo de tomate.
7. Analizar el efecto del consumo de zumo de tomate sobre determinados biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación, en ratas con esteatosis inducida.
8. Explorar la existencia de posibles biomarcadores de origen peptídico, en la orina de ratas con esteatosis, que puedan estar relacionados con esta patología y/o con la enfermedad cardiovascular, para su empleo como método de prevención y diagnóstico.

## *Capítulo 3. Material y Métodos*



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

Para la consecución de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, se llevaron a cabo dos estudios en un modelo animal empleando ratas macho Sprague-Dawley (Harlan Laboratories Inc, Indiana, EEUU). Los estudios se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación Animal de la Universidad de Murcia, controlándose las condiciones de humedad (50%), temperatura (22 °C) y luz (ciclo luz-oscuridad 7 am – 7 pm) durante los periodos de experimentación. Los estudios fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia y para su consecución se tuvieron en cuenta las pautas indicadas en el RD 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y en la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Los diseños de los estudios se detallan a continuación.

##### 3.1.1. ESTUDIO 1

Para la realización de esta experiencia se utilizaron 24 ratas macho Sprague Dawley de 12 semanas y un peso aproximado de 400 g. Tras un periodo de adaptación de dos días, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos de 8 ratas cada uno y ubicados en jaulas metabólicas individuales (Tecniplast S.p.A., Italia). A todos los grupos se les suministró una dieta estándar de mantenimiento cuya composición se detalla en la **Tabla 3.1.**

**Tabla 3.1.** Composición de la dieta estándar Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet utilizada en la experiencia 1.

| <b>Composición (por 100 g)</b> | <b>Dieta Estándar</b> |
|--------------------------------|-----------------------|
| <i>Valor energético (Kcal)</i> | 290                   |
| <i>Proteínas (g)</i>           | 14.3                  |
| <i>Grasas (g)</i>              | 4.0                   |
| <i>Hidratos de carbono (g)</i> | 48.0                  |
| <i>Fibra (g)</i>               | 18.0                  |
| <i>Colesterol (mg)</i>         | -                     |

En cuanto a la bebida, el grupo control recibió agua, mientras que a los grupos 1 y 2 se les suministraron zumos de tomate con un contenido bajo (BL) y alto en licopeno (AL), respectivamente. Las muestras de zumo empleadas en el estudio fueron zumos comerciales proporcionados por empresas de la Región de Murcia (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2.** Valor nutricional por 100 mL de los zumos de tomate utilizados como bebida en los grupos 1 y 2.

| <b>Composición Nutricional</b>     | <b>Zumo de tomate BL</b> | <b>Zumo de tomate AL</b> |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Energía (Kcal)</i>              | 35                       | 24                       |
| <i>Proteínas (g)</i>               | 0.6                      | 0.8                      |
| <i>Hidratos de Carbono (g)</i>     | 4.2                      | 5.0                      |
| <i>Azúcares (g)</i>                | 2.8                      | 4.7                      |
| <i>Grasas (g)</i>                  | 1.8                      | 0.1                      |
| <i>Ácidos grasos saturados (g)</i> | 0.3                      | 0.0                      |
| <i>Fibra (g)</i>                   | 2.1                      | 0.8                      |
| <i>Licopeno (mg/100g)</i>          | 2.7                      | 12                       |

Tanto la bebida como la comida fueron suministradas *ad libitum* y la duración del estudio fue de 21 días (**Figura 3.1**). La cantidad de comida y bebida ingerida, así como la excreción de heces y orina fue cuantificada a diario. Al inicio del estudio, después del periodo de adaptación, se extrajeron muestras de sangre de 8 animales a través de la vena caudal de la cola para obtener unos valores bioquímicos iniciales de referencia. Adicionalmente, se recogieron muestras de heces y orina al inicio y final del estudio, las cuales fueron conservadas a -80 °C. Al finalizar el estudio, los animales, tras 12 horas de ayuno, fueron anestesiados con isoflurano (Isoflo®, Abbott Laboratories Ltd, Reino Unido) hasta conseguir un control profundo de la anestesia. A continuación, se procedió a la obtención de muestras de sangre mediante punción cardiaca y los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Laboratorios Vétoquinol, España) por inyección intraperitoneal. Tras el sacrificio se recogieron muestras de hígado que fueron conservadas inmediatamente a -80 °C para ser analizadas posteriormente. Los parámetros analizados y las técnicas analíticas aplicadas se describen en el apartado 3.3 del presente capítulo.

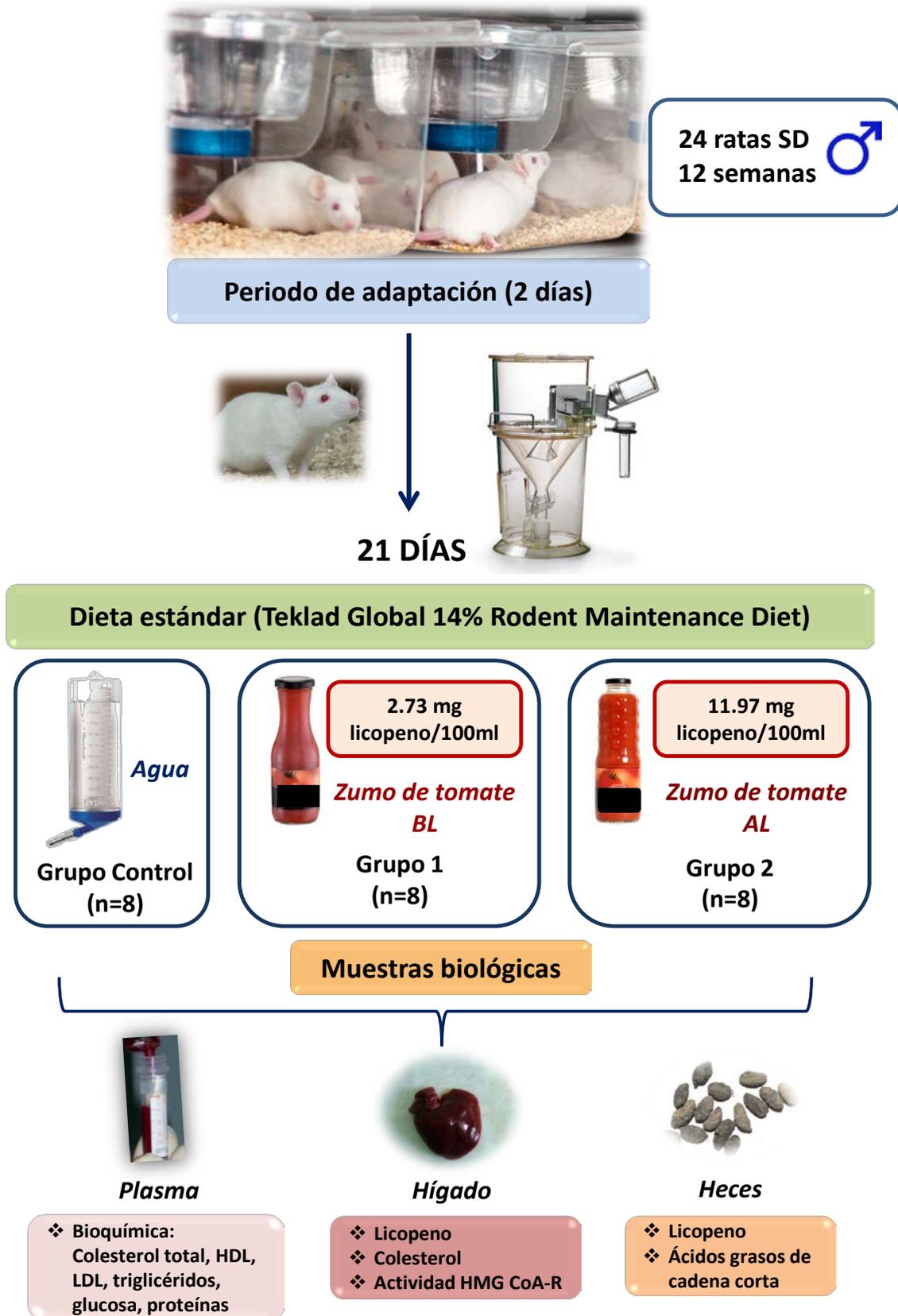


Figura 3.1. Diseño experimental del estudio 1.

### 3.1.2. ESTUDIO 2

Para llevar a cabo el presente estudio se utilizaron 24 ratas macho Sprague-Dawley de 8 semanas de edad con un peso aproximado inicial de 250 g. La primera fase del estudio consistió en un periodo de adaptación de 2 semanas para el cual los animales se dividieron en dos grupos de 12 ratas cada uno en el que disponían de agua y comida *ad libitum* (**Figura 3.2**). Uno de los grupos recibió una dieta estándar y el otro una dieta aterogénica con alto contenido en grasa y colesterol (**Tabla 3.3**).

**Tabla 3.3.** Composición de las dietas utilizadas en la experiencia 2.

| <b>Composición (por 100 g)</b> | <b>Dieta Estándar<sup>a</sup></b> | <b>Dieta Aterogénica<sup>b</sup></b> |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Valor energético (Kcal)        | 290                               | 450                                  |
| Proteínas (g)                  | 14.3                              | 17.3                                 |
| Grasas (g)                     | 4.0                               | 21.2                                 |
| Hidratos de carbono (g)        | 48.0                              | 46.9                                 |
| Fibra (g)                      | 18.0                              | 5.0                                  |
| Colesterol (mg)                | -                                 | 1.25                                 |

<sup>a</sup>Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet. <sup>b</sup>Atherogenic diet TD 02028 (Harlan Laboratories Inc, Indiana, EEUU).

Al finalizar el periodo de adaptación, se realizó una extracción sanguínea con el objetivo de obtener unos valores bioquímicos iniciales de referencia. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 10 animales y, tras un periodo de ayuno de 12 horas, fueron anestesiados con isoflurano (Isoflo®, Abbott Laboratories Ltd, Reino Unido) y las muestras de sangre se extrajeron a través de la vena caudal. En ningún caso se alcanzó un volumen de extracción superior al 10% de su peso.

Tras la extracción, los animales de los dos grupos de inicio fueron subdivididos aleatoriamente, generándose un total de cuatro grupos de estudio (6 ratas/grupo). Los grupos se diferenciaban según su combinación de tipo de dieta (estándar o aterogénica) y bebida suministrada (agua o zumo de tomate). Los animales se distribuyeron individualmente en jaulas metabólicas (Tecniplast S.p.A., Italia) quedando los grupos de estudio con la siguiente distribución: NA (dieta estándar y agua), NL (dieta estándar y zumo de tomate), HA (dieta aterogénica y agua) y HL (dieta aterogénica y zumo de tomate). Las muestras de zumo de tomate comercial empleadas en el estudio fueron suministradas por la empresa Juver Alimentación S.L. (Cabezo de Torres, Murcia, España). En la **Tabla 3.4** se muestra la composición nutricional del zumo que fue completada con el análisis de su contenido en

vitamina C y compuestos bioactivos, tales como, licopeno, fenoles totales y flavonoides, así como mediante la determinación de la actividad antioxidante total *in vitro* (AAT) aplicando los métodos ORAC y TEAC.

**Tabla 3.4.** Composición nutricional, contenido en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante total (CAT) del zumo de tomate empleado en el estudio 2, expresada por 100 mL de producto.

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Energía (Kcal)</b>   | <b>26.0</b> |
| <b>Grasa (g)</b>  | <b>0.1</b>  |
| <b>Hidratos de carbono (g)</b>                                      | <b>5.0</b>  |
| <b>Azúcares (g)</b>   | <b>4.7</b>  |
| <b>Fibra (g)</b>  | <b>0.8</b>  |
| <b>Proteínas (g)</b>  | <b>0.8</b>  |
| <b>Sal (g)</b>  | <b>0.5</b>  |
| <b>Fenoles totales (mg/100g)</b>                                    | <b>28.4</b> |
| <b>Flavonoides libres (mg/100g)</b>                                 | <b>3.6</b>  |
| <b>Licopeno (mg/100g)</b>   | <b>10.8</b> |
| <b>Vitamina C (mg)</b>  | <b>1.44</b> |
| <b>CAT-ORAC (<math>\mu</math>moles equivalentes de Trolox)</b>      | <b>0.23</b> |
| <b>CAT-ORAC (<math>\mu</math>moles equivalentes de Trolox/100g)</b> | <b>45.0</b> |

El periodo de estudio tuvo una duración de 5 semanas durante las cuales los animales tuvieron acceso libre a comida y bebida. El peso de las ratas fue registrado semanalmente, mientras que la ingesta de comida y bebida, al igual que la excreción de heces y orina se anotó a diario. Las muestras de heces y orina fueron recogidas semanalmente y conservadas a -80 °C. Al finalizar el periodo de estudio, y tras 12 horas de ayuno, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se realizó una extracción de sangre por punción cardiaca, para posteriormente ser sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico mediante inyección intraperitoneal (Dolethal, Laboratorios Vétoquinol, España). Para la obtención de las muestras de sangre emplearon tubos heparinizados y el plasma se obtuvo por centrifugación (3000 g, 10 min, 4 °C), conservándose en microtubos a -80 °C para ser analizado posteriormente. Tras el sacrificio se procedió a la obtención de muestras de hígado, tejido adiposo subcutáneo y abdominal, las cuales fueron congelados inmediatamente a la extracción en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta su análisis. Para los análisis de expresión génica, las muestras se recogieron en microtubos estériles libres de ARNasa con adición de solución RNeasy Lysis Buffer con la finalidad de evitar la degradación del ARN. Para el examen histológico se recogieron muestras de hígado y

aorta en formol al 10%. Las metodologías analíticas aplicadas a las muestras (**Figura 3.3**) se describen brevemente en el apartado 3.3 de este capítulo.

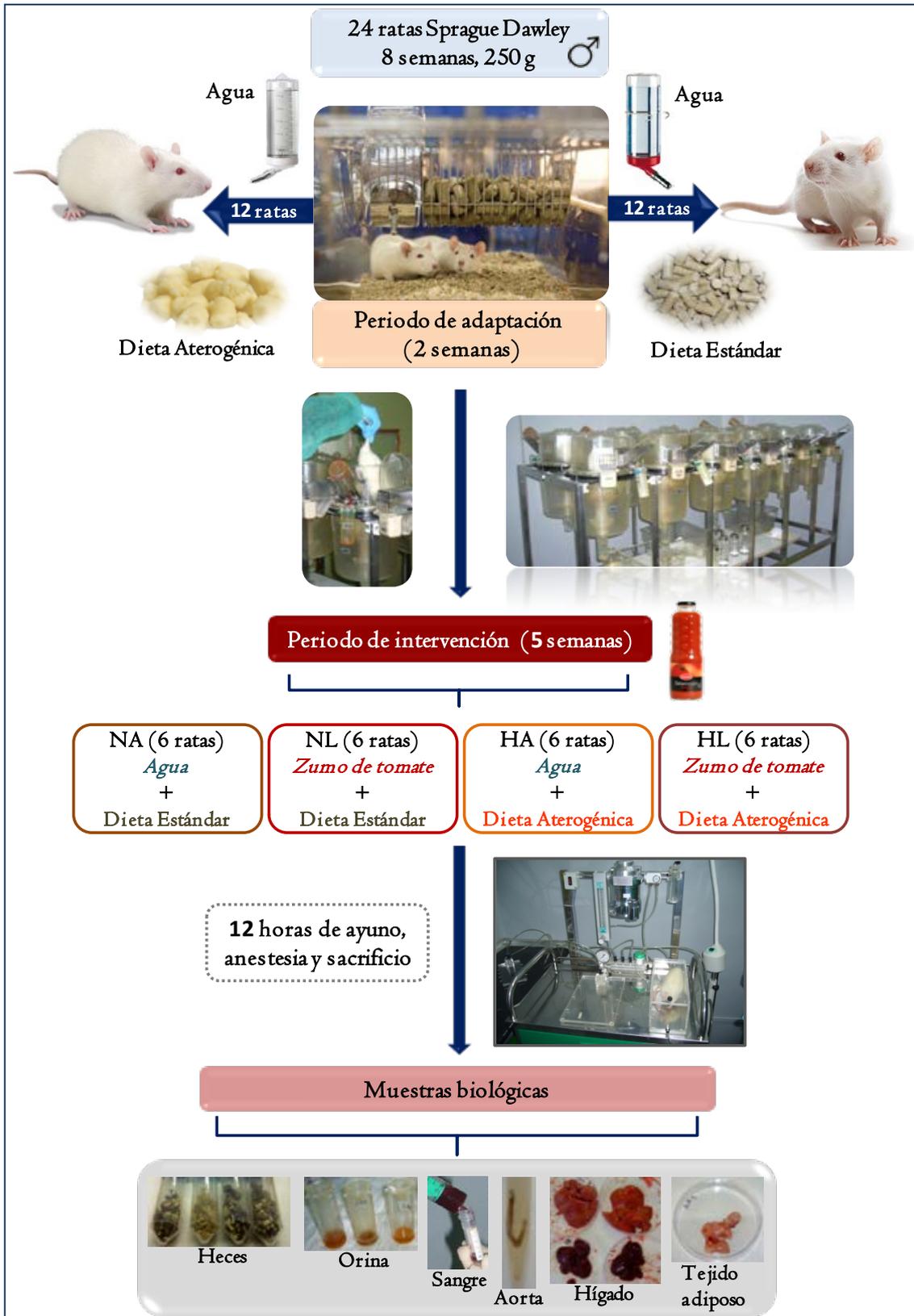


Figura 3.2. Diseño experimental del estudio 2

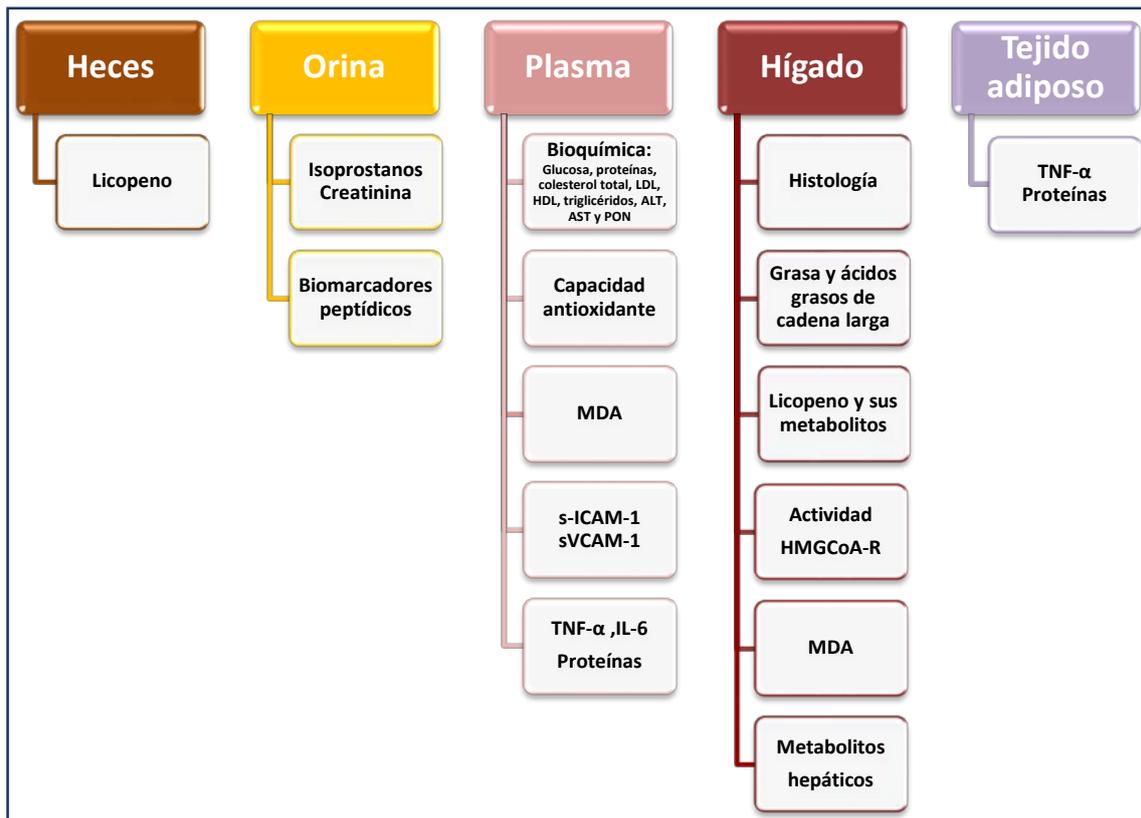


Figura 3.3. Esquema de los parámetros analizados en las muestras biológicas del estudio 2.

## 3.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

### 3.2.1. Determinación de la capacidad antioxidante hidrofílica

#### ***Capacidad antioxidante hidrofílica: método ORAC***

La capacidad antioxidante en muestras de plasma de rata y zumo de tomate se determinó por el método *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) descrito por Prior *et al.* (2003). El ensayo ORAC es un método de fluorescencia ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de muestras biológicas y alimentarias. Se fundamenta en la inhibición del radical peroxilo generado a partir de la descomposición térmica del compuesto dihidro cloruro de 2,2'- diazobis (2-amidino-propano) (AAPH) (98%, Acros Organics, EEUU) por los antioxidantes presentes en la muestra. El método emplea fluoresceína (fluoresceína sódica, Sigma-Aldrich, USA) como sonda de fluorescencia, cuya intensidad de señal se atenúa por la oxidación causada por el radical AAPH generado en el medio de reacción. De este modo, la eficacia de una muestra antioxidante se valora de acuerdo a su capacidad para retardar la pérdida de fluorescencia.

Las muestras de plasma fueron previamente descongeladas y diluidas (1:1000) con tampón fosfato 0.075 M, pH 7.0 y el zumo de tomate se centrifugó a 4500 g durante 5 min y se diluyó (1:20) con la misma solución tampón. Como patrón se empleó ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma Aldrich, EEUU) en el rango de concentración 0-50  $\mu$ M. La lectura de fluorescencia se realizó en microplacas negras con fondo transparente de 96 pocillos (Corning Incorporated Costar® 3631, EEUU), empleando un lector de microplacas Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, EEUU), a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y protegidas de la luz. Los resultados se expresaron como mM de equivalentes de Trolox (TE) en muestras de plasma y como  $\mu$ moles equivalentes de Trolox (ET) por 100 g en el caso de los zumos.

#### ***Capacidad antioxidante total: método TEAC***

Esta determinación se llevó a cabo únicamente en el zumo de tomate por el ensayo *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) descrito por Miller *et al.* (1996). El método se basa en la reducción del radical catión del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-

sulfónico) (ABTS) (Sigma Aldrich, Canada) por los antioxidantes presentes en la muestra. Se trata de una técnica espectrofotométrica en la que los antioxidantes presentes en la muestra producen una disminución del color de la solución del radical ABTS cuya magnitud se mide a 734 nm y es proporcional a la concentración de antioxidantes. La solución de trabajo activa del radical catión ABTS se prepara haciendo pasar una solución madre 5 mM de ABTS en tampón fosfato salino (PBS) 5 mM y pH 7.4 a través de un filtro Whatman nº 5 con óxido de manganeso (Panreac, España). El exceso de óxido de manganeso se elimina pasando la solución activa a través de un filtro de jeringa de acetato de celulosa (ChemLab, España) de 0.2 µm de tamaño de poro. Esta solución fue diluida con PBS 5 mM hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 ( $\pm$  0.2) a 734 nm.

Para el análisis, se pesaron 2 g de zumo de tomate y se llevaron hasta 10 mL con agua destilada. Se agitó en el vortex durante unos segundos, se centrifugó a 4500 g durante 5 min y se extrajo el sobrenadante para la determinación de la actividad antioxidante. La recta de calibrado se elaboró empleando Trolox como patrón en el rango de concentraciones 0-0.125 mM. Los análisis se realizaron por triplicado y la capacidad antioxidante de las muestras se expresó como mmoles de equivalentes de Trolox por 100 g de zumo de tomate.

### **3.2.2. Parámetros bioquímicos**

En el estudio 1 se analizaron los niveles de glucosa, proteínas totales, triglicéridos, colesterol total y sus fracciones HDL y LDL. En el estudio 2, además de los parámetros citados en el estudio 1, se analizaron las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y paraoxonasa (PON). Todas las muestras de sangre fueron analizadas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia mediante un analizador automático (AU 600 Olympus Life, Alemania).

### **3.2.3. Examen histopatológico**

El examen histopatológico se llevó a cabo en las muestras de hígado y aorta. Las muestras previamente conservadas en formol al 10% fueron cortadas en finas láminas e impregnadas en parafina. Tras su inclusión en parafina, estas fueron cortadas con microtomo a un grosor de 4 µm para ser teñidas con hematoxilina-eosina, con la finalidad de observar las posibles alteraciones mediante microscopía óptica.

En el caso de las muestras de hígado, el grado de esteatosis se determinó siguiendo el criterio establecido por Brunt *et al.* (1999), el cual asigna un grado 0 cuando existe un porcentaje de grasa en el hígado inferior al 5 %, grado 1 cuando las vacuolas de grasa se hallan en menos de un 33 % de los hepatocitos, grado 2 cuando dichas vacuolas afectan al 33-66 % de los hepatocitos y grado 3 cuando las vacuolas se encuentran en más del 66% de los hepatocitos.

### 3.2.4. Determinación de Biomarcadores de inflamación

#### ***Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquina 6 (IL-6)***

##### ❖ Plasma

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 6 (IL-6) fueron analizadas en las muestras de plasma mediante una técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA), empleando el kit comercial Single Analyte Elisarray™ kits for Rat (QIAGEN, SA Biosciences, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estas pruebas se basan en la cuantificación de un analito específico de origen proteico mediante una reacción enzimática de tipo sándwich. Para ello, la placa se recubre de un antígeno específico de captura que reacciona con el anticuerpo (analito proteico de interés) al que se une posteriormente otro anticuerpo marcado con biotina. A continuación, el conjugado avidina-peroxidasa de rábano (Avidina-HRP) se une con el anticuerpo y tras la adición de una solución específica, desarrolla una coloración cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La absorbancia se determinó a 450 nm en un lector de placas multifunción (Synergy HT BioTek, EEUU).

Ambas citoquinas fueron analizadas en las muestras iniciales y finales de plasma. Tras ser descongeladas, las muestras fueron centrifugadas a 1000 *g* durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se empleó sin diluir para la realización de los ensayos por duplicado. Los resultados se expresaron como pg de TNF- $\alpha$ /IL6 por mL de plasma.

### ❖ Tejido Adiposo

El TNF- $\alpha$  fue también determinado en las muestras de tejido adiposo abdominal y subcutáneo usando el kit comercial de tipo ELISA RayBio® Rat TNF-alpha (RayBiotech, Inc. Norcross, EEUU). Para el análisis se pesaron 10 mg de tejido adiposo y se homogeneizaron con 500  $\mu$ l de tampón de lisado y 50  $\mu$ l de inhibidor de proteasas (Protease inhibitor Cocktail for general use P2714, Sigma Aldrich). A continuación, la muestra se agitó en vortex y se centrifugó (10.000 g, 5 min, 4 °C) para eliminar restos de tejido. Se extrajo el sobrenadante y se diluyó (1:50) con el tampón de dilución incluido en el kit y se procedió al seguimiento de las instrucciones indicadas en el protocolo. Al igual que en los kits ELISA mencionados anteriormente, la absorbancia de las muestras se determinó a 450 nm en un lector de placas.

Los resultados se expresaron como pg de TNF- $\alpha$  por mg de proteína en el caso del tejido adiposo abdominal y de ng de TNF- $\alpha$  por mg de proteína en las muestras de tejido adiposo subcutáneo. La determinación de proteínas se llevó a cabo en el mismo sobrenadante obtenido para la realización del kit, siguiendo el método de Lowry modificado por Bensadoun y Weinstein (1976).

#### ***Moléculas solubles adhesión intercelular (sICAM-1) y vascular (sVCAM-1)***

Las moléculas sVCAM-1 y sICAM-1 se analizaron en las muestras de plasma mediante un kit comercial de tipo ELISA (Cusabio Biotech Co., LTD, China). Las muestras se prepararon del mismo modo que para la determinación de TNF- $\alpha$  e IL-6 y se analizaron por duplicado, expresándose los resultados como pg de sICAM-1 por mL de plasma y ng de sVCAM-1 por mL de plasma.

### **3.2.5. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo**

#### ***Isoprostanos***

La concentración de isoprostanos se determinó en las muestras de orina usando el kit comercial ELISA Oxiselect™ 8-iso-Prostaglandin F2 $\alpha$  ELISA kit (Cell Biolabs Inc., EEUU). Los isoprostanos son un tipo de eicosanoides que se generan por la peroxidación lipídica de los fosfolípidos de tejidos y lipoproteínas plasmáticas, causada por radicales libres. Esto hace que

sean considerados un parámetro de gran aplicación para la evaluación del grado de estrés oxidativo *in vivo*.

Las muestras de orina fueron previamente descongeladas y acidificadas (pH 3.0) con HCl 1N y se diluyeron (1:4) con una solución proporcionada al objeto por el kit. A continuación, se procedió al seguimiento de los pasos indicados en el protocolo del fabricante. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Para normalizar los resultados obtenidos, la concentración de creatinina fue determinada en las muestras de orina siguiendo la metodología de Helger *et al.* (1974).

### **Malondialdehido (MDA)**

Para evaluar el grado de peroxidación lipídica se analizaron los niveles de malondialdehido (MDA) en las muestras de hígado y plasma por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), según el método descrito por Mateos *et al.* (2005).

Para los ensayos, las muestras de plasma se analizaron directamente mientras que las muestras de hígado (0.5 g) se homogenizaron en 2.5 mL de una solución tampón Trizma base 0.25 M pH 7.4 (Sigma-Aldrich, EEUU). El homogenizado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones.

A continuación, se produjo una hidrólisis alcalina combinando 250 µL de sobrenadante o plasma con 50 µL NaOH 6 M que se incubó en un baño termostático a 60 °C durante 30 min. Finalizado el proceso, se adicionaron 125 µL de ácido perclórico al 35 % para conseguir la precipitación de proteínas. Se agitó en un vortex y se centrifugó a 2800 x g durante 10 min a 4 °C. Para la inyección en el HPLC, una cantidad de 350 µL de sobrenadante se derivatizó con 25 µL de 2,4-dinitrofenilhidracina (Fluka, Suiza), se agitó en vortex y se incubó durante 30 min protegido de la luz. Finalmente, se filtró (filtro VWR 13 mm y 0.2 µm, EEUU) antes de ser inyectado en el HPLC.

La determinación de MDA se realizó mediante un equipo de HPLC (Agilent 1200 Series, Alemania) compuesto por una bomba cuaternaria (G1311A), un desgasificador (G1322A), un horno (G1316A), un inyector automático (G1311A) y un detector de diodos en serie (G1315D). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna de fase reversa LiChroCART RP-18 de 250 mm de longitud, 4 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 4 mm de longitud (Merck, Alemania). La separación de los compuestos se realizó isocráticamente utilizando como fase móvil una mezcla compuesta por

agua con un 1% de ácido acético (v/v) y acetonitrilo (62:38, v/v) con un flujo de 0,6 mL/min a 25 °C durante 30 minutos. La cuantificación de MDA se realizó a 310 nm. Los resultados se expresaron como nmol por mg de proteína en hígado y por mL en el caso del plasma. La concentración de proteínas en hígado se obtuvo siguiendo el método de Lowry, modificado por Bensadoun and Weinstein (1976).

### 3.2.6. Determinación de compuestos antioxidantes

#### *Análisis de Vitamina C*

La cuantificación de ácido ascórbico se realizó mediante HPLC siguiendo el método descrito por Esteve *et al.* (1995). El zumo de tomate se diluyó (1:2) con ácido metafosfórico (MPA) (Acros Organics, EEUU) al 1% con agua MilliQ, se agitó en oscuridad a 900 rpm durante 10 minutos en un agitador de tubos (Labnet Vortemp 1550, EEUU) y se filtró empleando un filtro de jeringa de nylon (Simplepure, Membrane Solutions LLC, EEUU) de 0.45 µm de tamaño de poro. El filtrado se conservó en viales opacos para ser inyectado en el HPLC.

Las muestras fueron analizadas en un equipo de HPLC modelo Merck-Hitachi LaChrom compuesto por una bomba modelo L-7100, un inyector automático modelo L-7200, un detector de ultravioleta modelo L-7400 y una interfaz modelo D-7000 (Merck-Hitachi, Japón). Para la separación del ácido ascórbico se empleó una columna RP-18 Lichrospher 100 de 125 mm de longitud, 4 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula, acoplada a una pre-columna del mismo material y mismo tamaño de partícula (Merck, Alemania), con un volumen de inyección de 20 µL. Como fase móvil se utilizó tampón fosfato 0.1M (pH 3.5) con un volumen de elución isocrático que se mantuvo con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó con un detector de ultravioleta a 245 nm.

Como patrón se utilizó ácido L-(+) ascórbico (Ref. 100468, Merck, Alemania) en MPA (1%) en un rango de concentración comprendido entre 0 y 100 µg/mL. Los análisis se llevaron a cabo protegidos de la luz y los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico por 100 mL de zumo de tomate.

### **Determinación colorimétrica de licopeno**

El análisis de licopeno en las muestras de heces se llevó a cabo por espectrofotometría de acuerdo al método descrito por Sharma y Le Maguer (1996). Se pesó 1 g de heces, se adicionaron 50 mL de la mezcla de extracción hexano-acetona-etanol (2:1:1, v:v:v) (J.T.Baker, Holanda) y la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min. A continuación, se añadieron 15 mL de agua destilada, se agitó de nuevo durante 10 min y finalmente se mantuvo en reposo 10 min para conseguir la separación de la fase polar y no polar, para poder medir el contenido de licopeno en esta última. La fase no polar se filtró usando un filtro Whatman nº 1 y el contenido total de licopeno presente en esta fase apolar de hexano se cuantificó en un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 300LC (Reino Unido) a una longitud de onda de 472 nm. El cálculo de la concentración de licopeno se realizó considerando su coeficiente de absorción molar específico ( $E_{1\%}$ ), siendo este de  $3450 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  en hexano. Las extracciones se realizaron por triplicado protegidas de la luz, expresándose los resultados en  $\mu\text{g/g}$  de heces.

### **Determinación de licopeno y sus metabolitos por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC/MS)**

La determinación de licopeno y sus metabolitos en el zumo de tomate y en las muestras de hígado se llevó a cabo en un sistema HPLC-MS, siguiendo el método adaptado de Seybold *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.5 g de muestra a la que se le realizaron 3 extracciones consecutivas con una solución de metanol/tetrahidrofurano (1/1, v/v) (J.T.Baker, Holanda) que contenía 0.1 % de butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma Aldrich, EEUU). El extracto resultante de las tres extracciones se evaporó a 37 °C usando una bomba de vacío. El residuo obtenido se volvió a disolver en 2 mL de etanol, se centrifugó a 20.817 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se filtró con un filtro de jeringa de PTFE con 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (VWR International, USA) y se analizó por HPLC/MS usando un espectrómetro de masas simple cuadrupolo (G2710BA) y una fuente de ionización APCI (Agilent MSD, Alemania). El equipo HPLC está compuesto por los mismos módulos descritos anteriormente para la determinación de MDA.

La separación cromatográfica de *trans*-licopeno (*E*), *cis*-licopeno (*Z*) y los metabolitos 6-,8- y 12-apo-licopenal se realizó usando una columna C30 de 250 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Trentec, Alemania) mantenida a una temperatura de 17 °C y empleando como fases móviles, terc-butil metil éter (solvente A) y MeOH (solvente B) (Merck, Alemania) a un flujo de 1 mL/min. El gradiente comenzó con un 2% de A en B, se

incrementó hasta un 35 % a los 35 min, alcanzó un 60% a los 45 min y se mantuvo durante 10 minutos, finalmente volvió a las condiciones iniciales durante 5 minutos para reacondicionar la columna entre análisis.

Después de pasar por el detector DAD, la elución se inyectó en un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (APCI) operando en modo positivo (Agilent Technologies). Las condiciones óptimas de APCI para el análisis de licopeno y sus metabolitos incluyen una presión del nebulizador de nitrógeno de 30 psi, una temperatura de vaporizador de 350 °C, una temperatura del gas de nitrógeno de 300 °C con un flujo de 6 l/min, un voltaje de capilar de 5500 V, una corriente de corona de 10 µA, y un voltaje para la fragmentación de 130 V. Se realizó un barrido de masas que se fijó a  $m/z$  150 hasta 700 y también se registró mediante SIM (*selecting ion monitoring*) fijando iones a  $m/z$  537, 443, 417 y 351 para monitorizar licopeno (*trans* y *cis*) y sus metabolitos 6-, 8-, y 12-apo-licopenal, respectivamente. La estimación cuantitativa de *trans*-licopeno en muestras biológicas se basó en la absorbancia a 472 nm. Sin embargo, la estimación cuantitativa de *cis*-licopeno (cuantificado como *trans*-licopeno equivalente), 6-, 8-, y 12-apo-licopenal se obtuvo por la extracción de sus respectivos iones moleculares.

La identificación y cuantificación se realizó por comparación cromatográfica de sus espectros de ultravioleta, tiempos de retención y espectros de masas con patrones comerciales suministrados por la empresa LGC Standards, (Barcelona, España). Los resultados se expresaron como µg de licopeno por g de hígado o mg de licopeno por 100 g de zumo de tomate.

### ***Compuestos fenólicos totales***

El contenido de fenoles totales fue determinado en las muestras de zumo de tomate mediante un ensayo colorimétrico usando como reactivo Folin-Ciocalteu, siguiendo el método descrito por Singleton y Rossi (1965), modificado y adaptado en muestras de tomate por Gahler *et al.* (2003). Para la extracción de los fenoles totales presentes en la muestra se realizaron dos hidrólisis: ácida y alcalina. En primer lugar se pesaron 2 g de zumo de tomate y se llevaron hasta 10 mL con agua destilada, se adicionó 1 mL de HCl 1 M (30%, Merck, Alemania), se agitó durante 1 min y se mantuvo en un baño de agua a 37 °C durante 30 min (hidrólisis ácida). A continuación, una vez extraída del baño, se agitó durante 1 min en vortex, se adicionó 1 mL de NaOH (Panreac, España) (2 M en 75% de MeOH (Merck, Alemania)), se

agitó de nuevo durante 1 min y se introdujo en el baño con agitación y en las mismas condiciones de tiempo y temperatura (hidrólisis alcalina). Transcurrida esta etapa se adicionó 1 mL de solución de ácido metafosfórico 0.75 M (Acros Organics, EEUU), se agitó y se centrifugó a 4500 g durante 5 min. El sobrenadante se extrajo y se llevó a un matraz de 10 mL y el precipitado se disolvió con 1 mL de solución Acetona: Agua (1+1) (J.T.Baker, Holanda), para centrifugarse de nuevo a las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido se mezcló con el anterior y la mezcla se centrifugó a 4500 g durante 30 min. Finalmente se recogió el sobrenadante y se llevó a un volumen final de 10 mL con la solución Acetona: Agua.

Para la realización del ensayo se adicionaron en una microcubeta de plástico: 100 µL de sobrenadante, 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.2 N (Sigma-Aldrich, EEUU) y 400 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M (99.5%, Panreac, España). Tras un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Evolution 300 (Thermo Scientific, Reino Unido). Se empleó ácido gálico (Ref. 398225, Sigma Aldrich, EEUU) como patrón para la obtención de la recta de calibrado en el rango 0-100 mg/L. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 mL de zumo de tomate (Gahler *et al.*, 2003).

### **Flavonoides libres**

El contenido de flavonoides libres se analizó en el zumo de tomate mediante un ensayo colorimétrico según el método de Dewanto *et al.* (2002). El proceso de extracción de la muestra se realizó del mismo modo que en la determinación de fenoles totales. Para la realización del ensayo se usaron 200 µL de extracto de zumo de tomate, mezclados con 1.25 mL de agua destilada y 75 µL de NaNO<sub>2</sub> (99%, Merck, Alemania) al 5 %. Pasados 6 min se adicionaron 150 µL de una solución de AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Probus, España) al 10% y se dejó durante 5 min antes de añadir 500 µL de NaOH 1 M (Panreac, España). La mezcla se llevó a un volumen de 2.5 mL con agua destilada y se agitó bien. Como patrón se empleó (+)-Catequina (Ref. C1251, Sigma-Aldrich, EEUU) en el rango de concentración 0-100 µg/mL, midiéndose la absorbancia a 510 nm. La muestra se analizó por triplicado y el contenido total de flavonoides libres se expresó como mg equivalentes de catequina por Kg de zumo de tomate.

### 3.2.7. Actividad de la enzima Hidroximetil-glutaril Coenzima A Reductasa (HMGCoA-R)

Para determinar la actividad enzimática de la HMGCoA-R se aplicó el método colorimétrico descrito por Venugopala-Rao y Ramakrishnan (1975). En esta técnica se miden las concentraciones de 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA y mevalonato presentes en la muestra de hígado y se calcula el cociente entre las concentraciones de estos dos compuestos. El cociente o ratio hidroximetil glutaril CoA/mevalonato es considerado un índice de la actividad de la enzima, que aumenta cuando la actividad del enzima HMGCoA-R disminuye ya que la función *in vivo* del enzima es catalizar la conversión del hidroximetil glutaril CoA en mevalonato.

Para la determinación, una porción de hígado de aproximadamente 400 mg fue homogeneizada en una solución de arsenato en solución salina fisiológica de concentración 1g/L, empleando un homogeneizador TissueRuptor (Qiagen, Suiza). Tras esto, se mezclaron a partes iguales la muestra de hígado homogeneizada y ácido perclórico al 30% (v: v en agua) Se dejó en agitación durante 5 minutos y se centrifugó (2000 rpm, 10 minutos).

La concentración de 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA se determina mediante la adición de una solución de hidroxilamina de pH 5.5 (hidroxilamina 1 M y NaOH 2.25 M), y la posterior adición de una solución de cloruro férrico (5 g de FeCl<sub>3</sub> y 2.6 g de ácido tricloroacético en 1 L de HCl 0.325 M). Esta reacción implica la formación de complejos con sales férricas y genera ácido hidroxámico cuya absorbancia se mide a 540 nm frente a un blanco de solución salina/arsenato. La determinación de mevalonato se realizó del mismo modo pero con la diferencia de que en este caso se utilizó el reactivo de hidroxilamina 1 M pH 2.1 en agua. Los reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Alemania).

### 3.2.8. Análisis de colesterol

El colesterol total se analizó en las muestras de hígado siguiendo el método enzimático descrito por Röschlau *et al.* (1974), mediante el kit colorimétrico de Roche (R-Biopharm, Alemania). El método se basa en una serie de reacciones enzimáticas de oxidación que generan finalmente, a partir del colesterol presente en la muestra, un compuesto de color amarillo cuya concentración es estequiométrica con la cantidad de colesterol, y se mide por el incremento de la absorbancia a 405 nm.

Se pesaron 3 g de hígado previamente homogeneizado en un matraz redondo de fondo plano de 250 mL y se añadió 1 g de arena de mar. A continuación, las muestras fueron hidrolizadas mediante calentamiento a reflujo durante 30 minutos con 20 mL de solución de hidróxido de potasio metanólico (1.0 M) y 10 mL de isopropanol. Una vez enfriadas las muestras, el sobrenadante obtenido fue trasvasado a otro matraz aforado de 50 mL y su volumen fue completado con isopropanol. El volumen final obtenido fue filtrado con papel de filtro para poder realizar la determinación colorimétrica.

Un volumen de muestra de hígado fue mezclado con una solución de amonio fosfato, metanol, catalasa y acetilacetona en tubos de vidrio de 10 mL, tal y como se especifica en las instrucciones del kit. A dicha mezcla se adicionó un volumen de 20  $\mu$ L de la solución de enzima colesterol oxidasa de 12 U. El blanco de muestra fue preparado del mismo modo que las muestras pero sin la adición de la enzima colesterol oxidasa. Los tubos fueron calentados en un baño a 37-40 °C durante 60 minutos. Tras ser atemperados, la absorbancia fue determinada a 405 nm utilizando una cubeta de vidrio de 1.0 cm de paso de luz. El autocero se realizó frente al aire y la absorbancia obtenida en el blanco fue restada a la obtenida en cada una de las muestras ( $\Delta A$ ). Los resultados se expresaron como mg de colesterol por 100 g de muestra.

### 3.2.9. Análisis de grasa total y ácidos grasos

#### ***Grasa total***

La determinación de grasa total se realizó en las muestras de hígado siguiendo el método Soxhlet (Hijona *et al.*, 2010). Para ello, se pesaron aproximadamente 0.5 g de muestra previamente desecada. A continuación, se añadieron 50 mL de éter etílico (J.T. Baker, Holanda) a través de los distintos canales y se procedió a la extracción de la grasa siguiendo las cuatro etapas indicadas en el equipo (evaporación, lavado, recuperación del disolvente y secado) (2055 Soxtec Foss Tecator, Suiza). Los resultados se expresaron como g de grasa total por 100 gramos de tejido.

### **Ácidos grasos de cadena larga**

El perfil de ácidos grasos de cadena larga se analizó en las muestras de hígado siguiendo el método descrito por Peso-Echarri *et al.* (2012) con algunas modificaciones.

Se pesaron aproximadamente 2 g de hígado en tubos de vidrio y se homogenizaron con 2 mL de hexano (Panreac, España) usando un homogeneizador de tejidos TissueRuptor (Qiagen, Suiza). A continuación, se centrifugaron (5000 g 5 min 4 °C), se extrajo el sobrenadante y se volvió a repetir el proceso de extracción añadiendo de nuevo 2 mL de hexano. La combinación de ambos sobrenadantes se mezcló y se adicionaron 0.7 mL de potasa metanólica 2 N (Panreac, España) para conseguir la metilación de los ácidos grasos.

Tras un reposo de 1 hora, se extrajo una parte de la capa superior y se colocó en un vial para ser analizado por cromatografía líquida de gases utilizando un equipo Agilent GC 7890A con un detector de ionización de llama (FID) operando en modo *split* (20:1) y una columna DB 23 de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). Las muestras fueron analizadas por duplicado y los ácidos grasos metilados fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos en los patrones (Supelco 37 component FAME mix from Supelco, EEUU). Los resultados se expresaron como mg de ácido graso por g de hígado.

### **Ácidos grasos de cadena corta**

El perfil de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) fue determinado en las muestras de heces según el método Girard-Pipau *et al.* (2002), con algunas modificaciones respecto a cantidad de muestra y tiempos de homogenización, con el fin de mejorar dicho proceso.

Se pesaron aproximadamente 400 mg de heces previamente descongeladas y se homogeneizaron con 1.8 mL de agua milli-Q mediante agitación. A continuación, se añadieron 0.4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50 % (Panreac, España) en agua y se mezcló bien en el vortex durante 2 min. Después, se adicionaron 0.8 g de NaCl (Panreac, España) y 1 mL de éter etílico (J.T. Baker, Holanda), y se agitó de nuevo en el vortex (Heidolph Reax 2000, Alemania). Las muestras se colocaron en un agitador orbital (OVAN N12-E, Europa) durante 1 hora y se centrifugaron a 1200 g durante 5 min a temperatura ambiente (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Alemania), para conseguir la separación de las fases.

Un volumen de 2  $\mu\text{L}$  de la capa superior de la muestra se inyectó en el cromatógrafo de gases 7890A GC (Agilent Technologies, EEUU) con un detector de ionización de llama y un inyector automático 7683 B (Agilent Technologies, China). La separación de AGCC se llevó a cabo en una columna capilar Nukol™ (24107, EEUU) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. Como gas portador se utilizó Helio (Alphagaz, España) a una presión constante del inyector de 58.99 kPa. La temperatura inicial del horno fue de 80  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y aumentó hasta 185  $^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La temperatura del detector fue de 220  $^{\circ}\text{C}$ , al igual que la del inyector. El flujo de aire e hidrógeno fue de 400 mL/min y 30 mL/min, respectivamente.

Para la identificación de los diferentes AGCC se utilizó una solución multipatrón comercial con una concentración de 10 mM (46975-U, SUPELCO, EEUU), de ácidos grasos de cadena corta de calidad y composición certificadas (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocaproico, ácido caproico y ácido heptanoico). El rango de concentraciones de patrón fue de 1 a 10 mM. Los resultados se procesaron con el Software ALS Controller Utility proporcionado por Agilent Technologies. La concentración de AGCC se expresó como mmol/kg de heces.

### 3.2.10. Parámetros normalizadores de la concentración

#### ***Creatinina***

Para normalizar el contenido de isoprostanos en las muestras de orina se analizó la creatinina siguiendo el método espectrofotométrico del ácido pícrico por la reacción de Jaffè (Helger *et al.*, 1974). Este método se basa en la reacción de la creatinina presente en las muestras con el ácido pícrico alcalinizado, lo que da lugar a la formación de un complejo de color rojo cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 510 nm.

La solución de ácido pícrico en medio alcalino se preparó en el momento del análisis mezclando a partes iguales una solución acuosa de NaOH 1.6 M (64 g/L) (Panreac, España) y una solución acuosa de ácido pícrico 35 nM (8 g/L) (Panreac, España). Para la calibración se usó un patrón de creatinina (Ref. 105206, Merck, Alemania) a una concentración de 2 mg/100 mL. Las muestras de orina fueron diluidas (1:50) con agua destilada y preparadas como se describe a continuación. Se adicionó un 1 mL de la solución de ácido pícrico alcalinizado en cubetas de

plástico que contenían 500 µL de muestra, patrón o agua destilada (blanco). Se agitaron y se mantuvieron a temperatura ambiente y oscuridad durante 20 minutos. A continuación, se determinó la absorbancia a 510 nm, realizando un autocero frente al aire. Los resultados se expresaron como mg de creatinina por mL de orina y se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Creatinina (mg/mL)} = \frac{\Delta \text{ Absorbancia muestra} \times \text{Concentración patrón}}{\Delta \text{ Absorbancia patrón} \times 100} \times \text{Factor de dilución}$$

### **Proteínas totales**

El contenido de proteínas totales se analizó en las muestras de hígado para normalizar su concentración en malondialdehído (MDA) siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Bensadoun y Weinstein (1976). Se trata de un método colorimétrico, en el que se produce una reducción de los ácidos constituyentes del reactivo de Folin-Cicocalteau, el ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdico, originando azul de wolframio y de molibdeno. La sensibilidad de esta técnica permite determinar el nitrógeno proteico (dipéptidos) liberado durante la proteólisis.

Para la extracción de la muestra se pesaron 20 mg de hígado en un tubo Eppendorf de 2 mL, se adicionó 1 mL de agua destilada y se homogenizó con un homogeneizador de tejidos (TissueRuptor, Qiagen, Suiza). Seguidamente, se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4 °C y se extrajo el sobrenadante. Finalmente el extracto fue diluido con agua destilada (1:50).

El desarrollo de esta técnica supuso la preparación de tres reactivos: A (10 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99.5% Panreac, España) y 2 g de NaOH (Panreac, España) en 500 mL de agua destilada), B (1g de KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, EEUU) en 100 mL de agua destilada) y C (SO<sub>4</sub>Cu·5H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, EEUU) en 100 mL de agua destilada). A continuación, los reactivos A, B y C se mezclaron siguiendo la proporción 5:1:1, respectivamente para constituir la solución de trabajo de Biuret. En un tubo Eppendorf de 2 mL se mezclaron 1.25 mL del reactivo de Biuret con 250 µl del extracto, se agitó y se introdujo en el baño a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 62,5 µl de reactivo de Folin-Cicocalteau (Sigma Aldrich, EEUU) en proporción 1:1 con agua destilada, y se introdujo de nuevo en el baño a 37°C durante 20 minutos, hasta el desarrollo de color azul. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 300LC, Reino Unido) a 700 nm utilizando para la calibración un

blanco de reactivos. Para la calibración se empleó albúmina sérica bovina (Ref. A9647, Sigma Aldrich, EEUU) en el rango 0-4 mg/mL.

### 3.2.11. Estudio de expresión génica

El análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en muestras de hígado se realizó mediante un chip de ADN (microarray). El ARN total fue extraído y aislado de cada muestra de hígado (30 mg) utilizando el kit comercial TNeasy® Mini Kit (Qiagen, Alemania). Para eliminar las posibles trazas de ADN genómico de las extracciones, estas fueron tratadas con ADNasa I (SABiosciences, Qiagen). Una vez extraído el ARN, su concentración y pureza se midió por espectrofotometría empleando un equipo NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, EEUU). Sólo aquellas muestras cuyos ratios de absorbancia a 260nm/230nm y 260nm/280nm fueron superiores a 1.8 se consideraron de alta pureza para ser empleadas en los procedimientos sucesivos.

Posteriormente, 1 µg de ARN total extraído de cada muestra de hígado se empleó para llevar a cabo la transcripción inversa, mediante el kit RT2 first strand kit (SABioscience, Qiagen). El ADN complementario (ADNc) obtenido de la transcripción se empleó para analizar la expresión de los genes mediante la PCR a tiempo real (qPCR). Para esta técnica se usó un termociclador de Roche LightCycler 480 (Roche Diagnostics Corporation, EEUU), que incorpora un lector de fluorescencia para poder medirla en cada pocillo donde se realiza la amplificación.

Los ensayos de *array* empleados para evaluar el efecto del consumo de zumo de tomate sobre la expresión de algunos genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos se llevaron a cabo mediante el *array* PARN-007Z (Qiagen Company, EEUU), que incluye 84 genes implicados en el catabolismo, biosíntesis y transporte de ácidos grasos, cetogénesis y catabolismo de triglicéridos.

El análisis de los cambios en los niveles de expresión diferencial de los genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos en los grupos experimentales, se realizó empleando el paquete Software PCR RT<sup>2</sup> Profiler™ basado en el método  $\Delta\Delta CT$  que aparece disponible en la página web (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) de la casa comercial SABioscience. Los resultados de la expresión génica de este *array*

comercial fueron considerados estadísticamente significativos cuanto el valor de expresión de cada gen fue de 2 o superior o de -2 o inferior y el *P*-valor igual o inferior a 0.05.

### 3.2.12. Análisis de metabolitos hepáticos

La extracción de metabolitos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Lazzarino *et al.* (2003) con algunas modificaciones introducidas por Bernal *et al.* (2013). Para eliminar las proteínas presentes en las muestras de hígado, estas se homogeneizaron con 2 mL de una mezcla de acetonitrilo y 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3:1 v/v) a pH 7.4 y se incubaron en un agitador orbital durante 30 min a 4 °C. A continuación, se centrifugaron a 15.000 *g* durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se mezcló con 4 mL de cloroformo y se centrifugó de nuevo a 15.000 *g* durante 5 min. Este proceso favoreció la formación de un sistema bifásico, a partir del cual se extrajo la fase acuosa libre de solventes y sustancias liposolubles que pudieran interferir en el análisis de los metabolitos. La extracción se realizó dos veces más. Finalmente, la combinación de sobrenadantes obtenidos se filtró mediante un filtro estéril de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de ser analizada por HPLC-MS.

Estos extractos se analizaron en un equipo HPLC serie 1200 (Agilent Technologies, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas simple cuadrupolo Agilent 6120 con una fuente de ionización ortogonal por electrospray (ESI). Las condiciones óptimas para el análisis de los distintos metabolitos incluyeron un voltaje de 4000 V. El nitrógeno se usó como gas portador (35 psi) y gas auxiliar a un flujo de 12 L/min. El capilar de transferencia de iones se calentó hasta alcanzar 300 °C y el voltaje de fragmentación fue de 100 V. El espectrómetro de masas operó en modo positivo y se realizó un barrido de masas de *m/z* 50 hasta 1000 y también se registró mediante SIM (*selecting ion monitoring*) fijando los distintos iones de cada uno de los metabolitos de interés. La identificación de cada uno de los metabolitos se realizó por comparación cromatográfica con patrones comerciales comparando los tiempos de retención y la intensidad relativa de sus iones. Por este motivo, se registró el espectro de masas de patrones puros y únicos y se comparó con el espectro de masas de un pool de muestras en el tiempo de retención correspondiente. Los iones de diagnóstico empleados para la identificación de los distintos metabolitos, así como sus intensidades relativas pueden consultarse en la **Tabla 2** de la publicación Bernal *et al.* (2013) (**Anexo**).

La cuantificación de cada uno de los metabolitos se realizó mediante el registro de los iones en modo SIM. Para la separación de los metabolitos se inyectó un volumen de 10 µL del extracto y una columna ZIC-HILIC de 150 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, provista de una precolumna de 20 mm x 2.1 mm y 5 µm (Merck SeQuant, Alemania), a una temperatura de 25 °C. Para la elución de los metabolitos se empleó un gradiente con un flujo de 0.5 mL/min, utilizando como fases móviles acetato de amonio 20 mM (ajustado a pH 7.5 con NH<sub>4</sub>OH) en agua (solvente A) y acetato de amonio 20 mM en acetonitrilo (solvente B). El gradiente de elución aumentó hasta alcanzar un 80% de A en B en 30 min y volvió a las condiciones iniciales que se mantuvieron durante 15 min. Los datos se adquirieron mediante el software Agilent Chemstation proporcionado por el fabricante del equipo. A continuación, la aplicación web EasyLCMS (Fructuoso *et al.*, 2012) se utilizó para la cuantificación automatizada. Las áreas de las muestras y del patrón se normalizaron mediante la siguiente ecuación (Bunk *et al.*, 2006):

$$AN = \frac{A \times N}{AIS}$$

Donde A es el área de la muestra o patrón sin normalizar, AN es el área normalizada, N es el valor de normalización (10<sup>6</sup> por defecto) y AIS el área del patrón interno *N*-acetilglutamina (Bajad *et al.*, 2006).

### 3.2.13. Biomarcadores de origen peptídico

El análisis de biomarcadores de origen peptídico se realizó en las muestras de orina mediante electroforesis capilar asociada a un espectrómetro de masas (CE-MS) siguiendo el método descrito por Mullen *et al.* (2011).

Antes de comenzar con el proceso de extracción se adicionó a las muestras una solución saturada de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) preparada con etanol al 99%, en una proporción 1:1000 para evitar la degradación de las proteínas. Se agitó bien y se diluyó una alícuota de 0.7 mL de orina con 0.7 mL de tampón urea preparado con urea 2 M y NH<sub>4</sub>OH 10 mM con 0.02 % de dodecilsulfato sódico (SDS).

Con el fin de eliminar las proteínas de mayor peso molecular, tales como la albúmina y la inmunoglobulina G, las muestras se filtraron a través de filtros Centriscart® de ultracentrifugación (Centriscart ultrafilter tubes 20 kDa, 0.62 cm<sup>2</sup>, Sartorius Stedim Limited, Reino Unido) y se centrifugaron a 2000 g durante 60 min a 4 °C para conseguir un volumen de filtrado de 1.1 mL. A continuación, este volumen se transfirió a unas columnas PD-10 (GE Healthcare Biosciences AB, EEUU), equilibradas previamente con tampón amonio preparado con 0.01 % de NH<sub>4</sub>OH en H<sub>2</sub>O de grado HPLC, para eliminar los electrolitos, la urea y las sales. El extracto obtenido se utilizó para el análisis de los biomarcadores y para la determinación de proteínas. Finalmente, todas las muestras fueron liofilizadas (Heto PowerDry LL1500, Thermo Scientific, EEUU) y almacenadas a 4 °C hasta su posterior análisis. El contenido de proteínas totales fue analizado previamente mediante un kit colorimétrico (FT-40840A BC Assay, Interchim, Uptima, Francia) cuya absorbancia se midió a 562 nm en un lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, EEUU).

Antes del análisis por CE-MS, las muestras fueron resuspendidas con H<sub>2</sub>O de grado HPLC, ajustando el volumen al contenido de proteínas de cada muestra para alcanzar una concentración final de 2 µg/µL. A continuación, se transfirieron 10 µL de la muestra resuspendida al vial (PCR® strip tubes, Axygen INC, EEUU) para ser analizada en el equipo.

Para llevar a cabo los análisis por CE-MS se empleó un sistema de electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter, EEUU) equipado con un capilar de cristal de sílice de 90 cm de longitud y 50 µm de diámetro interno. El capilar se limpió previamente con una solución tampón de lavado (20 % de ACN, 0.5 % de una solución de ácido fórmico 0.25 M y 79.5 % de H<sub>2</sub>O grado HPLC) durante 3 min antes de la inyección de la muestra. La inyección de la muestra se realizó durante 99 s con una presión de 2.0 psi, dando lugar a un volumen de inyección de muestra de 290 nL. La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de +25 kV por la parte de la inyección, produciendo una corriente aproximada de 13 µA, y la temperatura del capilar se mantuvo en 35 °C. El sistema CE se acopló a un espectrómetro de masas Micro-TOF (Bruker Daltonic, Alemania). El análisis por MS se realizó en modo positivo con un kit de spray ESI-TOF de Agilent Technologies, (EEUU). Se utilizó una fuente de ionización ESI (Agilent Technologies, EEUU) con una potencial establecido entre -4 y -4.5 kV. El líquido de cobertura formado por un 30% v/v de isopropanol y un 0.4 % v/v de ácido fórmico en agua de grado HPLC, se utilizó coaxialmente con un flujo de 20 µL/h. Estas condiciones dieron como resultado un límite de detección de aproximadamente 1 fmol de los diferentes péptidos patrones (entre 1500 y 14000 Da). Los espectros se guardaron cada 3 s en un rango de *m/z* de 350 a 3000. Después de

cada lectura el capilar se lavó durante 5 min (50 psi) con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (3.76 ml del stock  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% en 50 ml de agua), seguido de otros 5 min (50 psi) con agua y finalmente 5 min (50 psi) con *running buffer*.

Los valores  $m/z$  de los picos obtenidos se deconvolucionaron y se combinaron cuando estos representaban moléculas idénticas en diferentes estados de carga, mediante el software MosaiquesVisu (Neuhoff *et al.*, 2004) (Mosaiques diagnostics and therapeutics AG, Alemania). Este software emplea un algoritmo de agrupación probabilístico y usa la distribución isotópica y las masas conjugadas para la determinación de polipéptidos por el estado de carga. La lista de picos resultante caracteriza cada polipéptido por su masa molecular (0.8-30 kDa) y su tiempo de migración normalizado. Todos los polipéptidos detectados se incluyen en una base de datos (Microsoft SQL) que permite la identificación de las proteínas a partir de las secuencias peptídicas obtenidas de las muestras. Los polipéptidos de las diferentes muestras se consideran idénticos cuando la desviación de la masa es inferior a 50 ppm y la desviación del tiempo de migración es inferior a 2 min. Esto permite la generación de picos de péptidos patrones de las muestras de individuos sanos, que se utilizan para la normalización de los péptidos de las muestras de estudio.

Los reactivos empleados en estos análisis fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Reino Unido), con un grado de pureza adecuado para su uso en HPLC.

### 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.3.1. Análisis estadístico general

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS) 15.0 para Windows (IBM, EEUU). Se llevó a cabo un análisis descriptivo expresando los datos en forma de valor medio, y error típico o desviación estándar dependiendo del parámetro de estudio. Para determinar la existencia de posibles diferencias entre las variables de estudio entre los tres (grupo control, 1 y 2) o cuatro grupos (NA, NL, HA, HL), dependiendo del estudio (1 ó 2, respectivamente), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, empleando un intervalo de confianza del 95%, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$  y un test de separación de medias, seleccionando el test de Tukey en aquellos casos en los que existía homogeneidad de varianzas y el test de Games-Howell cuando no existía homogeneidad. Además, se realizó una

comparación entre las medias de los datos iniciales y finales de un mismo parámetro dentro de cada grupo de animales mediante la prueba *t* de Student con un nivel de significación de 0.05, con el fin de detectar posibles cambios producidos a lo largo del periodo de intervención. En el caso del contenido de licopeno en heces se realizó también una correlación de Pearson junto con el contenido de AGCC en heces, considerando correlaciones estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

### 3.3.2. Análisis estadístico específico

#### ***Metabolitos hepáticos***

En relación al análisis estadístico de los metabolitos hepáticos, para determinar las diferencias de todas las variables de estudio entre los cuatro grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se aplicaron diferentes *tests* de separación de medias (Bernal *et al.*, 2013). Para explicar la tasa de error por grupos los valores *p* obtenidos se ajustaron aplicando la tasa de falso positivo (FDR) de Benjamini-Hochberg con una proporción del 5 % de falsos positivos. Los valores *p* de ANOVA se ajustaron de forma similar. Para determinar las diferencias significativas entre las variables medidas antes y después del consumo de zumo de tomate (valores iniciales y finales) se realizó una prueba *t* de Student, considerando diferencias significativas cuando  $p < 0.05$ .

Respecto al análisis estadístico de los metabolitos hepáticos, las concentraciones de los metabolitos seleccionados se normalizaron por el peso del tejido y posteriormente se sometieron a un proceso de autoescalado consistente en sustraer el valor medio y dividirlo por la desviación estándar de cada metabolito. Este método de autoescalado ha demostrado ser óptimo en lo que respecta a las expectativas biológicas y su aplicación se justifica por el hecho de que las concentraciones de los metabolitos se diferenciaban en varias órdenes de magnitud y un análisis principal de componentes (PCA) es dependiente de la escala.

#### ***Biomarcadores de origen peptídico***

Los datos producidos por las *-omics* se caracterizan por su gran volumen ya que se obtiene simultáneamente información sobre cientos o miles de genes, proteínas, péptidos, metabolitos, etc. La estadística clásica, centrada en los tests de hipótesis, tiene ciertas

limitaciones a la hora de tratar esa información. Esta aproximación clásica consiste en testar las diferencias estadísticamente significativas de un marcador entre dos o más tratamientos experimentales. Para el caso de dos tratamientos se puede, por ejemplo, aplicar un test de la  $t$  o el test de Wilcoxon. En el experimento aquí mostrado tendríamos un ANOVA de dos vías (dieta alta en grasa o no  $\times$  ingestión de zumo de tomate o no) para un análisis semana por semana.

En presencia de cientos o miles de variables (péptidos, metabolitos) es necesario realizar cientos o miles de tests, lo que lleva al conocido problema de la multiplicidad de tests o comparaciones múltiples. Si aplicamos el criterio estándar de rechazar la hipótesis nula de un test individual en el nivel de significación  $<0.05$ , entonces cuando se realizan cientos o miles de tests, en muchos de ellos se rechazará la hipótesis nula erróneamente (Error Tipo I, falso positivo). La corrección por multiplicidad implica que el nivel de significación de un test individual considerado aceptable para mantener un error  $<0.05$  a nivel global tiene que ser inferior o muy inferior a 0.05. De esta manera, cuando los tamaños muestrales son bajos y el número de tests a realizar muy alto, como en el caso de un estudio experimental donde el número de individuos es bajo por cuestiones regulatorias (RD 1201/2005, derogado y sustituido por el RD 53/2013) y el número de variables muy alto como ocurre en el experimento mostrado en este capítulo, resulta muy difícil cumplir con las exigencias de un test de multiplicidad para encontrar diferencias estadísticamente significativas bajo el marco clásico de los tests de hipótesis.

La técnica aplicada en este estudio fue Mínimos Cuadrados Parciales – Análisis Discriminante sobre matrices dispersas (*sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis*; sPLS-DA) (Lê Cao *et al.*, 2011). La técnica de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) se desarrolló en los años 1960 como un análogo del análisis de regresión en situaciones de fuerte multicolinealidad, es decir, cuando los predictores de la regresión están fuertemente correlacionados entre sí, y también está especialmente indicado cuando el número de variables es mayor o mucho mayor que el de casos. En general, en todos los campos de la ciencia, la situación habitual es que el número de casos fuese superior o muy superior al número de variables. En las *-omics*, por el contrario, se dispone, por lo general, de muchas más variables que casos.

En el análisis de regresión clásica si el número de predictores (las variables a partir de las cuáles se quiere predecir la respuesta de la variable dependiente) excede al número de

casos, el modelo sufre de *sobreajuste (overfitting)*, de tal manera que se ajusta perfectamente a los datos experimentales pero predice erróneamente cualquier nuevo resultado. Cuando el número de predictores es muy alto, es habitual que exista una fuerte correlación entre ellos. Así, por ejemplo, habrá péptidos que tiendan a aparecer de manera conjunta con valores muy altos en determinados tratamientos. En esta situación, se asume que los predictores asociados entre sí en realidad representan una variable *latente*. La técnica está orientada a determinar y caracterizar matemáticamente esa variable latente. Esto es habitual en las técnicas de análisis multivariante, como el clásico análisis de componentes principales (PCA), si bien el algoritmo particular aplicado en PLS es diferente. Estas variables latentes o factores se pueden expresar como una combinación lineal de los predictores originales, es decir, en la forma  $a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$ , lo que permite relacionar los predictores con las principales variables latentes.

PLS, como análogo de la regresión, está enfocado a la predicción de variables cuantitativas, como por ejemplo el nivel de un metabolito en sangre en función del perfil de péptidos. En el caso que nos ocupa, la variable objetivo es diferente, ya que lo que nos interesa es responder a la pregunta: ¿puedo predecir a qué tratamiento pertenece un individuo en función de su perfil peptídico? Obsérvese que la pertenencia a grupo es una variable de clase, una variable cualitativa. Específicamente, en el contexto de los biomarcadores se trata de encontrar un conjunto de péptidos que predigan la pertenencia de un individuo a un tratamiento con una baja tasa de error. Una evolución de la técnica PLS a mínimos cuadrados parciales – análisis discriminante (PLS-DA) permite predecir la pertenencia a una clase. La primera aplicación de esta técnica parece ser por Gottfries *et al.* (1995), aunque no se generaliza su conocimiento hasta 8 años después (Barker *et al.*, 2003).

En este capítulo hemos aplicado la variante sPLS-DA (Lê Cao *et al.*, 2011), con la *s* indicando *sparse* (disperso), que en una matriz señala la abundancia de ceros. En PLS-DA cada variable latente o factor es caracterizado como una combinación lineal de todos los predictores. Por ejemplo, si disponemos de un perfil con 800 péptidos, cada variable latente es caracterizada como una combinación de esos 800 péptidos. En la identificación de biomarcadores esto puede ser un hándicap porque, aun obteniendo un buen predictor de la pertenencia de un individuo a un tratamiento experimental, resultará muy difícil seleccionar buenos marcadores. La versión *sparse* permite controlar el número de predictores máximo que serán incluidos en los modelos. De esta forma, se obtienen variables latentes relacionadas con un número reducido de predictores (péptidos) que deben permitir una exploración más fácil como biomarcadores.

El análisis se ha llevado a cabo con el paquete *mixOmics* (González *et al.*, 2011) del lenguaje R (R Core Team, 2015). Asimismo, se ha seguido el esquema de análisis propuesto por Lê Cao *et al.* (2011), con algunas modificaciones.

El procedimiento de implementación ha sido el siguiente:

1. Los grupos a tratar fueron cuatro, clasificados según el tipo de dieta (dieta estándar o alta en grasa) y el tipo de bebida (ingesta de zumo de tomate o agua). A su vez, se recolectaron muestras de estos cuatro grupos a lo largo de 4 semanas, por lo que una clasificación de tratamientos (4) × semana (4) genera 16 grupos. Asimismo, como se observa en los análisis exploratorios (**Figura 4.17**<sup>1</sup>) era evidente que las ratas con dieta normal, independientemente de su ingestión de zumo de tomate, presentaban unos perfiles peptídicos muy similares lo que daría lugar a 3 grupos (dieta estándar (N), dieta alta en grasa sin zumo (HA) y dieta alta en grasa con zumo de tomate (HL)). Por tanto, se exploraron 3 tipos de modelos: semana a semana con los 4 grupos originales (4 modelos tipo, uno por semana); semana a semana con 3 grupos resultantes de la agregación de todas las ratas de dieta normal (4 modelos tipo, uno por semana); todas las semanas y tratamientos simultáneamente resultando en 16 grupos (1 modelo tipo). En total se exploran 9 modelos tipo.
2. Cuando los modelos se realizaron por semanas (modelos de 3 y 4 grupos), las matrices de péptidos utilizadas para cada semana eran ligeramente diferentes, ya que para cada semana se eliminaron aquellos péptidos cuya varianza es muy próxima a 0, que no necesariamente coinciden entre semanas.
3. Para cada modelo tipo se construyeron modelos desde 1 componente (variable latente, factor) a n-1 componentes, donde n es el número de grupos a clasificar por el modelo. Por tanto, resulta en 3 modelos para el modelo tipo de 4 grupos por semana, 2 para el modelo tipo de 3 grupos por semana y 15 para el modelo de 16 grupos. Esto supone un total de  $(3 \times 4) + (2 \times 4) + (15 \times 1) = 35$  modelos.
4. Cada uno de los modelos anteriores se construyó con un mínimo de 1 predictor por componente hasta un máximo de 50 por componente, lo que da un total de  $50 \times 35 =$

---

<sup>1</sup> La Figura 4.17 se encuentra en el Capítulo 4. Resultados y Discusión

1750 modelos básicos. La bondad de cada uno de estos modelos se juzgó mediante la tasa de error en la clasificación. Cada modelo, en función del perfil peptídico, predice el grupo al que pertenece cada uno de los animales experimentales. Si el animal es asignado a un grupo distinto al suyo se produce un error.

5. Para seleccionar los mejores modelos básicos, cada uno de los 1750 se seleccionó mediante validación cruzada. Brevemente, en la construcción de modelos de base estadística, si el tamaño muestral es bajo, se sabe que los parámetros del modelo son muy dependientes de la muestra, produciendo un sobreajuste del modelo a los datos concretos (*overfitting*). Para prevenir este efecto aleatorio se extraen submuestras, de tal forma, que una parte de la muestra se utiliza para construir el modelo y otra parte para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Por ejemplo, se construye un modelo con el 90% de los animales experimentales y se comprueba si el 10% de los animales experimentales excluidos son correctamente clasificados o no. Esto se repite tantas veces como en subconjuntos se divide la muestra. En nuestro caso, se ha elegido dividir la muestra en 10 submuestras para el propósito de validación cruzada. Por tanto, se requieren de  $10 \times 1750 = 17500$  ejecuciones de los modelos. Para cada una de las validaciones cruzadas (10 ejecuciones por modelo) se calculó la tasa promedio de error.
6. A partir de la tasa promedio de error se seleccionaron los modelos tipo que mejor predicen el tratamiento aplicado a cada animal experimental que resultan ser los de 3 grupos semana a semana (**Tabla 4.12**<sup>2</sup>). Para un análisis detallado de los posibles biomarcadores, se seleccionaron para cada semana los 5 mejores modelos básicos, definidos como aquellos con menor tasa de error.
7. Aunque el carácter *sparse* de los modelos garantiza que se necesita chequear un máximo de 50 péptidos como biomarcadores, se estableció como límite, que el péptido tuviese una carga (*load*) mínima de 0.15 en algún componente, en alguno de los 5 mejores modelos. La carga es la correlación del péptido al componente (variable latente) y, por tanto, a mayor carga más evidencia de que la tendencia de variación que representa el componente y que permite discriminar entre grupos, está realmente relacionada con la variación del péptido.

---

<sup>2</sup> La Tabla 4.12 se encuentra en el Capítulo 4. Resultados y Discusión

## *Capítulo 4. Resultados y Discusión*



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ESTUDIO CON ANIMALES NORMOCOLESTEROLÉMICOS (ESTUDIO 1)

La **Tabla 4.1** muestra la composición nutricional de ambos zumos, así como el contenido de compuestos bioactivos antioxidantes, vitamina C y fibra dietética. El contenido total de hidratos de carbono y proteínas es similar en los dos zumos. Sin embargo, existen diferencias significativas en lo que respecta a los valores de lípidos y fibra dietética. El zumo de tomate con bajo contenido en licopeno (BL) se elaboró con aceite de oliva, alcanzando un nivel de lípidos del 1 %, mientras que el zumo con alto contenido en licopeno (AL) se elaboró sin la adición de lípidos, presentando por tanto unos niveles de este nutriente similares a los del tomate. Además, el zumo BL se fabricó siguiendo un método de procesado diferente, en el que el tomate se tritura en fresco y posteriormente se somete a una pasteurización rápida. De este modo, se obtuvo un zumo con un mayor contenido en fibra dietética total (FDT) en el producto final en comparación con el zumo AL, que se fabricó mediante un procedimiento estándar a partir de concentrado de tomate y recibió doble tratamiento térmico.

Respecto al contenido de licopeno, el zumo BL mostró una concentración menor de este carotenoide (2.7 mg/100 mg) que el zumo AL, que presentó una concentración cuatro veces superior (12.0 mg/100 mg). El contenido de vitamina C, compuestos fenólicos y flavonoides totales no presentó diferencias significativas entre ambos zumos. Por otra parte, la capacidad antioxidante determinada por el ensayo TEAC fue significativamente mayor en el zumo AL.

Los datos de ingesta de comida y bebida de los animales durante el periodo de intervención se presentan en la **Tabla 4.2**. A pesar de que los animales se alimentaron *ad libitum*, el rango de ingesta de alimento osciló entre 18.2 y 22.7 g/día, siendo la ingesta del grupo 1 menor que la del grupo 2. Además, también se observaron diferencias en la cantidad registrada de agua o zumo de tomate, ya que los animales del grupo 2 bebieron un volumen superior en comparación al resto de grupos. Por lo tanto, la excreción de heces y orina se correlaciona positivamente con la cantidad de alimento y bebida ingerida.

La absorción aparente de licopeno se estimó a partir de la ingesta diaria de licopeno presente en el zumo de tomate y la excreción del mismo a través de las heces. La ingesta diaria de licopeno fue de 0.48 y 3.59 mg/día en los grupos 1 y 2, respectivamente. Los valores de absorción aparente de licopeno fueron muy elevados en ambos grupos, alcanzando valores de

94.37 % y 93.59 %, respectivamente. El licopeno se acumula principalmente en hígado, al tratarse del primer órgano que recibe los nutrientes tras su paso por el intestino (Zhao *et al.*, 1998; Boileau *et al.*, 2002), y como se esperaba, dicha acumulación fue significativamente mayor en el grupo 2 que en el grupo 1 (2.03 y 0.84  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) debido a la diferencia de licopeno ingerido diariamente. Estos resultados muestran una correlación positiva entre la cantidad de zumo de tomate ingerido y el licopeno presente en los mismos. Sin embargo, el porcentaje de absorción aparente, es decir, la relación entre la cantidad ingerida de licopeno y la excretada fue muy similar en ambos grupos.

En lo que respecta al porcentaje de isomerización del licopeno, Stahl y Sies (1992) observaron en voluntarios sanos que, a pesar de que la dosis de zumo de tomate proporcionada sólo aportaba el 20 % de isómeros *cis*-licopeno, el suero sanguíneo extraído contenía un 50 % de estos isómeros tras el consumo de zumo de tomate, debido a que la isomerización del licopeno *in vivo* tiene lugar tras la absorción, dentro de las células intestinales (Richelle *et al.*, 2010). En nuestro estudio pudimos observar un incremento de isómeros *cis*-licopeno tras la ingesta del zumo de tomate, con valores de 38.1% y 35.1% en las muestras de hígado de los grupos 1 y 2, respectivamente. Estos valores son menores que los obtenidos por Boileau *et al.* (2002), quienes hallaron valores de entre 63 y 82% de isómeros *cis* en muestras de hígado de ratas alimentadas con licopeno empleando concentraciones de hasta 5.0 g/Kg durante 8 semanas. Estas diferencias podrían deberse a que en el presente estudio los animales tomaron zumo de tomate sólo durante 3 semanas, por lo que la acumulación de licopeno en hígado podría incrementarse a medida que se prolongase el tiempo de ingesta de este carotenoide.

La **Tabla 4.3** muestra los parámetros bioquímicos y hematológicos de las muestras de plasma obtenidas al inicio y final del periodo de estudio. No se hallaron diferencias significativas en los parámetros hematológicos, colesterol total y proteínas. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las fracciones de colesterol HDL y LDL, al comparar los grupos experimentales con el grupo control y los valores iniciales con los finales. El colesterol HDL se incrementó significativamente en los grupos experimentales con respecto al grupo control al final del estudio. Además, también se observó un incremento de los valores de colesterol LDL en las muestras finales, pero sin obtenerse diferencias significativas entre los grupos 1 y 2. Sólo se observaron diferencias significativas de colesterol LDL al comparar el valor inicial con los valores finales de cada grupo. El consumo de zumo de tomate no ejerció un efecto hipocolesterolémico en las diferentes fracciones; sin embargo, el incremento de los valores de colesterol HDL contribuyó a la existencia de diferencias

significativas en el índice aterogénico entre el grupo control y los grupos de intervención, sin observarse diferencias entre los dos grupos que consumieron zumo de tomate.

La HMGCoA-R es la enzima limitante de la síntesis de colesterol y su actividad está regulada por diferentes factores dietéticos. La actividad de HMGCoA-R fue determinada a partir del ratio HMG/Mevalonato, y mientras en el grupo control y grupo 1 no se hallaron diferencias significativas, el grupo 2 mostró una reducción significativa de la actividad de esta enzima, alcanzando un valor superior de este ratio (**Figura 4.1**). Este hallazgo se relaciona con la cantidad de licopeno ingerida, y por tanto, con la acumulación del licopeno en el hígado. La actividad de HMGCoA-R en células animales ha demostrado ser sensible a la regulación negativa de la ruta del mevalonato tanto por productos con esteroides como sin ellos (Palozza *et al.*, 2012). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha profundizado en el estudio de la interacción del licopeno con la enzima HMGCoA-R mediante un estudio *in silico* (acoplamiento molecular o docking). Los resultados obtenidos sugieren que el licopeno podría inhibir la actividad de la enzima HMGCoA-R ya que puede interactuar con el centro activo de la enzima para formar un complejo similar al obtenido entre el sustrato y la enzima HMGCoA-R, impidiendo de este modo la formación de mevalonato y por tanto, reduciendo la síntesis de colesterol. Los cálculos obtenidos a partir del método de acoplamiento molecular o *docking* demuestran que el licopeno se fija firmemente al centro activo de la enzima HMGCoA-R, reflejando esta unión una mayor afinidad que con el sustrato o la estatina cerivastatina (Navarro-González *et al.*, 2014).

En el presente estudio se ha observado el mismo efecto inhibitorio tras la determinación *in vivo* de la actividad de la enzima HMGCoA-R, aportando además, nueva información, puesto que este efecto se relaciona con la cantidad de licopeno ingerido y su acumulación en el hígado. En los animales del grupo 1, que bebieron zumo BL, la acumulación del licopeno en hígado fue significativamente menor con respecto a la alcanzada en los animales del grupo 2, y también menor que en aquellos empleados en estudios previos (Navarro-González *et al.*, 2014). Aunque se observó una clara inhibición de la actividad enzimática, no se detectaron cambios en el contenido total de colesterol hepático (**Figura 4.2**), con valores medios entre 200 y 240 mg/100g, y tampoco en los niveles plasmáticos, como se menciona anteriormente. Las dos explicaciones posibles serían: 1) que en animales sanos la homeostasis de colesterol mantiene los niveles biológicos de colesterol dentro de los valores de referencia, y 2) podría ser necesario un periodo superior a 3 semanas para poder observar el efecto hipocolesterolémico del licopeno.

Además, en el metabolismo lipídico están implicadas numerosas rutas metabólicas y un gran número de genes, por lo que el efecto del licopeno sobre la regulación del metabolismo lipídico, así como de agente hipocolesterolemizante se asocia también con la expresión de diferentes genes clave mediante una cascada de mecanismos mediados por receptores nucleares como PPAR y LXR (Palozza *et al.*, 2011).

Para estudiar otro posible mecanismo del efecto hipocolesterolemizante del zumo de tomate, se evaluó indirectamente su efecto prebiótico mediante la determinación de AGCC en heces, poniendo especial atención al contenido de ácido propiónico, por su función como modulador del metabolismo lipídico. Tanto los AGCC individuales como los totales se analizaron en las muestras de heces recogidas al inicio y al final del periodo de intervención. Al inicio del estudio la cantidad total de AGCC fue de 49.2 mM para el grupo control, 35.9 mM para el grupo 1 y 51.7 mM para el grupo 2; mientras que la concentración a tiempo final fue de 80.6 mM para el grupo control, 76.8 mM para el grupo 1 y 100.6 mM para el grupo 2 (datos no mostrados). En todos los grupos experimentales se observó un incremento del total de AGCC a lo largo del estudio. Sin embargo, debido a la alta variabilidad individual de los datos, no se hallaron diferencias significativas durante el periodo experimental en la cantidad total de AGCC al comparar entre los tres grupos.

El contenido individual de los AGCC mayoritarios (ácidos acético, propiónico y butírico) determinados en heces tanto al inicio como al final del estudio se refleja en la **Figura 4.3** y el total de AGCC minoritarios se muestra en la **Figura 4.4**.

Respecto a los ácidos principales (**Figura 4.3**), no se hallaron diferencias significativas en la concentración de ácido acético y propiónico al comparar entre grupos, pero si se observaron para el ácido acético, cuando la comparación se realizó entre los valores iniciales y finales del mismo grupo. En el caso del ácido propiónico, estas diferencias entre valores iniciales y finales sólo se observaron en el grupo 1, probablemente debido a la variabilidad de los datos. Sin embargo, en el caso del ácido butírico se encontraron diferencias significativas entre grupos, observándose en el grupo 2 un contenido mayor que en el grupo control y, en el grupo 1 una concentración intermedia entre ambos. Además, se hallaron diferencias significativas entre los valores iniciales y finales dentro de los grupos 1 y 2, por lo que el consumo de los dos zumos de tomate supuso un incremento de ácido butírico al final del estudio. Para el resto de AGCC no se registraron cambios relevantes, incrementándose su contenido al final del periodo de intervención.

Aunque no se observaron diferencias en los niveles de acético y propiónico tras el consumo de zumo de tomate, si se hallaron niveles más elevados de butírico en estos grupos, siendo sólo significativas en el grupo 2. Contrariamente a lo que se esperaba, estas ratas consumieron un zumo de tomate con un contenido en fibra más bajo (0.8 g/100 mL, **Tabla 4.1**) pero con un contenido superior de licopeno, en comparación con el grupo 1, que tomó un zumo de tomate con un contenido superior en fibra (1.7 g/100 mL, **Tabla 4.1**) y menor en licopeno. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que los animales del grupo 2 bebieron más zumo de tomate (**Tabla 4.2**), y por lo tanto las cantidades ingeridas de FDT fueron similares en ambos grupos experimentales. Por otra parte, el zumo de tomate con alto contenido en licopeno consumido por el grupo 2, como se ha descrito anteriormente, fue elaborado a partir de concentrado de tomate y doble tratamiento térmico, a diferencia del zumo consumido por el grupo 1 que recibió una *flash* pasteurización, por lo que los carbohidratos fermentables de ambos zumos probablemente son diferentes, ya que el procesado térmico favorece la solubilización de la hemicelulosa y los componentes son más susceptibles de ser fermentados por la microbiota. Es importante resaltar que no se detectaron cambios en el contenido de ácido propiónico, ni relación alguna de este con la inhibición de la enzima HMGCoA-R, por lo que el efecto hipocolesterolémico podría ser asociado con la acumulación de licopeno en hígado en lugar de atribuirse al efecto prebiótico del zumo de tomate.

Los resultados obtenidos presentan algunas similitudes con los hallados por Schanäbele *et al.* (2008), en cuya investigación se obtuvieron unas concentraciones de acetato similares a las del presente estudio pero superiores en propionato y butirato, tras la administración diaria de 330 mL de zumo de tomate a humanos durante un periodo de 2 semanas, proporcionando un total de 37 mg diarios de licopeno. Sin embargo, en los datos obtenidos por Hwang *et al.* (2014) se observó una concentración mayor de propionato y menor de acetato y butirato en lo que respecta a la cantidad de AGCC procedentes del contenido cecal de ratas tras el consumo de diferentes dietas suplementadas con tomate cherry, en comparación con el grupo que no consumió tomate cherry en su dieta. A pesar de que estos autores no hallaron diferencias significativas en el contenido de AGCC de acuerdo a la suplementación de tomate, sí describen efectos beneficiosos para la salud intestinal asociados a la ingesta de tomate, tanto en humanos como en ratas.

En el presente estudio se observó un incremento de butirato proporcional a la cantidad de licopeno ingerido a través del zumo de tomate. En este sentido, es interesante resaltar la función del butirato, producto generado por las bacterias del colon tras la

fermentación anaeróbica de la fibra y polisacáridos no digestibles, como posible agente terapéutico en el cáncer e incluso, datos recientes sugieren interesantes efectos como agente antiinflamatorio e inmunomodulador (Qiao *et al.*, 2014; Hinnebusch *et al.*, 2002).

**Tabla 4.1.** Composición nutricional, compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de los zumos de tomate suministrados a los grupos 1 y 2, respectivamente<sup>1</sup>.

| Parámetros                       | Zumo de tomate BL | Zumo de tomate AL |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Proteínas (g/100 mL)             | 0.50 ± 0.13       | 0.80 ± 0.24       |
| Lípidos (g/100 mL)               | 1.05 ± 0.14       | 0.10 ± 0.01*      |
| Hidratos de Carbono (g/100 mL)   | 4.28 ± 0.31       | 5.02 ± 0.46       |
| Fibra Dietética Total (g/100 mL) | 1.71 ± 0.41       | 0.81 ± 0.16*      |
| Licopeno (mg/100 g)              | 2.73 ± 0.09       | 11.97 ± 0.64*     |
| Vitamina C (mg/100 g)            | 1.79 ± 0.32       | 2.27 ± 0.29       |
| Compuestos fenólicos (mg/kg)     | 239.20 ± 8.67     | 264.53 ± 9.55     |
| Flavonoides (mg/kg)              | 53.73 ± 2.33      | 49.27 ± 3.29      |
| TEAC (mmol/kg)                   | 3.35 ± 0.13       | 7.51 ± 0.72*      |

<sup>1</sup>Zumo de tomate BL: bajo contenido en licopeno; Zumo de tomate AL: b contenido en licopeno. Los datos se expresan como media ± SD. \*El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

**Tabla 4.2.** Ingesta de comida, bebida y licopeno, excreción de orina y heces, absorción aparente de licopeno y concentración de licopeno en los tres grupos experimentales. (Control: dieta estándar y agua; Grupo 1: dieta estándar y zumo de tomate BL y Grupo 2: dieta estándar y zumo de tomate AL).<sup>1</sup>

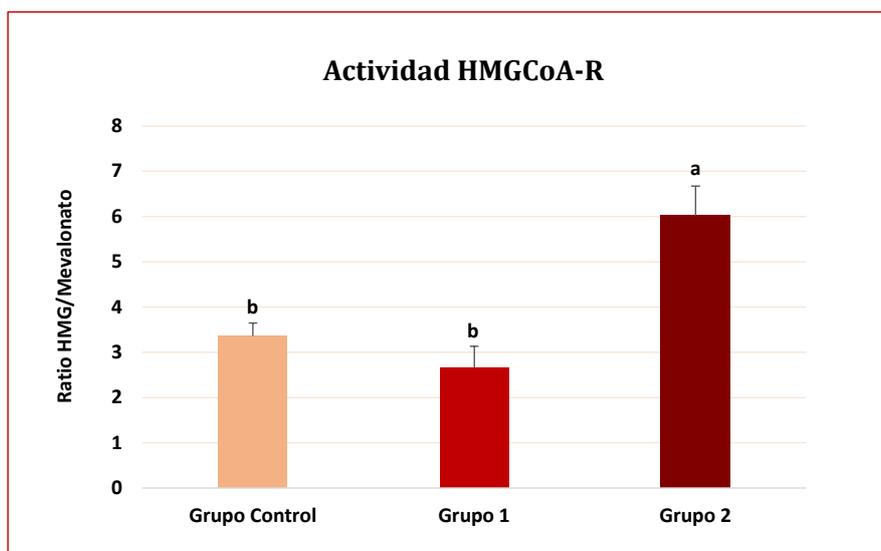
| Parámetros                                | Grupo Control             | Grupo 1                    | Grupo 2                   |
|---|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Ingesta de comida (g/día)                 | 22.20 ± 4.35 <sup>a</sup> | 18.17 ± 4.81 <sup>b</sup>  | 22.68 ± 5.15 <sup>a</sup> |
| Ingesta de agua o zumo de tomate (ml/día) | 20.44 ± 3.52 <sup>b</sup> | 17.93 ± 10.42 <sup>b</sup> | 30.07 ± 6.93 <sup>a</sup> |
| Heces excretadas (g/día)                  | 9.27 ± 1.41 <sup>a</sup>  | 7.00 ± 1.41 <sup>b</sup>   | 8.97 ± 1.13 <sup>a</sup>  |
| Orina excretada (mL/día)                  | 9.57 ± 2.47 <sup>b</sup>  | 6.06 ± 2.22 <sup>c</sup>   | 14.26 ± 4.40 <sup>a</sup> |
| Ingesta de licopeno (mg/día)              | -                         | 0.48 ± 0.28 <sup>b</sup>   | 3.59 ± 0.83 <sup>a</sup>  |
| Licopeno excretado en heces               | -                         | 0.04 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.26 ± 0.10 <sup>a</sup>  |
| Absorción aparente de licopeno final (%)  | -                         | 94.37                      | 93.59                     |
| <b>Licopeno en hígado (µg/g):</b>         |                           |                            |                           |
| Licopeno total                            | -                         | 0.84 ± 0.31 <sup>b</sup>   | 2.03 ± 0.39 <sup>a</sup>  |
| E- licopeno                               | -                         | 0.68 ± 0.32 <sup>b</sup>   | 1.17 ± 0.27 <sup>a</sup>  |
| Z-licopeno                                | -                         | 0.31 ± 0.10 <sup>b</sup>   | 0.66 ± 0.11 <sup>a</sup>  |
| Isómeros Z (%)                            | -                         | 38.09 ± 3.11 <sup>a</sup>  | 35.11 ± 2.51 <sup>a</sup> |

<sup>1</sup>Los datos se expresan como media ± SD. <sup>a-c</sup> Diferentes letras muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

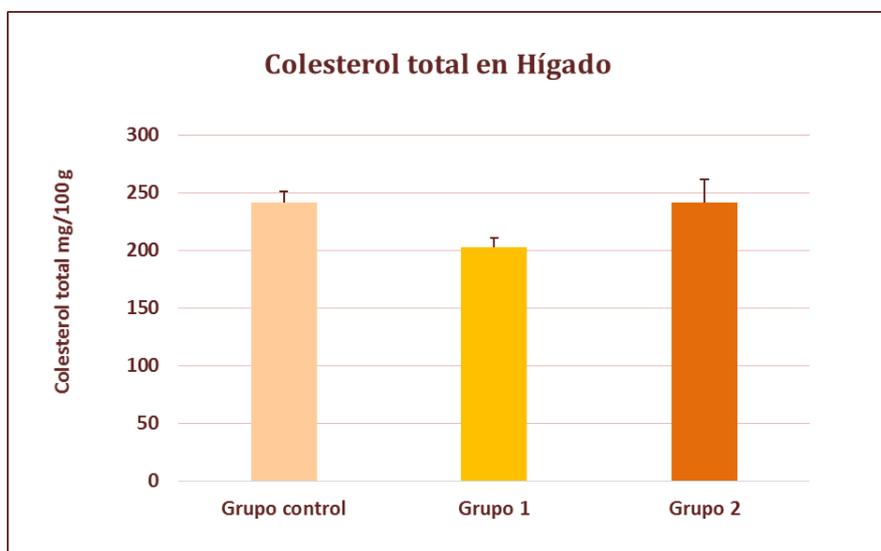
**Tabla 4.3.** Parámetros hematológicos y bioquímicos de las muestras de plasma obtenidas al inicio y final del periodo de intervención<sup>1</sup>.

| Parámetros                            | Valores<br>iniciales | Valores finales           |                           |                           |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                       |                      | Grupo Control             | Grupo 1                   | Grupo 2                   |
| Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> cel/μL) | 7.06 ± 0.45          | 5.98 ± 1.00               | 6.65 ± 0.67               | 6.16 ± 1.04               |
| Leucocitos (x10 <sup>3</sup> cel/μL)  | 4.85 ± 0.79          | 4.63 ± 1.62               | 3.68 ± 0.39               | 5.89 ± 1.51               |
| Linfocitos (x10 <sup>3</sup> cel/μL)  | 4.44 ± 0.71          | 3.87 ± 1.28               | 3.08 ± 0.40               | 4.52 ± 1.03               |
| Monocitos (x10 <sup>3</sup> cel/μL)   | 0.18 ± 0.03          | 0.11 ± 0.03               | 0.12 ± 0.01               | 0.18 ± 0.06               |
| Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> cel/μL) | 0.64 ± 0.05          | 0.29 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.33 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.54 ± 0.28 <sup>a</sup>  |
| Proteínas totales (g/dL)              | 5.74 ± 0.42          | 5.36 ± 0.29               | 5.25 ± 0.27               | 6.26 ± 2.01               |
| Colesterol Total (mg/dL)              | 91.62 ± 15.03        | 98.60 ± 9.57              | 104.66 ± 6.99             | 106.01 ± 5.62             |
| Colesterol HDL (mg/dL)                | 46.84 ± 10.66        | 41.35 ± 3.04 <sup>b</sup> | 49.18 ± 4.05 <sup>a</sup> | 47.41 ± 3.07 <sup>a</sup> |
| Colesterol LDL (mg/dL)                | 33.66 ± 7.74         | 44.92 ± 6.3 <sup>*</sup>  | 43.30 ± 6.35 <sup>*</sup> | 49.63 ± 8.52 <sup>*</sup> |
| Colesterol VLDL (mg/dL)               | 11.12 ± 2.00         | 12.32 ± 1.86              | 12.17 ± 3.16              | 10.24 ± 1.62              |
| Triglicéridos (mg/dL)                 | 51.75 ± 5.92         | 61.56 ± 9.31              | 60.87 ± 15.74             | 44.88 ± 12.19             |
| Índice Aterogénico                    | 2.03 ± 0.26          | 2.38 ± 0.12 <sup>a*</sup> | 2.13 ± 0.17 <sup>b</sup>  | 2.14 ± 0.16 <sup>b</sup>  |

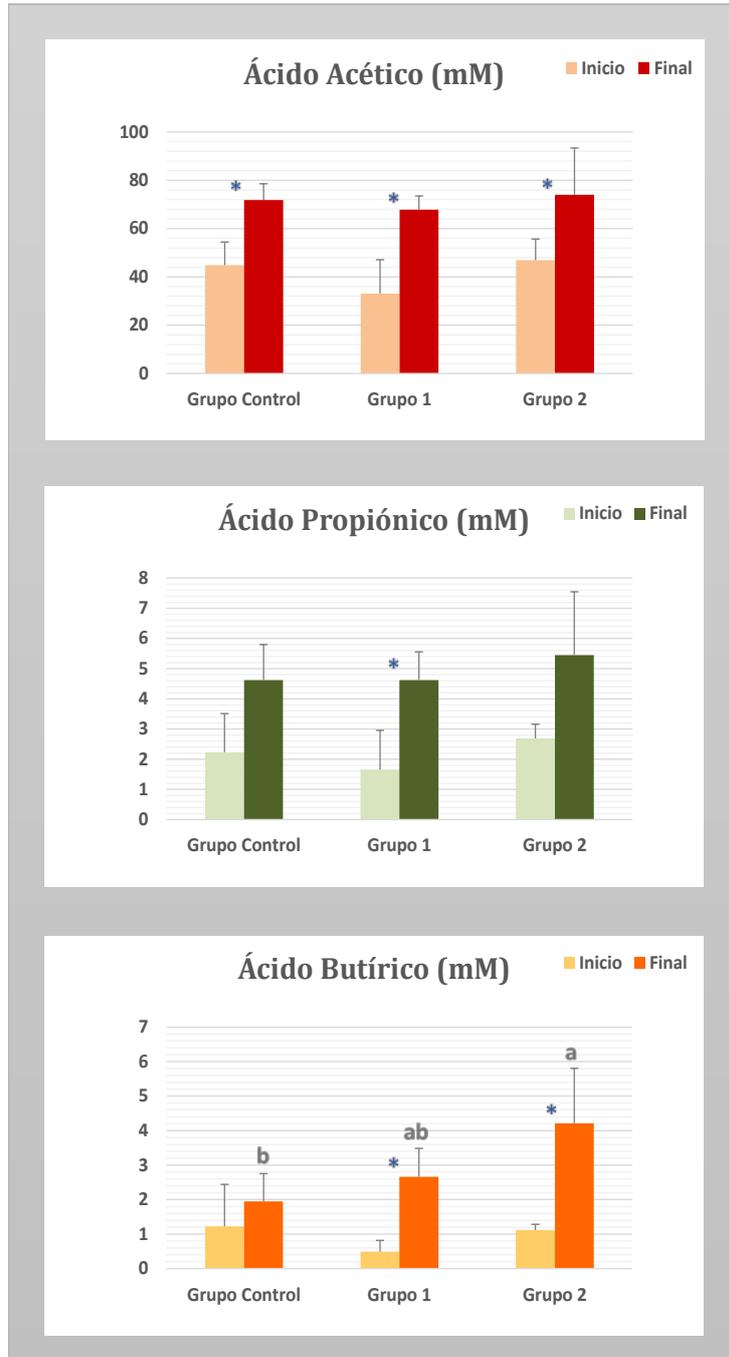
<sup>1</sup>Los datos se expresan como media ± SD. <sup>a-b</sup> Las diferentes letras dentro de la misma fila muestran diferencias significativas (p<0.05) entre el grupo control y los grupos experimentales 1 y 2. <sup>\*</sup> El asterisco situado en la misma fila indica diferencias significativas (p<0.05) en los parámetros analizados entre los valores iniciales y finales.



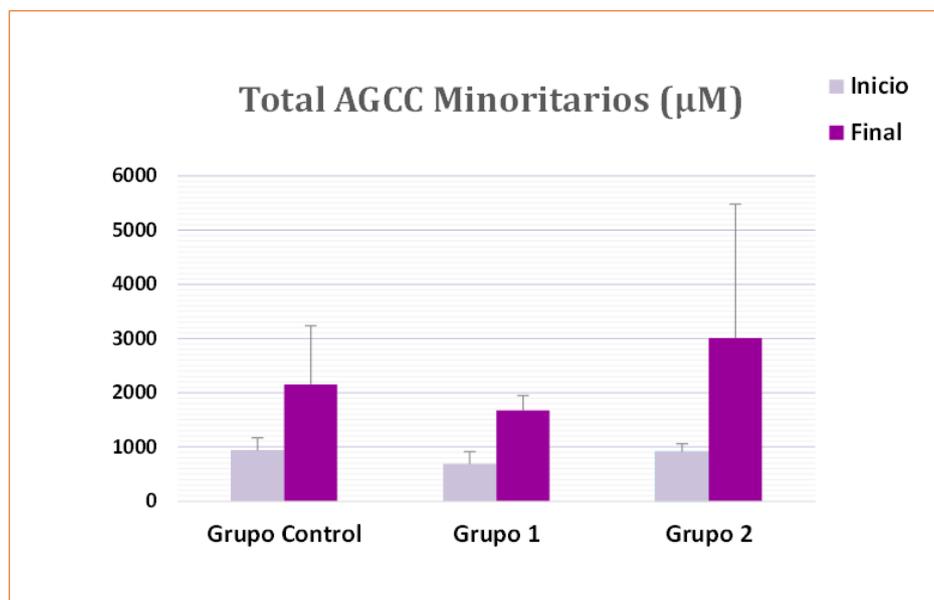
**Figura 4.1.** Actividad de la enzima HMGCoA-R determinada en las muestras de hígado de las ratas pertenecientes a los grupos Control, 1 y 2. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD.



**Figura 4.2.** Niveles de colesterol hepático (mg/100g) de las ratas pertenecientes a los grupos Control, 1 y 2. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD.



**Figura 4.3.** Concentración (mM) de los AGCC mayoritarios presentes en las muestras de heces de los grupos Control, 1 y 2. Los datos están expresados como media  $\pm$  SD. Las diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores iniciales y finales entre los tres grupos. El asterisco (\*) refleja diferencias significativas entre los valores inicio y final dentro del mismo grupo.



**Figura 4.4.** Concentración ( $\mu\text{M}$ ) del total de AGCC minoritarios analizados en las heces de los grupos Control, 1 y 2. Los datos están expresados como media  $\pm$  SD

## 4.2 ESTUDIO CON ANIMALES ALIMENTADOS CON UNA DIETA CON ALTO CONTENIDO EN GRASA (ESTUDIO 2)

### 4.2.1. Datos dietéticos, bioquímicos e histológicos

La **Tabla 4.4** recoge los valores iniciales y finales del peso corporal, su incremento, así como la ingesta de comida y bebida, la cantidad de heces y de orina excretadas, y la ingesta y absorción de licopeno. Al comienzo del periodo de intervención no se observaron diferencias significativas entre grupos en el valor medio de peso corporal ya que los pesos oscilaron en los cuatro grupos entre 318 y 350 gr. Por el contrario, sí que se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el peso final, ya que en los grupos HA y HL se produjo un incremento de peso medio mayor que en los grupos alimentados con la dieta estándar o de mantenimiento (149 vs. 97 g).

A pesar de que todos los animales se alimentaron *ad libitum*, se observaron diferencias significativas entre grupos respecto a la ingesta de comida. Los grupos NA y NL mostraron una ingesta mayor que los grupos HA y HL, debido a las diferencias existentes en el aporte energético y contenido en grasa de ambas dietas. Además, los animales que ingirieron zumo de tomate mostraron una ingesta de pienso ligeramente más baja con respecto a los grupos controles, aunque estas diferencias no fueron significativas. Asociada a la menor ingesta, se observaron diferencias significativas en la cantidad excretada de heces, siendo significativamente inferior en los grupos con la dieta alta en grasa e hipercalórica con respecto a los dos grupos con la dieta normal. En lo que respecta a la ingesta de bebida (agua o zumo de tomate), todos los animales ingirieron una cantidad similar (alrededor de 30 mL/día). Únicamente en el grupo NL la ingesta de zumo fue mayor en comparación con la ingesta de agua en el grupo NA, lo que demuestra que el zumo fue aceptado sin problema por los animales. En cuanto a las cantidades medias de orina excretada al día, aunque en el grupo NL se observaron unas cantidades ligeramente mayores, estas diferencias no fueron significativas al comparar los cuatro grupos en el análisis de varianza.

Modelos similares con dietas hipercalóricas han sido utilizados por otros autores para provocar la obesidad y una esteatosis asociada en ratas y ratones, con el objetivo de evaluar el efecto del consumo de antioxidantes y otros compuestos dietéticos en el metabolismo hepático y marcadores de estrés oxidativo y de inflamación (Qiu *et al.*, 2015; Bahcecioglu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2009). Las ratas de los grupos H se podrían

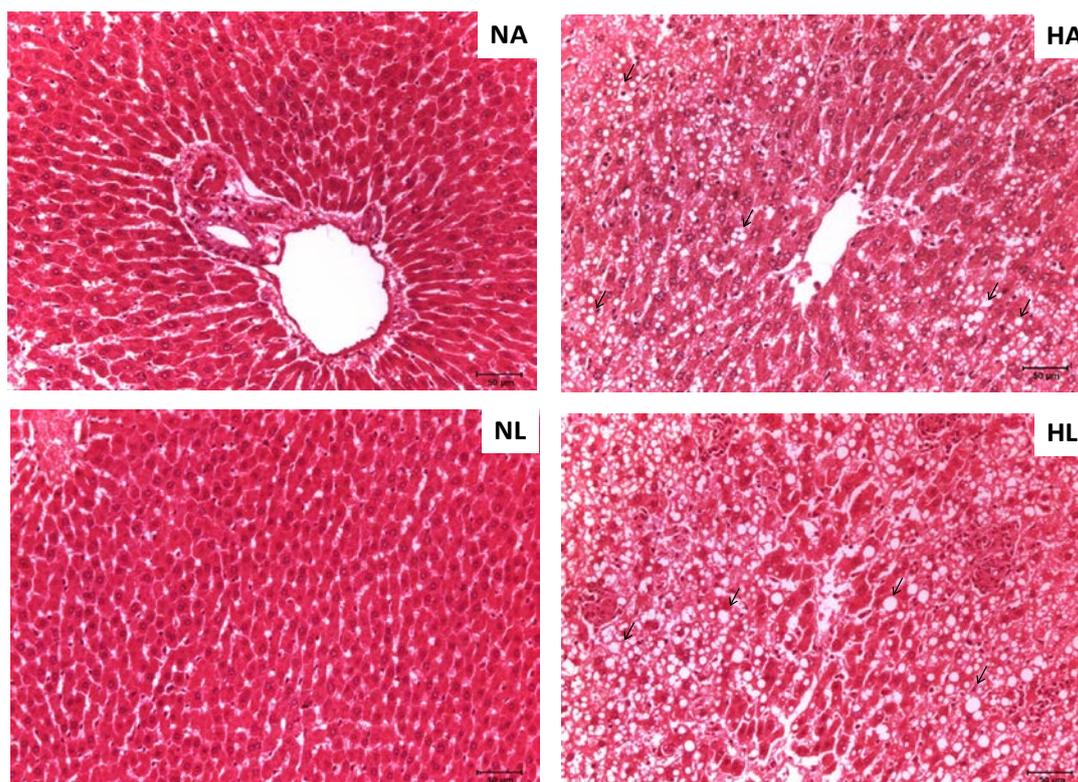
considerar obesas al incrementar su peso casi un 30% en comparación con las alimentadas con la dieta de mantenimiento, hecho que se traduce en un mayor índice de masa corporal. La obesidad incrementa la prevalencia de la esteatosis no alcohólica y en la presente Tesis Doctoral hemos observado que tras las 7 semanas de ingesta de la dieta alta en grasa y colesterol, los animales de los grupos HA y HL muestran esteatosis con una degeneración vacuolar tipo 2 mayoritariamente (**Figura 4.5**), que se acompaña de una disfunción hepática al aumentar las enzimas hepáticas y los parámetros bioquímicos del metabolismo lipídico, tal y como se muestra en la **Tabla 4.5**.

**Tabla 4.4.** Valores medios de la ingesta de comida y bebida, excreción de heces y orina e ingesta y absorción aparente de licopeno obtenidos durante el periodo de intervención (5 semanas).

| Parámetros                                       | NA                          | NL                          | HA                          | HL                           |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <b>Peso corporal Inicial (g)</b>                 | 350.33 ± 5.93               | 318.00 ± 18.83              | 350.00 ± 13.68              | 326.17 ± 9.78                |
| <b>Peso corporal Final (g)</b>                   | 423.75 ± 6.93 <sup>bc</sup> | 415.17 ± 18.23 <sup>c</sup> | 479.50 ± 9.49 <sup>a</sup>  | 474.83 ± 15.61 <sup>ab</sup> |
| <b>Δ peso corporal (g)</b>                       | 73.42 ± 7.49 <sup>c</sup>   | 97.17 ± 3.10 <sup>bc</sup>  | 129.50 ± 8.33 <sup>ab</sup> | 148.67 ± 7.69 <sup>a</sup>   |
| <b>Ingesta de comida (g/día)</b>                 | 21.00 ± 0.82 <sup>a</sup>   | 20.00 ± 0.4 <sup>ab</sup>   | 18.00 ± 0.26 <sup>bc</sup>  | 16.00 ± 0.52 <sup>c</sup>    |
| <b>Ingesta de agua o zumo de tomate (mL/día)</b> | 29.00 ± 2.40                | 37.00 ± 2.10                | 31.00 ± 3.50                | 34.00 ± 2.90                 |
| <b>Heces excretadas (g/día)</b>                  | 8.60 ± 0.40 <sup>a</sup>    | 8.50 ± 0.15 <sup>a</sup>    | 2.80 ± 0.16 <sup>b</sup>    | 3.30 ± 0.35 <sup>b</sup>     |
| <b>Orina excretada (mL/día)</b>                  | 10.00 ± 1.50                | 13.00 ± 1.00                | 10.00 ± 2.50                | 8.40 ± 1.30                  |

<sup>1</sup>Los valores se expresan como media ± SEM (n=6 por grupo). Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05).

Según los datos obtenidos en el análisis histopatológico y el contenido de grasa total de las muestras de hígado (**Figura 4.5**), los animales de los grupos HA y HL alcanzaron un grado de esteatosis de 2 o 3 (Brunt *et al.*, 1999; Hijona *et al.*, 2010; Miette *et al.*, 2011), caracterizada por inflamación de los hepatocitos y acumulación de grasa, sin mostrar diferencias significativas relacionadas con la ingesta de zumo de tomate. El grado de esteatosis se confirmó por la alteración de las enzimas hepáticas ALT y AST (Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010), ya que se observó un incremento al final del periodo de intervención en los animales alimentados con dieta rica en grasa y colesterol (**Tabla 4.5**).



**Figura 4.5.** Corte histológico en hígado con tinción hematoxilina-eosina (20x) en los cuatro grupos experimentales. NA (dieta estándar y agua); HA (dieta aterogénica y agua); NL (dieta estándar y zumo de tomate); HL (dieta aterogénica y zumo de tomate). (→) Representa la presencia de hepatocitos grasos.

#### 4.2.2. Parámetros relacionados con el metabolismo lipídico

Los parámetros bioquímicos plasmáticos se muestran en la **Tabla 4.5**. Respecto a los parámetros bioquímicos plasmáticos, la concentración de proteínas fue significativamente mayor en los grupos H que en los grupos N; este hecho podría ser debido a las ligeras diferencias en el contenido proteico de la dieta. A pesar de que los valores plasmáticos iniciales y finales de glucosa no fueron significativamente diferentes entre los cuatro grupos, y por lo tanto no se vieron afectados ni por la dieta ni por la bebida, los valores finales mostraron un incremento significativo en todos los grupos con respecto al valor inicial, lo que podría asociarse al estrés provocado por el uso de las jaulas metabólicas. Este valor fue mayor en los grupos H que en los grupos N, lo que podría estar relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina asociada a la misma (Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010). Sin embargo, en este estudio no hemos analizado los valores de insulina, por lo que no se pueden extraer conclusiones sobre las diferencias observadas en este parámetro.

Los grupos de ratas con esteatosis inducida (HA y HL) mostraron dislipemia con alteración de los lípidos y lipoproteínas en sangre. La dieta con alto contenido en grasa originó cambios en el perfil de lípidos plasmáticos durante las dos semanas del periodo de adaptación, produciendo un incremento significativo en la concentración de colesterol total y LDL-colesterol, y reduciendo los niveles de HDL-colesterol, mientras que las concentraciones de VLDL-colesterol y triglicéridos se mantuvieron sin cambios entre los cuatro grupos experimentales. Aunque durante estas dos semanas se observó una modificación en el perfil lipídico, no se produjeron cambios en la función hepática, ya que las actividades iniciales de las enzimas AST y ALT no mostraron diferencias significativas. Por tanto, es necesario un periodo de tiempo más prolongado de ingesta para producir la acumulación de grasa en los hepatocitos, originando una esteatohepatitis, y la consecuente alteración de la actividad de las aminotransferasas, observando diferencias significativas entre grupos, tal y como se ha descrito anteriormente (Sharma *et al.*, 2012).

La esteatosis o enfermedad de hígado graso lleva asociada una elevación de las transaminasas, que usualmente puede llegar a superar hasta 4 veces el límite normal y constituye uno de los primeros signos clínicos para el diagnóstico de la enfermedad (Hui-Hui y Jason Pik-Eu, 2010; Miette *et al.*, 2011). Tras las siete semanas de ingesta de la dieta alta en grasa, las ratas con esteatosis inducida (HA y HL) duplicaron los valores de actividad iniciales de ALT y AST y los observados al final de la intervención en las ratas alimentadas con la dieta de mantenimiento. Sin embargo, es necesario remarcar que debido a la gran variabilidad encontrada en los valores de referencia de estas enzimas en ratas Sprague-Dawley, los niveles de actividad enzimática se incluyen dentro del rango considerado de referencia (León Goñi *et al.*, 2011) (**Tabla 4.5**). No obstante, el estudio histopatológico puso de manifiesto la evidencia de la esteatosis, que se corrobora con la acumulación de grasa en las muestras de hígado.

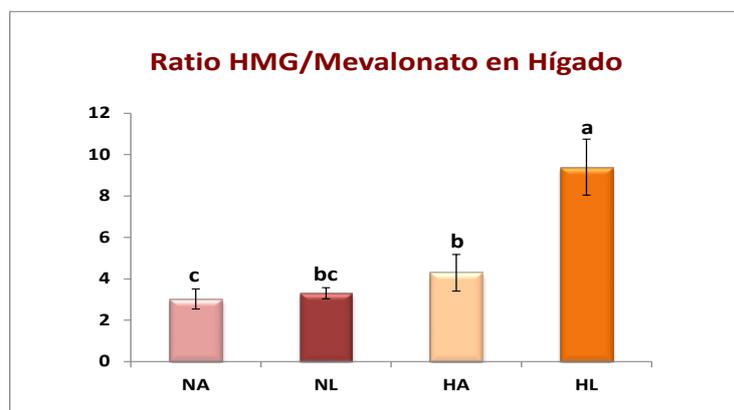
Transcurridas las cinco semanas de intervención se observaron cambios significativos en los lípidos plasmáticos, disminuyendo de forma significativa el colesterol total y su fracción LDL en los grupos HA y HL, aumentando significativamente el colesterol HDL en el grupo HL y aumentando, también de forma significativa, la concentración de triglicéridos en el grupo HA. Estos cambios estarían relacionados con las alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas que se producen como consecuencia de la esteatosis. El hígado no es un órgano de almacenamiento de grasa, y sintetiza lipoproteínas para secretar el colesterol a la circulación periférica. Cuando hay un daño hepático el colesterol se almacena y no es enviado al resto del organismo, debido a la dificultad para sintetizar las apoproteínas necesarias para la

formación y recepción de las lipoproteínas, entre otras funciones (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010). Por esta razón, durante las dos primeras semanas, tras la ingesta de la dieta alta en grasa, se incrementan los valores de colesterol plasmático, disminuyendo hacia el final del periodo de intervención debido a la acumulación de colesterol en el hígado y a la deficiencia funcional de sintetizar lipoproteínas que tiene este órgano. Además, estos cambios metabólicos se asocian con un incremento en los niveles de colesterol VLDL, responsable de transportar los triglicéridos desde el hígado hasta los tejidos periféricos, principalmente músculo y tejido adiposo (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010; Fon Tacer y Rozman, 2011). En individuos obesos con esteatosis, la secreción de partículas VLDL incrementa linealmente con el aumento de triglicéridos hepáticos debido a un incremento de la lipólisis de la grasa intrahepática e intra-abdominal. En nuestros animales con esteatosis inducida se observó una respuesta similar, que se puso de manifiesto por el incremento de partículas VLDL, aumento de triglicéridos y partículas LDL a nivel plasmático, junto con el aumento de la grasa total hallada en hígado, en comparación con los grupos alimentados con dieta estándar (Fon Tacer y Rozman, 2011; Fujita *et al.*, 2009).

En relación al perfil lipídico (**Tabla 4.5**), como cabía esperar, se observaron diferencias significativas en los niveles de colesterol total, colesterol LDL e índice aterogénico debido al consumo de la dieta alta en grasa y colesterol (comparación grupos N y H) tanto en los valores iniciales como en los finales. Sin embargo, en lo que respecta a las concentraciones de colesterol VLDL y triglicéridos sólo se hallaron diferencias significativas en el grupo HA, ya que el grupo HL presentaba unos niveles intermedios entre los grupos N y el grupo HA. En lo que respecta a los cambios observados en los valores iniciales y finales de cada grupo, apenas se produjeron variaciones en los grupos NA y NL, aunque es interesante destacar la reducción significativa hallada en las concentraciones de colesterol total en el grupo NL, que podría estar asociada al consumo de zumo de tomate. Por el contrario, en los grupos HA y HL se observó una reducción significativa de los niveles de colesterol total y su fracción LDL, aunque con unos valores aún muy superiores a los fisiológicos, con respecto a sus valores iniciales, probablemente por los propios mecanismos de regulación del organismo, lo que supuso a su vez una disminución del índice aterogénico. En relación al efecto que puede tener la ingesta de zumo de tomate sobre estos parámetros, únicamente en el grupo HL se observó un valor superior de HDL-colesterol con respecto a su valor inicial y cómo se ha mencionado anteriormente, presentó unos niveles de triglicéridos y colesterol VLDL dentro de unos valores intermedios entre los grupos con dieta estándar y el grupo con dieta alta en grasa y colesterol que no ingirió zumo de tomate; sin observar ningún efecto en los animales alimentados con la

dieta estándar y zumo de tomate (NL). Por ello, el consumo de licopeno procedente del zumo de tomate podría suponer una mejora del perfil lipídico cuando se produce una alteración del metabolismo lipídico por el consumo de una dieta aterogénica, es decir, alta en grasa y colesterol, como se ha demostrado previamente en otros estudios (Bahcecioglu *et al.*, 2010; Palozza *et al.*, 2012).

Al igual que en el estudio 1, la actividad de la enzima HMGCoA-R se determinó en los hígados de las ratas de los cuatro grupos experimentales del estudio 2, observándose diferencias significativas entre los grupos H, siendo el ratio HMG/mevalonato bastante superior en el grupo HL con respecto al grupo HA (**Figura 4.6**). Esto podría deberse a la inhibición de la enzima por la presencia del licopeno acumulado en los hígados de las ratas que consumieron zumo de tomate junto con la dieta alta en grasa y colesterol, puesto que cómo demostraron los resultados de Navarro-González *et al.* (2014), el licopeno posee una gran afinidad por el centro activo de esta enzima y competiría con su sustrato (HMG). Sin embargo, no se observaron unos niveles plasmáticos de colesterol total inferiores en el grupo HL en comparación con el grupo HA (**Tabla 4.5**). Una posible explicación de los resultados hallados sería que a) los animales de ambos grupos consiguen disminuir los niveles de colesterol con respecto a los valores alcanzados inicialmente por la propia homeostasis del organismo, b) es necesario un tiempo superior para observar los efectos del licopeno sobre los niveles plasmáticos de colesterol, c) se requiere una concentración mayor de licopeno para observar un efecto claro sobre los niveles de colesterol plasmático.



**Figura 4.6.** Valores medios del ratio HMG/Mevalonato determinados en las muestras de hígado de los cuatro grupos experimentales (NA, NL, HA y HL). Las diferentes letras (a-c) muestran diferencias significativas entre los cuatro grupos tras realizar un ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ )

**Tabla 4.5.** Parámetros bioquímicos y enzimas hepáticas analizados en las muestra de plasma de los cuatro grupos experimentales al inicio y al final del periodo de intervención.<sup>1</sup>

| Parámetros                       | NA                       | NL                       | HA                         | HL                         |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glucosa Inicial (mg/dl)          | 94.0 ± 2.4               | 94.0 ± 2.4               | 101.0 ± 6.0                | 101.0 ± 6.0                |
| Glucosa Final (mg/dl)            | 181.0 ± 19.0*            | 188.0 ± 9.0*             | 223.0 ± 35.0*              | 212.0 ± 30.0*              |
| Proteínas Iniciales (g/dl)       | 5.9 ± 0.1 <sup>b</sup>   | 5.9 ± 0.1 <sup>b</sup>   | 6.6 ± 0.2 <sup>a</sup>     | 6.6 ± 0.2 <sup>a</sup>     |
| Proteínas Finales (g/dl)         | 5.7 ± 0.3 <sup>b</sup>   | 5.5 ± 0.3 <sup>b</sup>   | 6.6 ± 0.1 <sup>a</sup>     | 6.7 ± 0.1 <sup>a</sup>     |
| Colesterol Total Inicial (mg/dl) | 105.0 ± 3.3 <sup>b</sup> | 105.0 ± 3.3 <sup>b</sup> | 309.0 ± 41.0 <sup>a</sup>  | 309.0 ± 41.0 <sup>a</sup>  |
| Colesterol Total Final (mg/dl)   | 99.0 ± 4.1 <sup>b</sup>  | 81.0 ± 6.5 <sup>b*</sup> | 167.0 ± 14.0 <sup>a*</sup> | 162.0 ± 14.0 <sup>a*</sup> |
| LDL Inicial (mg/dl)              | 22.0 ± 1.4 <sup>b</sup>  | 22.0 ± 1.4 <sup>b</sup>  | 216.0 ± 39.0 <sup>a</sup>  | 216.0 ± 39.0 <sup>a</sup>  |
| LDL Final (mg/dl)                | 26.0 ± 1.4 <sup>b</sup>  | 17.0 ± 2.4 <sup>b</sup>  | 94.0 ± 11.0 <sup>a*</sup>  | 96.0 ± 8.2 <sup>a*</sup>   |
| HDL Inicial (mg/dl)              | 53.0 ± 1.5 <sup>a</sup>  | 53.0 ± 1.5 <sup>a</sup>  | 31.0 ± 5.4 <sup>b</sup>    | 31.0 ± 5.4 <sup>b</sup>    |
| HDL Final (mg/dl)                | 54.0 ± 2.3 <sup>a</sup>  | 44.0 ± 3.5 <sup>ab</sup> | 40.0 ± 2.1 <sup>b</sup>    | 49.0 ± 2.7 <sup>ab*</sup>  |
| VLDL Final (mg/dl)               | 19.0 ± 0.9               | 19.0 ± 0.9               | 18.0 ± 1.8                 | 18.0 ± 1.8                 |
| VLDL Final (mg/dl)               | 16.0 ± 0.9 <sup>b*</sup> | 16.0 ± 1.7 <sup>b*</sup> | 24.0 ± 1.4 <sup>a</sup>    | 20.0 ± 2.8 <sup>ab</sup>   |
| Índice Aterogénico Inicial       | 0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>   | 0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>   | 5.7 ± 1.5 <sup>a</sup>     | 5.7 ± 1.5 <sup>a</sup>     |
| Índice Aterogénico Final         | 0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>   | 0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>   | 2.2 ± 0.2 <sup>a*</sup>    | 2.1 ± 0.1 <sup>a*</sup>    |
| Triglicéridos Iniciales (mg/dl)  | 96.0 ± 4.4               | 96.0 ± 4.4               | 89.0 ± 9.1                 | 89.0 ± 9.1                 |
| Triglicéridos Finales (mg/dl)    | 80.0 ± 4.6 <sup>b*</sup> | 78.0 ± 8.3 <sup>b</sup>  | 121.0 ± 7.1 <sup>a*</sup>  | 98.0 ± 14.0 <sup>ab</sup>  |
| ALT Inicial (U/L)                | 43.0 ± 3.6               | 43.0 ± 3.6               | 42.0 ± 3.7                 | 42.0 ± 3.7                 |
| ALT Final (U/L)                  | 32.0 ± 1.9 <sup>b*</sup> | 41.0 ± 2.9 <sup>b</sup>  | 79.0 ± 11.0 <sup>a*</sup>  | 79.0 ± 12.0 <sup>a*</sup>  |
| AST Inicial (U/L)                | 88.0 ± 9.4               | 88.0 ± 9.4               | 106.0 ± 5.1                | 106.0 ± 5.1                |
| AST Final (U/L)                  | 68.0 ± 7.1 <sup>b</sup>  | 67.0 ± 4.9 <sup>b</sup>  | 150.0 ± 7.6 <sup>a*</sup>  | 143.0 ± 20.0 <sup>a</sup>  |

<sup>1</sup>Los valores están expresados como media ± SEM (n=6 por grupo). La diferentes letras representan diferencias significativas entre los cuatro grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05). \*Muestra diferencias significativas después de realizar una prueba t para muestras dependientes entre los valores iniciales y finales de cada parámetro dentro de cada grupo.

**Tabla 4.6.** Contenido total de grasa y concentración de ácidos grasos de las muestras de hígado de los cuatro grupos experimentales analizados al final del periodo de intervención<sup>1</sup>

| Ácidos grasos (mg/g) | NA                         | NL                        | HA                         | HL                          |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Grasa Total          | 32.55 ± 2.20 <sup>b</sup>  | 34.80 ± 1.60 <sup>b</sup> | 197.00 ± 8.00 <sup>a</sup> | 193.00 ± 11.00 <sup>a</sup> |
| C12:0                | nd                         | nd                        | 0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.14 ± 0.01 <sup>a</sup>    |
| C14:0                | 0.14 ± 0.03 <sup>b</sup>   | 0.16 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 4.04 ± 0.24 <sup>a</sup>   | 3.83 ± 0.29 <sup>a</sup>    |
| C16:0                | 5.85 ± 0.45 <sup>b</sup>   | 6.31 ± 0.34 <sup>b</sup>  | 36.1 ± 1.60 <sup>a</sup>   | 35.6 ± 1.90 <sup>a</sup>    |
| C18:0                | 1.96 ± 0.15 <sup>b</sup>   | 2.31 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 3.77 ± 0.07 <sup>a</sup>   | 3.79 ± 0.26 <sup>a</sup>    |
| C23:0                | 0.05 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>  | nd                         | nd                          |
| C16:1                | 0.69 ± 0.14 <sup>b</sup>   | 0.79 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 11.50 ± 0.90 <sup>a</sup>  | 9.48 ± 1.92 <sup>a</sup>    |
| C18:1 n-9            | 4.22 ± 0.47 <sup>b</sup>   | 4.92 ± 0.22 <sup>b</sup>  | 65.30 ± 2.50 <sup>a</sup>  | 65.60 ± 3.80 <sup>a</sup>   |
| C18:1 n-7            | 0.63 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 0.63 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 8.21 ± 0.64 <sup>a</sup>   | 8.03 ± 0.39 <sup>a</sup>    |
| C18:2t n-6           | nd                         | nd                        | 1.12 ± 0.09 <sup>a</sup>   | 1.05 ± 0.10 <sup>a</sup>    |
| C18:2c n-6           | 6.52 ± 0.52 <sup>a</sup>   | 6.57 ± 0.34 <sup>a</sup>  | 7.13 ± 0.45 <sup>a</sup>   | 7.02 ± 0.62 <sup>a</sup>    |
| C18:3 n-6 γ          | 0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.11 ± 0.01 <sup>ab</sup> | 0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.07 ± 0.03 <sup>b</sup>    |
| C18:3 n-3 α          | 0.19 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.19 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.35 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.35 ± 0.07 <sup>a</sup>    |
| C20:2 n-6            | nd                         | nd                        | 0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>    |
| C20:3 n-6            | 0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 0.05 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.35 ± 0.04 <sup>a</sup>    |
| C20:4 n-6            | 2.83 ± 0.07 <sup>a</sup>   | 2.93 ± 0.12 <sup>a</sup>  | 1.85 ± 0.10 <sup>b</sup>   | 1.79 ± 0.11 <sup>b</sup>    |
| C20:5 n-3            | 0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>  | nd                         | nd                          |
| C22:5 n-3            | 0.17 ± 0.00 <sup>b</sup>   | 0.15 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.23 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.22 ± 0.02 <sup>a</sup>    |
| C22:6 n-3            | 0.45 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.47 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.41 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>    |
| AGS                  | 8.10 ± 0.57 <sup>b</sup>   | 8.90 ± 0.44 <sup>b</sup>  | 45.50 ± 1.80 <sup>a</sup>  | 44.80 ± 2.20 <sup>a</sup>   |
| AGM                  | 5.57 ± 0.68 <sup>b</sup>   | 6.33 ± 0.35 <sup>b</sup>  | 87.20 ± 3.80 <sup>a</sup>  | 85.30 ± 5.30 <sup>a</sup>   |
| AGP                  | 10.50 ± 0.60 <sup>b</sup>  | 10.60 ± 0.50 <sup>b</sup> | 13.40 ± 0.50 <sup>a</sup>  | 13.10 ± 0.90 <sup>ab</sup>  |
| Ratio AGS/AGT (%)    | 33.50 ± 1.00 <sup>ab</sup> | 34.50 ± 0.20 <sup>a</sup> | 31.10 ± 0.20 <sup>c</sup>  | 31.40 ± 0.60 <sup>bc</sup>  |
| Ratio AGM/AGS (%)    | 22.80 ± 1.20 <sup>b</sup>  | 24.60 ± 0.80 <sup>b</sup> | 59.70 ± 0.30 <sup>a</sup>  | 59.50 ± 0.60 <sup>a</sup>   |
| Ratio AGP/AGT (%)    | 43.70 ± 1.70 <sup>b</sup>  | 40.90 ± 1.00 <sup>b</sup> | 9.20 ± 0.24 <sup>a</sup>   | 9.10 ± 0.29 <sup>a</sup>    |
| Ratio n-6/n-3 (%)    | 10.70 ± 0.00 <sup>b</sup>  | 11.10 ± 0.20 <sup>b</sup> | 4.00 ± 0.09 <sup>a</sup>   | 4.05 ± 0.12 <sup>a</sup>    |

<sup>1</sup>Los valores se expresan como media ± SEM (n=6 por grupo). <sup>a-c</sup> Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos después de realizar un ANOVA de una vía y aplicar los test Tukey y Games Howell de separación de medias (p<0.05). Abreviaturas: AGT, ácidos grasos totales; AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados; AGP, ácidos grasos poliinsaturados. nd: no detectado.

Entre los marcadores del metabolismo lipídico se analizó el contenido total de grasa en el hígado y la concentración de ácidos grasos, que se muestran en la **Tabla 4.6**. La concentración total de grasa en el hígado corrobora su acumulación en los hepatocitos, lo que demuestra la presencia de esteatosis (Hijona *et al.*, 2010). Los animales con la dieta de mantenimiento mostraron un valor medio inferior a 35 mg/g, mientras que en las ratas de los grupos H la grasa hepática llegó casi a los 200 mg/g. Por lo tanto, se observaron diferencias significativas en la cantidad de grasa total en el hígado en función de la dieta, aunque no asociado al consumo de zumo de tomate. Este mismo comportamiento se observó para las concentraciones individuales de ácidos grasos totales, AGS, AGM y AGP, observando diferencias significativas entre los grupos N y H. Para los AGS, en general se cuantificaron concentraciones superiores en los grupos HA y HL, excepto para el ácido graso tricosílico (C23:0). En cuanto a los AGM y AGP de cadena media también se observó una mayor concentración en los grupos H, aunque es interesante destacar la presencia de un menor contenido de C: 18:3n-6 $\gamma$  en el grupo HL en comparación con el grupo HA. Por el contrario, los AGP de cadena larga se encontraron en menor proporción en el hígado de los animales con esteatosis, hecho que estaría relacionado con la baja concentración de este tipo de ácidos grasos en la dieta.

La esteatosis hepática se desarrolla cuando hay un desequilibrio en el metabolismo lipídico y, la incorporación de ácidos grasos y la síntesis de *novo* excede a la oxidación y secreción de los ácidos grasos. Las fuentes de ácidos grasos para el hígado son: a) los triglicéridos dietéticos transportados en el quilomicrón, b) la síntesis de grasa a partir de la lipogénesis en el hígado, c) los ácidos grasos que llegan al hígado tras lipólisis del tejido adiposo, d) la disminución de la exportación de lípidos desde el hígado a otros tejidos, y e) reducción en la oxidación de los ácidos grasos. Cuando se produce un desequilibrio en estos pasos del metabolismo lipídico se origina la acumulación de triglicéridos en el citoplasma del hepatocito (Musso *et al.*, 2009), originando una situación de estrés crónico que está involucrado en la patogénesis de la esteatosis (Lieber *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008).

### 4.2.3. Biodisponibilidad de licopeno

La cantidad de licopeno ingerida y excretada, y la acumulada en el hígado se muestran en la **Tabla 4.7**. El consumo diario de licopeno, calculado a partir del contenido de licopeno y de la ingesta media de zumo de tomate al día en los grupos HL y NL fue de 3.2 y 3.5 mg/día, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre los animales alimentados con diferente dieta. Sin embargo, la absorción aparente de licopeno fue significativamente mayor en el grupo HL que en el grupo NL (63% vs 44%), ya que tal y como se recoge en la bibliografía científica la grasa favorece la incorporación del licopeno en la micela, facilitando de este modo su proceso de absorción en el intestino (Fernández-García *et al.*, 2012; Kopsell y Kopsell, 2006; During y Harrison, 2006). Estos valores de absorción aparente se correlacionan con la cantidad total de licopeno y (*E*)-licopeno acumulado en el hígado, observándose un valor casi dos veces superior de licopeno hepático en el grupo HL que en el grupo NL (6.00 *versus* 2.90 µg/g), aunque no se encontraron diferencias respecto al contenido de los isómeros (*Z*)-licopeno entre ambos grupos. En relación a los metabolitos 6-, 8- y 12-apo-licopenal se detectaron únicamente el 6 y el 8-apolicopenal en las muestras de hígado del grupo HL, y en una concentración muy baja (**Tabla 4.7**).

**Tabla 4.7.** Ingesta media de licopeno, licopeno excretado en heces, absorción aparente y concentración de licopeno, de sus isómeros y metabolitos en las muestras de hígado analizadas en los cuatro grupos experimentales al finalizar el periodo de intervención de cinco semanas.<sup>1</sup>

| <b>Licopeno (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b> | <b>NA</b> | <b>NL</b>        | <b>HA</b> | <b>HL</b>         |
|--|-----------|------------------|-----------|-------------------|
| <b>Ingesta de licopeno (mg/día)</b>          | –         | 3.50 $\pm$ 0.16  | –         | 3.20 $\pm$ 0.27   |
| <b>Licopeno excretado (mg/día)</b>           | –         | 2.44 $\pm$ 0.34  | –         | 1.27 $\pm$ 0.10*  |
| <b>Absorción aparente de licopeno (%)</b>    | –         | 44.00 $\pm$ 2.70 | –         | 63.00 $\pm$ 4.20* |
| <b>Licopeno Total</b>                        | –         | 2.90 $\pm$ 0.70  | –         | 6.00 $\pm$ 0.70*  |
| <b>Z-licopeno</b>                            | –         | 0.34 $\pm$ 0.05  | –         | 0.40 $\pm$ 0.03   |
| <b>E-licopeno</b>                            | –         | 2.50 $\pm$ 0.60  | –         | 5.60 $\pm$ 0.60*  |
| <b>12-apo-licopenal</b>                      | –         | nd               | –         | nd                |
| <b>8-apo-licopenal</b>                       | –         | nd               | –         | 0.01 $\pm$ 0.00   |
| <b>6-apo-licopenal</b>                       | –         | nd               | –         | 0.01 $\pm$ 0.00   |

<sup>1</sup>Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6 por grupo). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los cuatro grupos tras realizar un ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ). \*Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t para muestras independientes entre los grupos NL y HL ( $p < 0.05$ ) nd: No detectado

#### 4.2.4. Biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo

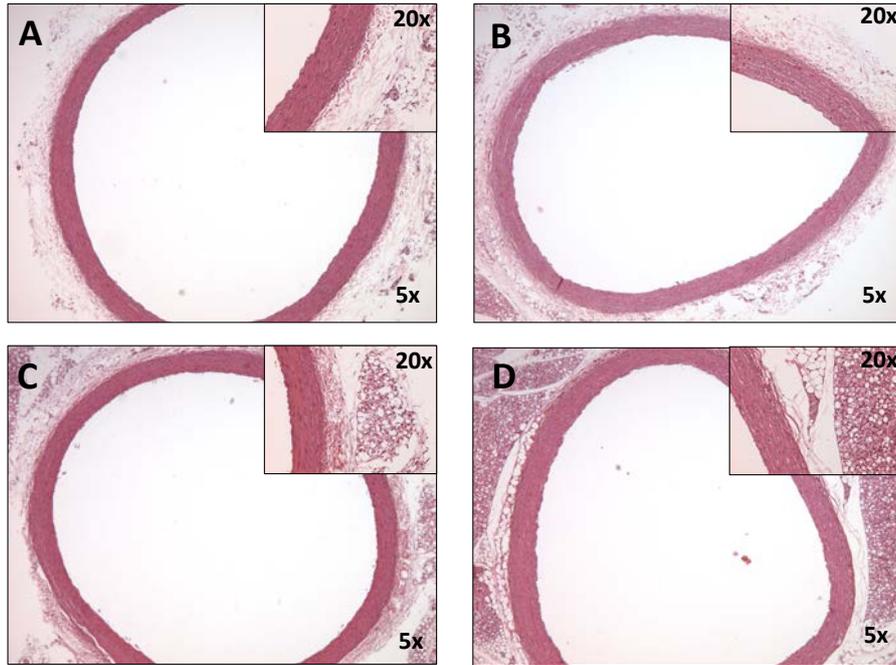
Aunque los mecanismos involucrados en la enfermedad de hígado graso no alcohólico no son totalmente conocidos, se producen alteraciones mitocondriales que afectan a la actividad de este orgánulo, disminuyendo la  $\beta$ -oxidación, que es la ruta metabólica dominante para la eliminación de los ácidos grasos en condiciones fisiológicas normales (Wei *et al.*, 2008). Además, también hay una disfunción en la cadena respiratoria que puede suponer la producción de especies reactivas al oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (García-Ruiz *et al.*, 1995), lo cual induce una depleción del ADN mitocondrial, resultando en una disminución de la función y el número de mitocondrias.

Con respecto a los biomarcadores de inflamación, no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Tabla 4.8) entre los distintos grupos y

tampoco entre los valores iniciales y finales, por lo que ambos factores, dieta y bebida, no modificaron estos parámetros. Lo mismo ocurrió con las concentraciones analizadas de TNF- $\alpha$  en las muestras de tejido adiposo abdominal y subcutáneo, al no observar diferencias significativas relacionadas con la dieta o el consumo del zumo de tomate. Las citoquinas proinflamatorias son consideradas un biomarcador de la progresión de esteatosis simple a NASH, pero no se observaron diferencias en los niveles plasmáticos de IL-6 ni TNF- $\alpha$ ; y por tanto, no se observó un efecto entre el licopeno y las citoquinas inflamatorias. Estos resultados sugieren que las ratas alimentadas con dieta aterogénica mostraron NAFLD en un estado inicial, una esteatosis simple con la acumulación de grasa en el hepatocito (nivel I y II), pero sin presentar inflamación ni fibrosis, signos considerados de un estado de esteatohepatitis.

Sin embargo, los biomarcadores de inflamación implicados en procesos de aterosclerosis (sICAM-1 y sVCAM-1) presentaron valores superiores en los grupos H que en los grupos N, incluso tras la ingesta de zumo de tomate. En el grupo HL la concentración de sVCAM-1 fue menor y la de sICAM-1 mayor en comparación con los resultados obtenidos en el grupo HA. Las concentraciones más elevadas de sICAM-1 y MDA en el hígado de los animales del grupo HL pueden ser consideradas un indicador de un mayor deterioro del hígado, ya que según Sookoian *et al.* (2010), se ha descrito una correlación positiva entre el grado de esteatosis y la expresión de sICAM-1 en humanos. Sin embargo, el estudio histológico del hígado y las otras citoquinas proinflamatorias no mostraron diferencias significativas entre los grupos HA y HL.

Junto con el análisis de los biomarcadores de inflamación sICAM-1 y sVCAM-1, se llevó a cabo un análisis histológico de las aortas con el fin de observar posibles lesiones a nivel endotelial, como consecuencia del consumo de una dieta alta en grasa y colesterol (**Figura 4.7**). Dicha figura muestra los cortes histológicos realizados en las aortas de uno de los animales de cada grupo experimental. A pesar de que los valores de sICAM-1 y sVCAM-1 fueron más elevados en los grupos H que en los grupos N, no se hallaron diferencias entre los distintos grupos ni indicios de lesión arterial en aquellos grupos que habían consumido una dieta alta en grasa y colesterol (H), aunque si se observó que el número de células grasas era más elevado en estos grupos.



**Figura 4.7.** Corte histológico en aorta torácica con tinción hematoxilina-eosina (20X) en los cuatro grupos experimentales: A (NA), B (NL), C (HA) y D (HL).

En relación a biomarcadores de estrés oxidativo se midieron diferentes marcadores en plasma, hígado y orina. El valor de la actividad antioxidante plasmática por el método ORAC fue significativamente mayor en los grupos HA y HL, hecho que está correlacionado positivamente con el nivel plasmático de proteínas ( $r=0.55$ ,  $p<0.05$ ), ya que la albúmina está reconocida como uno de los componentes que contribuye al estado antioxidante total del plasma (Cao y Prior, 1998; Roche *et al.*, 2008). Por el contrario, tras el consumo de zumo de tomate que se relacionaría con un incremento en el contenido plasmático de este carotenoide, no se observó un aumento de la capacidad antioxidante debido a que es una antioxidante lipofílico y el método ORAC empleado (ensayo ORAC hidrofílico) solo permite determinar la actividad de los antioxidantes hidrofílicos (Prior *et al.*, 2003)

**Tabla 4.8.** Biomarcadores de inflamación y de estrés oxidativo analizados en diferentes muestras biológicas de los cuatro grupos experimentales<sup>1</sup>.

| Parámetros                               | NA                        | NL                        | HA                       | HL                        |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| IL-6 Plasmático Inicial (pg/mL)*         | 469.0 ± 36.0              | 469.0 ± 36.0              | 496.0 ± 27.0             | 496.0 ± 27.0              |
| IL-6 Plasmático Final (pg/mL)*           | 483.0 ± 42.0              | 463.0 ± 44.0              | 460.0 ± 35.0             | 455.0 ± 44.0              |
| TNFα Plasmático Inicial (pg/mL)*         | 40.0 ± 4.7                | 40.0 ± 4.7                | 50.0 ± 7.9               | 50.0 ± 7.9                |
| TNFα Plasmático Final (pg/mL)*           | 33.0 ± 1.2                | 33.0 ± 2.5                | 30.0 ± 1.4               | 29.0 ± 2.4                |
| TNFα Adiposo abd (pg/mg prot)            | 100.0 ± 36.1              | 94.3 ± 46.0               | 39.2 ± 5.2               | 56.7 ± 4.2                |
| TNFα Adiposo sub (pg/mg prot)            | 221.1 ± 26.5 <sup>a</sup> | 245.3 ± 45.0 <sup>a</sup> | 73.8 ± 6.9 <sup>c</sup>  | 104.2 ± 9.8 <sup>a</sup>  |
| sVCAM-1 Plasmático (ng/mL)               | 49.0 ± 2.7 <sup>b</sup>   | 50.0 ± 2 <sup>b</sup>     | 120.0 ± 14 <sup>a</sup>  | 89.0 ± 6.4 <sup>b</sup>   |
| sICAM-1 Plasmático (pg/mL)               | 104.0 ± 6.9 <sup>c</sup>  | 108.0 ± 9.7 <sup>c</sup>  | 202.0 ± 8.6 <sup>b</sup> | 276.0 ± 29.0 <sup>a</sup> |
| ORAC en Plasma (mmoles equiv Trolox/L)   | 4.9 ± 0.2 <sup>c</sup>    | 5.3 ± 0.2 <sup>bc</sup>   | 6.1 ± 0.2 <sup>ab</sup>  | 6.5 ± 0.2 <sup>a</sup>    |
| MDA en Plasma (nmoles MDA/mL)            | 2.4 ± 0.1                 | 2.6 ± 0.2                 | 2.9 ± 0.4                | 2.5 ± 0.1                 |
| MDA en Hígado (nmol MDA/g prot)          | 13.0 ± 2.0 <sup>c</sup>   | 14.0 ± 2.0 <sup>bc</sup>  | 22.0 ± 2.5 <sup>ab</sup> | 29.0 ± 2.8 <sup>a</sup>   |
| Isoprostanos en Orina (ng/mg creatinina) | 2.2 ± 0.1 <sup>c</sup>    | 1.9 ± 0.3 <sup>c</sup>    | 9.9 ± 0.8 <sup>a</sup>   | 4.2 ± 0.3 <sup>b</sup>    |

<sup>1</sup>Los datos se expresan como media ± SEM (n=6 por grupo). Las diferentes letras representan diferencias significativas entre los cuatro grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05). \*Estos parámetros se analizaron al inicio y final del periodo de intervención. Los demás parámetros incluidos en la tabla sólo se analizaron al final del estudio.

Como medida *in vivo* del grado de peroxidación lipídica se midieron en plasma y en hígado las concentraciones de MDA y, en orina los niveles de isoprostanos (**Tabla 4.8**). Los niveles de MDA plasmático no presentaron diferencias significativas entre grupos, por lo que un incremento de los lípidos plasmáticos no se correspondió con un incremento en los compuestos oxidados de las grasas. En el caso de la concentración hepática de MDA, se observó un incremento significativo para los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, indicando un mayor nivel de peroxidación lipídica como consecuencia de la acumulación de lípidos en el hígado. A pesar de que el nivel de MDA en hígado fue ligeramente superior en el grupo HL en comparación con el grupo HA, la reducción de isoprostanos en orina (4.17 en HL vs. 9.87 en HA) mostró que la ingesta de zumo de tomate reduce la oxidación lipídica debida al consumo elevado de lípidos. Son pocos los estudios que se han llevado a cabo para evaluar el efecto del consumo de productos a base de tomate y licopeno sobre el estado oxidativo del

hígado. Sin embargo, algunos autores han descrito un papel protector sobre el metabolismo oxidativo de este órgano (Moreira *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Jamshidzadeh *et al.*, 2008). La diferencia observada en la cantidad de isoprostanos excretados pone de manifiesto una mejoría en el estado oxidativo asociado al consumo de zumo de tomate e ingesta de licopeno, datos que concuerdan con los obtenidos por Visioli *et al.* (2003). Los isoprostanos y el MDA son dos de los biomarcadores más utilizados en la determinación del grado de oxidación lipídica. Ambos se producen como consecuencia de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados (Ayala *et al.*, 2014); debido a la elevada acumulación de lípidos en el hígado (primer paso del proceso de esteatosis), los ácidos grasos son atacados por ROS y transformados en lipoperóxidos que, posteriormente, generan metabolitos reactivos como los isoprostanos y el MDA. Sin embargo, la determinación de los niveles de isoprostanos resulta una medida más fiable como marcador del estrés oxidativo que el MDA, ya que se trata de un compuesto más específico de dicho proceso y presenta una mayor estabilidad (Guha *et al.*, 2003; Janicka *et al.*, 2010; Koek *et al.*, 2011). A pesar de esto, el método aplicado en este estudio para la determinación del MDA en hígado (HPLC con detección por UV) es un método preciso, sensible y reproducible, lo que supone una mejora frente al método comúnmente utilizado para este análisis: la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA), ya que se trata de una técnica colorimétrica con escasa especificidad (Mateos *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presencia de niveles elevados de ambos biomarcadores estaría reflejando un desequilibrio oxidativo en los hepatocitos debido al exceso de lípidos acumulados tras el consumo de una dieta con alto contenido en grasa y colesterol.

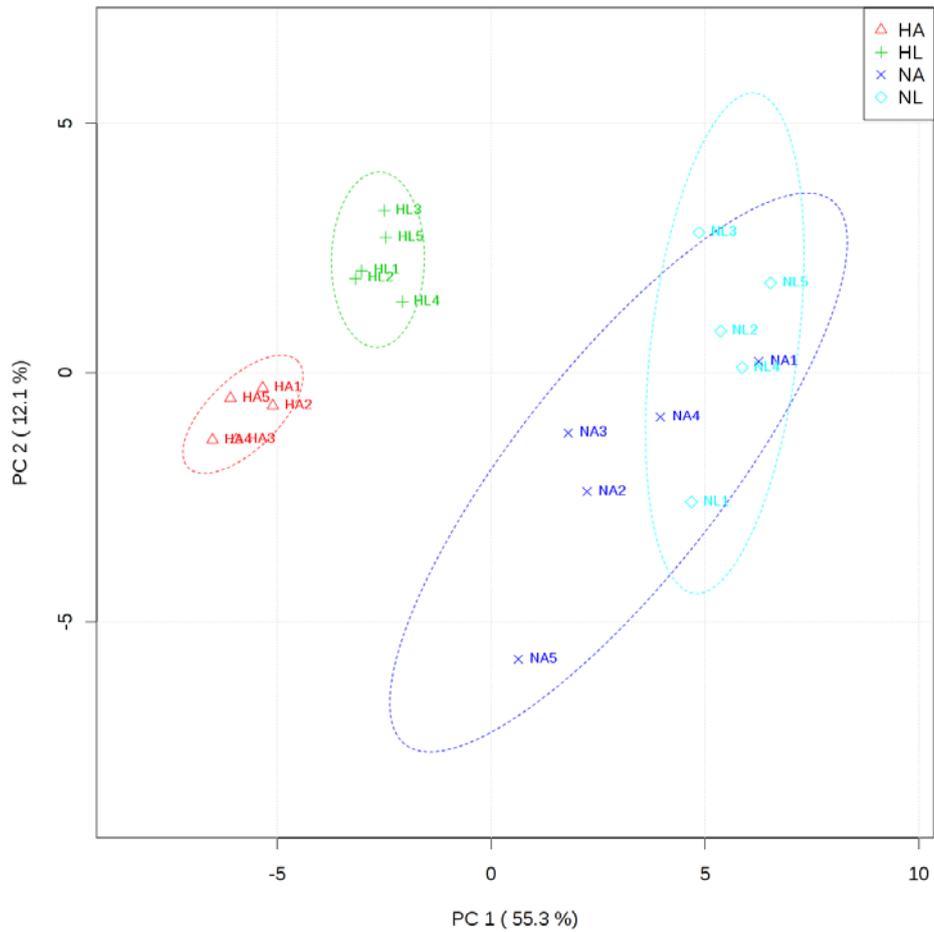
#### 4.2.5. Análisis de metabolitos hepáticos

Los cambios en los metabolitos del hígado fueron analizados para detectar cambios en el perfil metabólico y determinar el efecto del tipo de dieta y el consumo de zumo de tomate sobre el mismo. Se analizaron a la vez un total de 72 metabolitos hepáticos nitrogenados (aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos y vitaminas) que participan en numerosas rutas metabólicas. Con los primeros resultados se realizó un cribado de aquellos que mostraron diferencias significativas según la dieta y el consumo de zumo de tomate, seleccionando un total de 40 metabolitos.

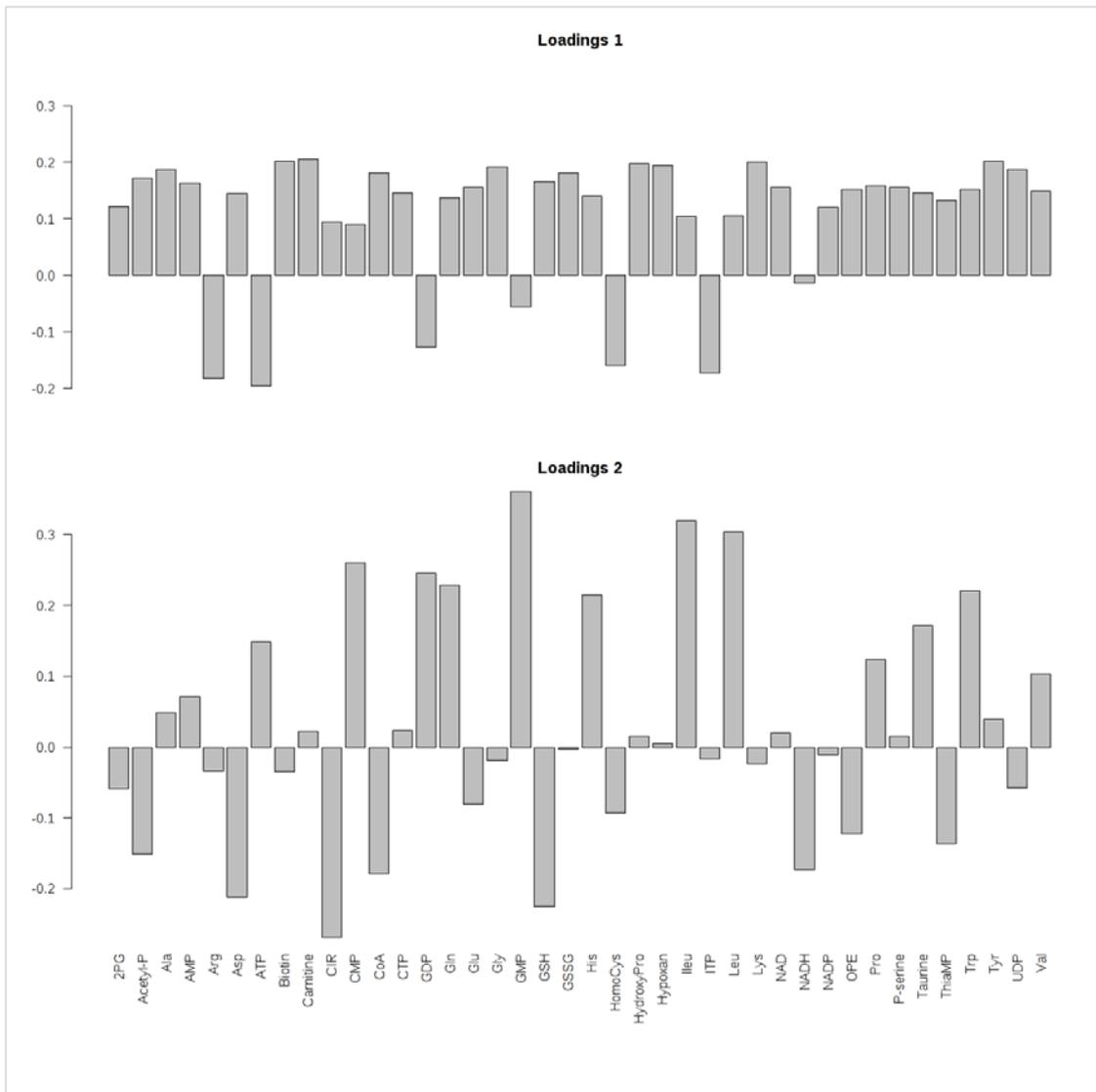
La **Figura 4.8** representa el análisis de componentes principales (PCA) de los metabolitos relevantes tras la realización del test ANOVA con un valor de  $p < 0.05$ . Los PC1 y

PC2 agrupan más del 72% de la varianza total. La validación cruzada permite comprobar el poder predictivo del modelo generado usando el ratio  $Q^2/R^2$  como medida de la fiabilidad de las predicciones. Este ratio fue de alrededor de 0.8 para ambos análisis, PC1 y PC2, sugiriendo que el modelo generado era consistente y válido (datos no mostrados). Los resultados representados en el PCA mostraron que la varianza principal se debía al tipo de dieta (N vs H), con más del 50% de la varianza total. Este hecho demuestra que la dieta hipercolesterolémica dio lugar a un patrón metabólico diferente, lo que concuerda con estudios realizados previamente (Vinaixa *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010). Por el contrario, el efecto del licopeno se explicó fundamentalmente por el PC2, y queda en un efecto de segundo orden, aunque se observa que el efecto del licopeno es más manifiesto en el grupo de animales que ingirieron la dieta H que en los que ingirieron la dieta N, separando claramente los grupos. Casi todos los metabolitos relevantes estuvieron implicados en las variaciones del PC1 (**Figura 4.9**), lo que sugiere que el cambio de la alimentación alteró enormemente el patrón metabólico global, hecho que estuvo motivado por la aparición de la esteatosis inducida por la dieta alta en grasa. El PC2 estaba principalmente determinado por los cambios en algunas moléculas que intervienen en el metabolismo oxidativo (principalmente GSH, NADH y homocisteína), hecho que se asocia a la acumulación del licopeno en el hígado y a la capacidad antioxidante del mismo. Sin embargo, varios mononucleótidos (CMP, GMP y UMP), algunos aminoácidos (Ile, Leu, CIT, Gln e His) y CoA también fueron importantes en la alteración del PC2 (**Figura 4.9**). Este hecho sugiere que el licopeno podría tener efecto en objetivos metabólicos adicionales que no estuvieran directamente relacionados con su capacidad antioxidante.

Las concentraciones absolutas de los diferentes metabolitos expresadas en nmoles/g se muestran en la **Tabla 4.9**. En general, el consumo conjunto de la dieta alta en grasa y el zumo de tomate cambió el patrón metabólico, al mostrar los animales con esteatosis inducida que habían consumido zumo, unos niveles de metabolitos más próximos a los de los animales que tomaron una dieta estándar, es decir, los que tenían un metabolismo fisiológico del hígado. Se observaron, por tanto, diferencias significativas entre los grupos de animales con la dieta H para algunos de los metabolitos, asociado a la ingesta de licopeno. Por el contrario, los animales que consumieron una dieta estándar no presentaron diferencias asociadas a la administración de zumo de tomate.



**Figura 4.8.** Diagrama de Componentes Principales (PCA) para los cuatro grupos experimentales distribuidos en el espacio de acuerdo a los metabolitos hepáticos que han mostrado diferencias estadísticamente significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ). El PCA 1 clasifica a los individuos según el tipo de dieta (N o H) y el PCA 2 realiza la clasificación atendiendo al consumo de zumo de tomate o agua (L o A).



**Figura 4.9.** Cargas obtenidas de los diferentes metabolitos en el PCA, lo que demuestra la influencia de los metabolitos en el PC1 y PC2.

**Tabla 4.9.** Concentraciones de los metabolitos relevantes y valores de *p* obtenidos por ANOVA de dos vías y *t*-test de los cuatro grupos experimentales

| Metabolito        | NA             | NL             | HA             | HL             | Dieta    | Z.Tomate | Interacción | NA/NL    | NA/HA    | NA/HL    | NL/HL    | HA/HL    | HA/NL    |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>ZPG</b>        | 16.9 ± 8.6     | 41.7 ± 9.1     | nd             | 16.7 ± 9.6     | .027*    |          |             |          |          |          |          |          | .026*    |
| <b>Acetil-P</b>   | 69.9 ± 14.1    | 98.7 ± 12.9    | 21.4 ± 3.7     | 22.4 ± 6.1     | <.001*** |          |             |          | .044*    | .044*    | .008**   |          | .01**    |
| <b>Ala</b>        | 1760.5 ± 123.6 | 1971.8 ± 192.2 | 1040.1 ± 71.5  | 1370.1 ± 75.4  | <.001*** |          |             |          | .008**   |          |          | .031*    | .017*    |
| <b>AMP</b>        | 130.9 ± 63.0   | 365.5 ± 38.2   | 37.7 ± 19.4    | 69.4 ± 35.0    | <.001*** | .021*    |             | .035*    |          |          | .003**   |          | .002**   |
| <b>Arg</b>        | nd             | nd             | 4.2 ± 0.2      | 1.5 ± 0.2      | <.001*** | <.001*** |             |          | <.001*** | .012*    | .012*    | <.001*** | <.001*** |
| <b>Asp</b>        | 431.2 ± 58.1   | 408.4 ± 35.4   | 193.6 ± 9.1    | 277.5 ± 24.2   | <.001*** |          |             |          | .031*    |          | .037*    | .042*    | .01**    |
| <b>ATP</b>        | 52.1 ± 1.5     | 47.5 ± 0.5     | 269.3 ± 7.3    | 266.7 ± 8.4    | <.001*** |          |             |          | <.001*** | <.001*** | <.001*** |          | <.001*** |
| <b>Biotina</b>    | 13.9 ± 0.9     | 14.5 ± 0.7     | 6.9 ± 0.3      | 9.6 ± 0.3      | <.001*** | .044*    |             |          | .004**   | .021*    | .004**   | <.001*** | <.001*** |
| <b>Carnitina</b>  | 1315.0 ± 125.2 | 1626.3 ± 76.8  | 664.5 ± 41.5   | 911.1 ± 34.6   | <.001*** | .012*    |             |          | .013*    |          | .002**   | .008**   | <.001*** |
| <b>ClR</b>        | 21.1 ± 6.2     | 18.7 ± 6.5     | 5.2 ± 1.3      | 8.1 ± 2.1      | .015*    |          |             |          |          |          |          |          |          |
| <b>CMP</b>        | 66.4 ± 11.1    | 70.4 ± 5.5     | 32.9 ± 1.6     | 89.0 ± 9.6     | .009**   | .044*    |             |          |          |          |          | .012*    | .007**   |
| <b>CoA</b>        | 100.5 ± 3.6    | 70.0 ± 4.1     | nd             | nd             | <.001*** | <.001*** |             | <.003*** | <.001*** | <.001*** | <.001*** |          | <.001*** |
| <b>CTP</b>        | 63.6 ± 22.7    | 73.9 ± 16.2    | 25.7 ± 5.5     | 8.5 ± 4.7      | .004**   |          |             |          |          |          | .031*    |          |          |
| <b>GDP</b>        | nd             | nd             | 53.7 ± 3.1     | 143.4 ± 19.4   | <.001*** | .002**   |             |          | <.001*** | .007**   | .007**   | .024*    | <.001*** |
| <b>Gln</b>        | 1608 ± 193.1   | 1828.0 ± 171.4 | 1269.5 ± 63.4  | 1515.4 ± 40.0  | .039*    |          |             |          |          |          |          | .031*    |          |
| <b>Glu</b>        | 2188.5 ± 208.7 | 2295.3 ± 261.4 | 1286.8 ± 37.9  | 1693.5 ± 166.1 | .002**   |          |             |          | .028*    |          |          |          | .036*    |
| <b>Gly</b>        | 774.8 ± 64.2   | 1054.5 ± 92.8  | 415.3 ± 21.6   | 506.4 ± 10.1   | <.001*** | .021*    |             |          | .011*    | .031*    | .012*    | .025*    | .007**   |
| <b>GMP</b>        | 2.8 ± 2.8      | 19.3 ± 2.4     | 17.1 ± 1.5     | 30.3 ± 3.5     | <.001*** | <.001*** |             | .009**   | .013*    | .002*    | .002*    | .032*    | .007**   |
| <b>GSH</b>        | 1.7E4 ± 1.3E3  | 1.2E4 ± 1.2E3  | 289.4 ± 25.3   | 615.5 ± 26.6   | <.001*** | .044*    |             | .039*    | <.001*** | <.001*** | .004**   | <.001*** | .003**   |
| <b>GSSG</b>       | 4989.1 ± 553.8 | 4565.5 ± 451.4 | 2235.3 ± 297.4 | 2793.1 ± 279.8 | <.001*** |          |             |          | .013*    | .031*    | .031*    |          | .012*    |
| <b>His</b>        | 603.0 ± 142.2  | 701.6 ± 54.9   | 403.5 ± 14.4   | 522.4 ± 17.8   | .038*    |          |             |          |          |          |          | .005**   | .013*    |
| <b>HomoCys</b>    | 234.8 ± 23.5   | 159.3 ± 7.9    | 381.5 ± 16.5   | 225.6 ± 8.4    | <.001*** | <.001*** |             |          | .006**   |          | .03**    | <.001*** | <.001*** |
| <b>HydroxyPro</b> | 867.8 ± 69.4   | 1209.9 ± 88.2  | 364.4 ± 55.8   | 561.8 ± 17.7   | <.001*** | .004**   |             | .035*    | .003**   | .025*    | .007**   | .041*    | <.001*** |
| <b>Hypoxan</b>    | 359.0 ± 51.1   | 428.6 ± 25.7   | 169.8 ± 8.8    | 221.1 ± 19.2   | <.001*** |          |             |          | .039*    |          | .002**   |          | .002**   |
| <b>Ileu</b>       | 336.0 ± 52.0   | 496.8 ± 79.6   | 279.2 ± 14.9   | 402.9 ± 12.4   | .033*    |          |             |          |          |          |          | .002**   |          |
| <b>ITP</b>        | 10.0 ± 10.0    | 13.9 ± 12.3    | 67.8 ± 7.4     | 60.2 ± 4.4     | <.001*** |          |             |          | .008**   | .013*    | .035*    |          | .021*    |
| <b>Leu</b>        | 180.8 ± 27.0   | 292.4 ± 43.9   | 160.5 ± 8.6    | 223.4 ± 13.5   | .021*    |          |             |          |          |          |          | .017*    |          |
| <b>Lys</b>        | 440.6 ± 63.8   | 558.3 ± 35.0   | 175.1 ± 11.0   | 239.6 ± 12.2   | <.001*** |          |             |          | .031*    |          | .002**   | .013*    | <.001*** |
| <b>NAD</b>        | 256.8 ± 49.7   | 428.8 ± 93.5   | 103.5 ± 19.9   | 97.4 ± 36.6    | <.001*** |          |             |          |          |          | .039*    |          | .044*    |
| <b>NADH</b>       | 16.9 ± 0.7     | 19.0 ± 1.4     | 26.3 ± 0.6     | 5.4 ± 0.9      | <.001*** | <.001*** |             |          | <.001*** | <.001*** | <.001*** | <.001*** | .013*    |
| <b>NADP</b>       | nd             | 82.2 ± 23.0    | nd             | nd             | .016*    |          |             |          |          |          | .044*    |          | .044*    |
| <b>OPE</b>        | 69.7 ± 25.6    | 122.1 ± 16.7   | 24.6 ± 4.8     | 24.5 ± 14.6    | <.001*** |          |             |          |          |          | .009**   |          | .011*    |
| <b>Pro</b>        | 142.7 ± 5.5    | 136.5 ± 11.4   | 93.1 ± 5.2     | 126.9 ± 4.0    | <.001*** |          |             |          | <.001*** |          |          | .005**   | .032*    |
| <b>P-serina</b>   | 20.0 ± 2.0     | 19.5 ± 0.5     | 10.8 ± 0.5     | 17.3 ± 1.8     | .002**   |          |             |          | .021*    |          |          | .038*    | <.001*** |
| <b>Taurina</b>    | 1249.4 ± 402.0 | 2377.4 ± 309.6 | 870.5 ± 95.2   | 1244.1 ± 132.5 | .018*    | .039*    |             |          |          |          |          | .036*    | .017*    |
| <b>ThiamP</b>     | 26.7 ± 6.9     | 9.5 ± 2.2      | nd             | nd             | <.001*** |          |             |          | .037*    | .037*    | .031*    |          | .031*    |
| <b>Trp</b>        | 88.8 ± 14.6    | 134.6 ± 9.8    | 75.5 ± 4.8     | 94.7 ± 1.7     | .016*    | .012*    |             |          |          |          | .031*    | .031*    | .007**   |
| <b>Tyr</b>        | 343.3 ± 18.5   | 429.0 ± 13.4   | 191.7 ± 8.0    | 271.5 ± 11.6   | <.001*** | <.001*** |             | .018*    | .003**   | .031*    | <.001*** | .004**   | <.001*** |
| <b>UDP</b>        | 2065.5 ± 16.6  | 251.0 ± 32.1   | 47.7 ± 8.1     | 93.4 ± 18.0    | <.001*** |          |             |          | <.001*** | .007**   | .013*    |          | .009**   |
| <b>Val</b>        | 689.2 ± 642.1  | 6347.1 ± 707.4 | 3994.8 ± 242.5 | 5860.9 ± 340.4 | .009**   |          |             |          | .021*    |          |          | .01**    | .047*    |

<sup>1</sup>Los datos se expresan como media ± SEM. Los valores *p* están ajustados mediante FDR y los metabolitos significativos (ANOVA *p*<0.05) se representan: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001

Estos resultados muestran que la ingesta de licopeno se relaciona con efectos beneficiosos sobre la prevención de la NAFLD, debido a las propiedades antioxidantes que posee (Moreira *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Mordente *et al.*, 2011). Sin embargo, esta patología es más compleja que un simple estado de desequilibrio redox, ya que también está relacionada con cambios en el metabolismo energético y lipídico, y alteraciones de la concentración de aminoácidos (Byrne *et al.*, 2009; Tessari *et al.*, 2009; Fon Tacer y Rozman, 2011). Por tanto, el licopeno no ejercería su efecto protector únicamente en el sistema antioxidante del hígado, como han sugerido otros investigadores previamente (Bahcecioglu *et al.*, 2010), sino que también podría tener un efecto compensatorio en el metabolismo hepático cuando los animales son alimentados con una dieta alta en grasa.

Si observamos los valores absolutos de los metabolitos analizados (**Tabla 4.9**), la mayoría de ellos disminuyeron en los hígados de los animales que fueron alimentados con una dieta alta en grasa sin la presencia de zumo de tomate (comparación NA/HA). Esta tendencia se mantuvo en varios aminoácidos que presentaron diferencias estadísticamente significativas en función de la dieta suministrada. La única excepción fue la arginina, cuyos niveles se vieron incrementados significativamente en los grupos de animales con esteatosis inducida (HA y HL). Cuando el zumo de tomate se combinó con la dieta alta en grasa, los niveles de la mayoría de los aminoácidos analizados se incrementaron, tendiendo al patrón metabólico encontrado en los animales alimentados con la dieta estándar (comparación HA/HL) e incluso, hay que destacar, que la concentración de Arg ( $P < 0.001$ ) disminuyó en el grupo HL hasta niveles más próximos a los encontrados en los animales alimentados con la dieta estándar (**Tabla 4.9**). Estudios previos han confirmado esta depleción de aminoácidos en el hígado tras la ingesta de una dieta grasa (Xie *et al.*, 2010; García-Canaveras *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). El incremento de Arg en los hígados de los animales alimentados con dieta aterogénica podría estar asociado con la disminución de la lipogénesis, ya que este aminoácido regula el metabolismo lipídico, modulando la expresión y función de las enzimas implicadas en los procesos de lipólisis, lipogénesis y eliminación de oxidantes (Jobgen *et al.*, 2009), por lo que la disminución de la concentración de Arg en el grupo HL puede relacionarse con una mejora en el metabolismo lipídico de los animales con esteatosis inducida. Un patrón similar se encontró en algunos metabolitos implicados en el metabolismo lipídico, como L-carnitina, biotina y OPE (**Tabla 4.9**).

Las concentraciones de L-carnitina y CoA, metabolitos implicados en la  $\beta$ -oxidación, disminuyeron en los hígados de los animales de los grupos HA y HL, tal y como se ha descrito en NAFLD, en modelos de rata y humano (Vinaixa *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). La disminución

de los niveles de L-carnitina en el hígado podría estar acompañada de alteraciones en la actividad mitocondrial, incluyendo unas tasas menores de la oxidación completa de ácidos grasos (Noland *et al.*, 2009; Vinaixa *et al.*, 2009). Por tanto, los altos niveles de L-carnitina en el hígado podrían considerarse un factor preventivo de la evolución de NAFLD a NASH. Las diferencias significativas encontradas en las concentraciones de L-carnitina en la comparación por parejas (NA/NL y HA/HL), mostró que las ratas que tomaron zumo de tomate presentaron unos niveles superiores que sus grupos control ( $p < 0.012$ ), lo que podría indicar un estado más saludable para mantener la actividad mitocondrial en lo que respecta a la  $\beta$ -oxidación, y por tanto, estaría protegiendo al hígado graso de alcanzar un estado de inflamación o fibrosis.

De nuevo, un patrón similar se encontró en algunos compuestos intermediarios redox, tales como, hidroxiprolina, GSH, GSSG y taurina (**Tabla 4.9**). Hay que destacar que, incluso aunque el ratio glutatión fue casi dos veces mayor cuando los animales con NAFLD ingerían zumo de tomate, sus niveles fueron 10 veces mayores cuando los animales fueron alimentados con dieta estándar (**Tabla 4.9**). Generalmente, se acepta que el estrés oxidativo está relacionado con el desarrollo de NAFLD a través de la ruta de trans-sulfuración (Bravo *et al.*, 2011), y por tanto, no sorprende que los cuatro subproductos procedentes del metabolismo de la metionina (homocisteína, GSH, GSSG y taurina) mostraran fuertes diferencias cuando se proporcionaba una dieta aterogénica. La taurina y ambas formas del glutatión se vieron disminuidas en NAFLD, probablemente a causa de que las rutas SAME y de trans-sulfuración disminuyeron debido a las condiciones dietéticas. Además, aparte de la L-cisteína, el glutatión se forma a partir de dos aminoácidos, L-glutamato y glicina, los cuales también se vieron disminuidos en las ratas alimentadas con dieta aterogénica, mostrando un incremento significativo en el grupo HL comparado con el grupo HA. Estos resultados indican la presencia de un daño en la síntesis del glutatión (Abdelmalek *et al.*, 2009) en animales de los grupos HA y HL, que podría confirmarse por la brusca disminución de GSH (casi 60 veces en HA), mientras que cuando se suministró licopeno (grupo HL) los niveles fueron más de 25 veces inferiores al valor presente en la dieta estándar. Además, en el grupo HL, los niveles de taurina y homocisteína recuperaron los valores establecidos en la dieta estándar, probablemente debido a las propiedades antioxidantes del licopeno, que podría ser capaz de restaurar la actividad de la ruta de trans-sulfuración. Sin embargo, estos hallazgos no concuerdan con los obtenidos por Bahcecioglu *et al.* (2010), quienes observaron que no había diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glutatión reducido entre las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y dieta normal y, en segundo lugar, que tras la administración de licopeno, los niveles de GSH en el hígado no sólo no se recuperaron sino que

se incrementaron superando incluso el valor obtenido en el grupo que consumió la dieta estándar. Una posible explicación para estas diferencias podría ser el método de cuantificación de GSH empleado por estos autores, basado en la reacción de GSH con DTNB. Obviamente, esta reacción no es específica para GSH ya que, por ejemplo, la L-cisteína produce la misma reacción (Sedlak *et al.*, 1968). Además, el método sin separación se indicó en el proceso de cuantificación, y por tanto, los resultados de los autores podrían estar relacionados con el total de grupos sulfhidrilos no proteicos más que con la concentración específica de GSH.

El ratio NAD/NADH también disminuyó en los animales alimentados con la dieta alta en grasa (**Tabla 4.10**) lo que concuerda con estudio previos (García-Canaveras *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). Sin embargo, a diferencia de la concentración de GSH, la administración de zumo de tomate restauró el ratio NAD/NADH al valor de la dieta estándar, probablemente debido a que la actividad antioxidante del licopeno podría paliar algunos de los efectos dañinos de la acumulación de la grasa (Bahcecioglu *et al.*, 2010). Otros antioxidantes dietéticos, como el resveratrol, han mostrado un incremento similar del ratio NAD/NADH en un modo dependiente de AMPK en animales alimentados con dieta alta en grasa (Um *et al.*, 2010).

**Tabla 4.10.** Ratio redox en el hígado de las ratas de los cuatro grupos experimentales<sup>1</sup>

| Ratio                   | NA         | NL         | HA        | HL         |
|-------------------------|------------|------------|-----------|------------|
| <b>NAD/NADH</b>         | 15.1 ± 3.0 | 22.0 ± 4.1 | 3.9 ± 0.7 | 17.8 ± 5.2 |
| <b>Glutación red/ox</b> | 3.7 ± 0.6  | 2.9 ± 0.5  | 0.1 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0  |

<sup>1</sup>Datos expresados como media ± SEM

En resumen, la ingesta de licopeno procedente del zumo de tomate y su acumulación en el hígado parecen tener un efecto protector sobre la disminución del estado de NAFLD inducido en las ratas por el consumo de una dieta alta en grasa y colesterol. Estos resultados describen un efecto del licopeno procedente del zumo de tomate más complejo, que va más allá de su actividad antioxidante. Así, se observa una reducción de la depleción de aminoácidos (todos los aminoácidos recuperaron, al menos parcialmente, los niveles, asemejándose a los encontrados en el hígado de los animales alimentados con la dieta estándar), una recuperación del equilibrio redox en el hígado (recuperación del ratio NAD/NADH e intermediarios del metabolismo de la metionina) así como, un incremento de los niveles de L-carnitina.

#### 4.2.6. Expresión génica del metabolismo de ácidos grasos

Para comprender los mecanismos que puede ejercer el licopeno sobre el metabolismo lipídico del hígado en NAFLD, el análisis de metabolitos se completó con el estudio de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis. La cuantificación relativa de ARNm de 84 genes claves implicados en rutas enzimáticas y en la regulación del metabolismo de ácidos grasos se llevó a cabo por RT-qPCR. Se seleccionaron aquellos genes que presentaban un valor de expresión o *fold change* significativo ( $p < 0.05$ ) al menos dos veces menor o mayor, es decir, subexpresados o sobreexpresados, en comparación relativa al grupo NA (**Tabla 4.11**).

Si evaluamos el efecto del consumo de zumo de tomate en la expresión génica de los animales alimentados con la dieta estándar, es decir, en el grupo NL comparado con el grupo NA, se observa una sobreexpresión de las proteínas Fabp3, implicada en el transporte intracelular de ácidos grasos, y Pecn, transportador que favorece la oxidación de los derivados de acil-CoA, activando las rutas de oxidación de los ácidos grasos. Estos resultados demuestran que ante situaciones fisiológicas la ingesta de licopeno mejora el transporte de ácidos grasos en el interior del hepatocito, incrementando la eficiencia de la  $\beta$ -oxidación en las mitocondrias, ya que estas proteínas están involucradas en la transformación de dienoil-CoA a trans-enoil-CoA, lo que permite la continuación de la  $\beta$ -oxidación cuando los ácidos grasos no pueden ser hidrolizados por la acil-CoA deshidrogenasas debido a la presencia de los dobles enlaces (Musso *et al.*, 2009).

Para los animales con esteatosis inducida (grupos H), la combinación de la dieta aterogénica junto con la ingesta de zumo de tomate (HL) condujo a la sobreexpresión de los niveles de ARNm de varias enzimas implicadas en diferentes pasos del metabolismo de ácidos grasos. En general, considerando aquellos genes con un cambio significativo ( $p < 0.05$ ), al menos dos veces mayor, y teniendo en cuenta su función en el metabolismo de los ácidos grasos, los cambios observados se pueden clasificar en tres grupos: 1) genes de proteínas FATP del transporte intracelular de ácidos grasos (familia Fabp y Slc27a1); 2) genes relacionados con proteínas del proceso de hidrólisis, tales como Lpl y Gdp2; y 3) genes implicados en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial o peroxisomal de ácidos grasos, tales como Cpt1c, Acsm2, Acot8 y Pecn. Además, el ARNm de Ppa1, pirofosfatasa inorgánica, y diferentes quinasas activadas por AMP (Prka) fueron también sobreexpresadas, ya que estas proteínas actúan en un amplio rango de rutas de señalización del metabolismo lipídico.

En primer lugar, en los animales con esteatosis inducida que tomaron zumo de tomate (HL) se observó un efecto significativo en las proteínas transportadoras Fabp3 and Slc27a1. Sin embargo, en las ratas del grupo HA se observó una sobreexpresión significativa de los valores de Fabp2, gen identificado como posible candidato implicado en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y obesidad (Liu *et al.*, 2015). Los transportadores de la familia Fabp son proteínas localizadas en el citosol que facilitan el transporte intracelular de ácidos grasos y otras moléculas lipofílicas desde el citosol a los receptores nucleares, controlando la disponibilidad de ligandos que pueden regular la transcripción de los genes involucrados en determinados procesos metabólicos e inflamatorios (Helledie *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2001 Tan *et al.*, 2002). Aunque han sido identificadas nueve proteínas Fabp<sub>s</sub> diferentes según el tejido en el que se encuentren localizadas (Musso *et al.*, 2009), estas proteínas se localizan, en general, en tejidos que intervienen en el metabolismo lipídico y no solo se expresan en aquel tejido del que proceden originalmente, sino que se pueden expresar en varios tejidos.

Los resultados esperados en este estudio habrían sido la sobreexpresión de las Fabp específicas de hígado (Fabp1 o L-Fabp, siendo esta la más abundante, y Fabp5 ó E-Fabp); sin embargo observamos una sobreexpresión significativa de las Fabp de intestino delgado (Fabp2 o I-Fabp), corazón y músculo esquelético (Fabp 3 ó H-Fabp). Estos resultados se justifican por el hecho de que un tipo de Fabp se puede expresar en otros tejidos, aunque no sean los específicos para ella y además, diferentes autores han observado en estudios realizados con ratas que, en ayunas la expresión de la Fabp del hígado está disminuida (Iseki *et al.*, 1990), mientras que la del corazón se encuentra sobreexpresada (Carey *et al.*, 1994), y estas circunstancias coinciden con las del presente estudio, puesto que los animales se sometieron a un ayuno previo al sacrificio. Sin embargo, es importante destacar las diferencias observadas de acuerdo a la ingesta de zumo de tomate, las cuales podrían deberse a la acumulación de licopeno en el hígado. El incremento de la expresión de la proteína Fabp2 en el grupo HA y la Fabp3 en el grupo HL, indica un aumento del transporte de lípidos hacia el interior de las células lo que contribuiría a disminuir el contenido de ácidos grasos plasmáticos, reduciendo la dislipemia e incrementando la oxidación de los ácidos grasos (Auinger *et al.*, 2010). Además, la expresión de la FABP es regulada por hormonas como la insulina, por los mediadores de inflamación (TNF $\alpha$  y IL-1), y debido a su papel en la homeostasis de los ácidos grasos del hígado, también está regulada por los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR- $\alpha$  or - $\gamma$ ) (Doege *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2013). El otro transportador de membrana que estuvo únicamente sobreexpresado en el grupo que tomó la dieta alta en

grasa e ingirió a la vez el zumo de tomate (HL) fue el Slc27a1 (Miembro 1 de la familia 27 de transportadores de ácidos grasos), por lo que la acumulación de licopeno en el hígado parece favorecer el transporte de ácidos grasos, aumentando el metabolismo lipídico.

**Tabla 4.11.** Símbolo, título, valor de expresión o *fold change* y valores medios de Ct de los genes que mostraron un valor de subexpresión o sobreexpresión superior a 2 y un valor de  $p < 0.05$  en las muestras de hígado<sup>1</sup>.

| Símbolo del Gen | Nombre del Gen   | Fold-change |       |       |              |
|-----------------|--|-------------|-------|-------|--------------|
|                 |  | NA-HA       | NA-HL | NA-NL | Ct           |
| <i>Acad9</i>    | Acyl-CoA dehydrogenase family, member 9                      | 2.46        | –     | –     | 29.83 ± 0.31 |
| <i>Acads</i>    | Acyl-CoA dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain               | 3.42        | –     | –     | 29.79 ± 0.13 |
| <i>Acot8</i>    | Acyl-CoA thioesterase  | –           | 4.53  | –     | 31.10 ± 0.56 |
| <i>Acox2</i>    | Acyl-CoA oxidase 2, branched chain                           | 2.45        | –     | –     | 25.28 ± 0.45 |
| <i>Acs15</i>    | Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5               | 2.33        | –     | –     | 27.65 ± 0.33 |
| <i>Acsm2</i>    | Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2             | 5.92        | 6.09  | –     | 31.62 ± 0.22 |
| <i>Acsm4</i>    | Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 4             | 2.78        | –     | –     | 32.57 ± 0.48 |
| <i>Cpt1c</i>    | Carnitine palmitoyltransferase 1C                            | –           | 3.40  | –     | 33.10 ± 0.19 |
| <i>Fabp2</i>    | Fatty acid binding protein 2                                 | 7.03        | –     | –     | 31.29 ± 0.30 |
| <i>Fabp3</i>    | Fatty acid binding protein 3                                 | –           | 2.49  | 3.51  | 32.54 ± 0.18 |
| <i>Gdp2</i>     | Glycerol-3- phosphatase dehydrogenase 2                      | 2.40        | –     | –     | 31.20 ± 0.18 |
| <i>lipe</i>     | Hormone-sensitive lipase                                     | 2.39        | –     | –     | 32.48 ± 0.52 |
| <i>Lpl</i>      | Lipoprotein lipase   | –           | 6.47  | –     | 30.89 ± 0.25 |
| <i>Mcee</i>     | Methylmalonyl CoA epimerase                                  | –           | 13.45 | –     | 26.25 ± 0.08 |
| <i>Ppa1</i>     | Inorganic pyrophosphatase 1                                  | 2.26        | –     | –     | 28.24 ± 0.37 |
| <i>Prkaa1</i>   | Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit     | 2.83        | –     | –     | 31.18 ± 0.54 |
| <i>Prkab1</i>   | Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit  | 2.17        | –     | –     | 33.83 ± 0.78 |
| <i>Prkab2</i>   | Protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit  | –           | 2.27  | –     | 34.31±0.65   |
| <i>Prkaca</i>   | Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha             | 2.54        | 2.11  | –     | 29.50 ± 0.44 |
| <i>Prkacb</i>   | Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta              | 2.09        | 2.00  | –     | 29.84 ± 0.26 |
| <i>Prkag1</i>   | Protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit | 2.38        | 2.77  | –     | 29.18 ± 0.37 |
| <i>Pecr</i>     | Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase                      | –           | 2.44  | 2.08  | 24.71 ± 0.44 |
| <i>Slc27a1</i>  | solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1  | –           | 2.00  | –     | 30.73 ± 0.15 |

<sup>1</sup>El valor de expresión o *fold change* de cada gen de los grupos NL, HA y HL se calculó tomando como referencia el valor 1 del grupo NA

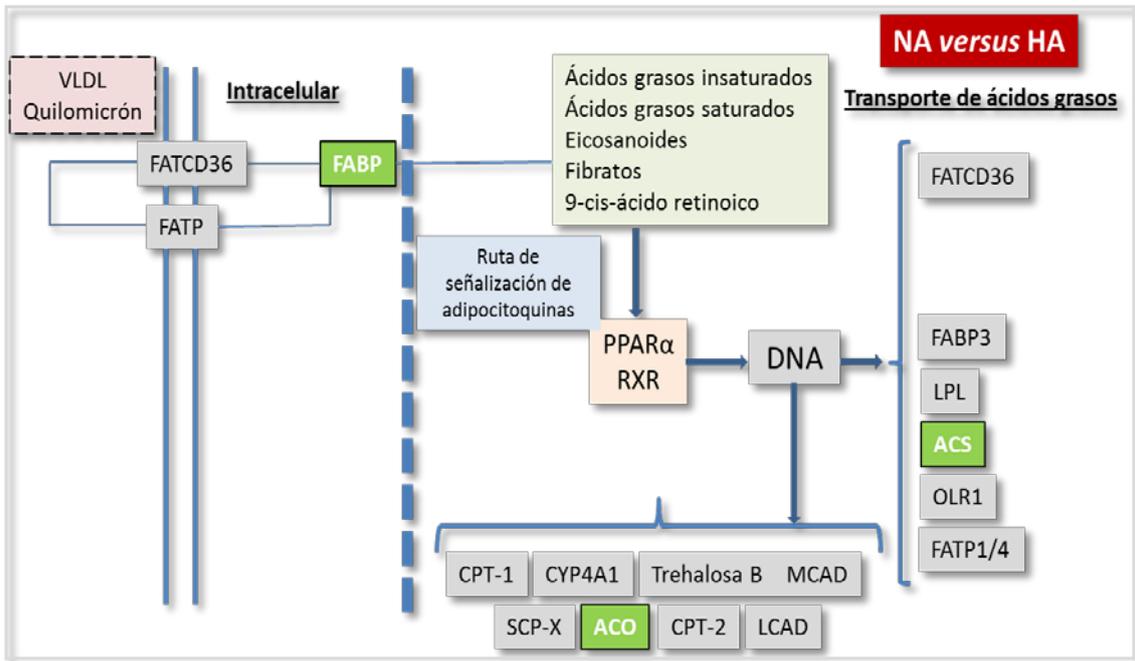
El segundo grupo de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos que aparecen sobreexpresados estarían relacionados con la hidrólisis de las grasas. Así, los animales con esteatosis inducida que recibieron zumo de tomate mostraron un incremento en la expresión del ARNm de las proteínas relacionadas con la hidrólisis de los ácidos grasos. La proteína Lpl (Lipoproteína lipasa) es una triglicérido hidrolasa crucial para el catabolismo de las VLDL y los quilomicrones y es expresada en el hígado bajo determinadas condiciones, a la vez que se incrementa como respuesta al aumento de TNF $\alpha$  en el hígado (Fruchard *et al.*, 2006). Diferentes estudios han puesto de manifiesto la relación inversa entre el contenido de Lpl y la concentración de TG plasmáticos (Wong *et al.*, 2002; Augustus *et al.*, 2003). En nuestro estudio los animales del grupo HL mostraron una sobreexpresión de ARNm de la proteína Lpl, hecho que está acompañado de una disminución plasmática de los TG con respecto al grupo HA (**Tabla 4.5**). Sin embargo, como en el presente estudio no se ha determinado la concentración de TNF $\alpha$  en el hígado y no se observaron diferencias significativas para este indicador de inflamación, en plasma o en ambos tipos de tejido adiposo analizado (**Tabla 4.8**), el incremento de la expresión de la Lpl podría estar asociado con otros factores, como es la acumulación de licopeno en el hígado. En el grupo HA se observa una sobreexpresión de la proteína HSL (lipasa sensible a hormonas) codificada por el gen Lipe, lo que nos indicaría un incremento del metabolismo lipídico gracias a la hidrólisis de una variedad de ésteres (Fernández *et al.*, 2011). Por el contrario, hay que destacar que el ARNm de Gdp2 (Glicerol-3- fosfato deshidrogenasa 2), enzima que juega un papel importante en la síntesis de TG (Lee *et al.*, 2013) sólo estuvo incrementada en el grupo HA, lo cual se correlaciona con los valores de TG encontrados en el plasma de estos animales (**Tabla 4.5**).

El tercer grupo de genes que se vieron sobreexpresados estarían involucrados en los procesos de  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Las mitocondrias y los peroxisomas son los principales sitios de las células donde se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos; sin embargo hay otro tipo de oxidación de estos compuestos, como la  $\alpha$ - y  $\omega$ -oxidación, que tiene lugar en los microsomas, y es catalizada por proteínas de la familia del citocromo P450 4A (Gyamfi *et al.*, 2010). Cuando los ácidos grasos circulantes alcanzan el hígado son transportados al interior del citosol, donde miembros de la familia de las acil-CoA sintetasas (Acs) producen los acil-CoA derivados que son transportados al interior de la mitocondria y degradados por las acil-CoA deshidrogenasas (Acads). Ramírez-Torres *et al.*, 2012, han descrito que la sobreexpresión del mRNA de las Acad puede ser considerado un marcador de esteatosis debido al papel relevante que tienen estas enzimas en el metabolismo lipídico, lo que pondría en evidencia la presencia de un mayor contenido de grasa en el interior de las

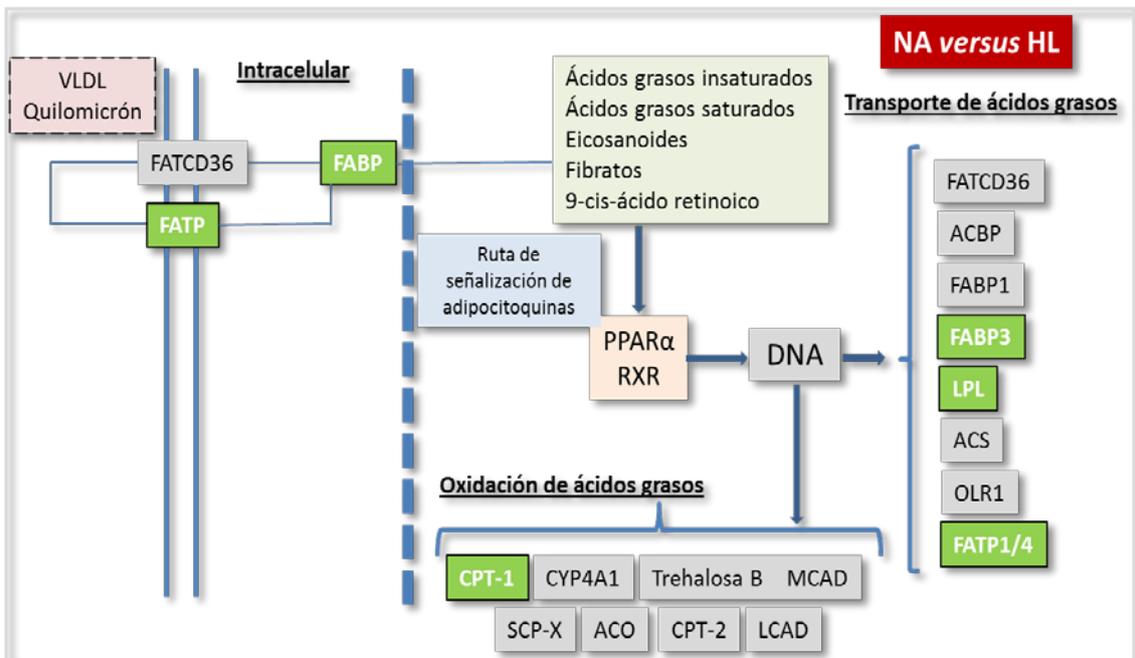
células. Por lo tanto, la sobreexpresión de las *Acad9*, *Acads*, *Acs15*, *Acsm2* and *Acsm4* en el hígado de las ratas el grupo HA, y la de *Acsm2* en el grupo HL (**Tabla 4.11**) sugiere un incremento del metabolismo lipídico asociado a la esteatosis, favoreciendo la incorporación de ácidos grasos en el interior de la mitocondria; y particularmente, en el grupo de animales que tomaron zumo de tomate, se ve incrementada la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, lo que estaría relacionado con el menor contenido de ácido  $\gamma$ -linolénico encontrado en el hígado de estos (**Tabla 4.6**). Además, mientras que los ácidos grasos de cadena corta y media tienen la capacidad de atravesar la membrana de la mitocondria por un proceso de difusión, los ácidos grasos de cadena larga requieren la participación de un transportador, la enzima *Cpt1* (Carnitina palmitoiltransferasa 1C), la cual permite la unión de los derivados acil-CoA a una molécula polar de carnitina, dando lugar a la formación de moléculas acil-carnitina que son transportadas hacia el interior de la mitocondria para ser incorporados al proceso de  $\beta$ -oxidación (Gyamfi *et al.*, 2010). A pesar de que Kohjima *et al.* 2007, han descrito una disminución en la expresión de la *Cpt1* en la esteatosis, este gen estuvo sobreexpresado en el grupo HL, es decir, que el consumo de zumo de tomate y la acumulación de licopeno en el hígado incrementa la expresión de esta enzima. Estos hallazgos concuerdan, además, con los resultados descritos anteriormente para los metabolitos hepáticos, ya que en este grupo de animales se observó un mayor contenido de carnitina (Bernal *et al.*, 2013), hecho que demuestra un mayor transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria. Además, si comparamos la expresión génica entre los grupos HA y HL (datos no mostrados), el único gen sobreexpresado en el grupo HL en comparación con el grupo HA fue el *Cpt1*, con una expresión relativa  $>2$  y un nivel de confianza del 90%. Estos resultados, junto con la regulación del gen *Mcee*, sugiere un incremento de la oxidación de los ácidos grasos a nivel mitocondrial, ya que la *Mcee* (Metilmalonil-CoA epimerasa) participa en la oxidación de los acil-CoA derivados, mejorando el catabolismo lipídico. Otras enzimas activadas en los estados de esteatosis son aquellas que intervienen en la oxidación extramitocondrial (Gyamfi *et al.*, 2010; Kohjima *et al.*, 2007), como son las *Acox2* (Acil-CoA oxidasa 2 de cadena ramificada) en el grupo HA, y *Acot8* (Acil-CoA tioesterasa) y *Pecr* (trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal) en el grupo HL (**Tabla 4.11**). La enzima *Acox2* está involucrada en la degradación de los ácidos grasos de cadena larga y facilita la oxidación mitocondrial. La *Acot8* es responsable de la actividad tioesterasa de los peroxisomas, mientras que la *Pecr*, tal y como se ha descrito anteriormente, transforma el dienil-CoA a trans-enoil-CoA, permitiendo la continuación de la  $\beta$ -oxidación en el interior de la mitocondria.

Finalmente, otros genes que también mostraron un cambio relativo en la expresión de forma significativa y superior a 2, fueron proteínas que participan en diferentes rutas de señalización. La Ppa1 (fosfatasa inorgánica) estuvo sobreexpresada en el grupo HA y su actividad está relacionada con la hidrólisis del pirofosfato inorgánico, un producto resultante de numerosas reacciones metabólicas, incluyendo el metabolismo lipídico, y cuyo incremento puede producirse en determinadas alteraciones patológicas (Tomonaga *et al.*, 2007). También, las Prka (proteína quinasas) activadas por AMP actúan en un amplio rango de rutas de señalización del metabolismo lipídico y de la inflamación (Bijland *et al.*, 2013); por lo tanto, era de esperar que sus niveles de ARNm estuvieran incrementados tanto en los animales del grupo HA como en los del grupo HL, debido a la esteatosis inducida por la dieta.

Aunque los resultados obtenidos anteriormente han mostrado que no hay diferencias significativas en la concentración de los ácidos grasos en el hígado asociado a la ingesta de zumo de tomate y a la acumulación de licopeno en el hígado, los resultados de expresión génica demuestran que la presencia de este carotenoide en la dieta y en el hígado parece incrementar la actividad de las enzimas involucradas en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias y los peroxisomas en estado de esteatosis, haciendo esta ruta metabólica más eficiente. Una posible explicación del mecanismo de actuación del licopeno sería la activación de factores de transcripción nuclear PPAR $\alpha$  (receptor activado por proliferadores peroxisomales), que son activados por la grasa presente en la dieta, aunque también se ha descrito que puede ser activado por el licopeno (Palozza *et al.*, 2011). Representando los datos obtenidos en la expresión génica y viendo su participación en las diferentes rutas de señalización podemos observar en las **Figuras 4.10 y 4.11**, cómo algunos de los genes en los que hemos observado una sobreexpresión forman parte de la ruta de señalización de los PPAR, lo que nos indica que el consumo de licopeno puede activar esta ruta, al detectarse una mayor activación de genes involucrados en el metabolismo lipídico en el grupo HL que en el grupo HA. Estos resultados demuestran que el tomate y los productos derivados pueden ser tenidos en cuenta en las estrategias dietéticas del tratamiento de la esteatosis.



**Figura 4.10.** Sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, en la ruta de señalización de los PPAR, en las ratas con esteatosis inducida con la dieta alta en grasa.



**Figura 4.11.** Sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, en la ruta de señalización de los PPAR, en las ratas con esteatosis inducida por la dieta alta en grasa y alimentadas conjuntamente con zumo de tomate (grupo HL).

#### 4.2.7. Biomarcadores de origen peptídico

##### *Resultados del análisis estadístico*

Los modelos para predecir simultáneamente los 4 tratamientos experimentales durante las 4 semanas (un total de 16 grupos) fueron muy pobres en su capacidad predictiva. El mejor modelo en este grupo fue el de 15 componentes (uno menos del máximo posible) y 50 péptidos (el límite superior arbitrario impuesto por diseño nuestro) con una tasa de error media, de los 5 mejores modelos, del 77.8 %, es decir, casi un 80% de los animales experimentales fueron atribuidos a un grupo al que no pertenecían. Sin embargo, cuando los modelos se realizaron separando semana por semana, se obtuvieron menores tasas de error en los modelos basados en 3 grupos (N, HA y HL), resultado de unir los grupos NA y NL, que en los basados en 4 grupos (NA, NL, HA y HL) (**Tabla 4.12**).

**Tabla 4.12.** Tasa de error promedio de los cinco mejores modelos de clasificación basados en sPLS-DA para una clasificación de 3 y 4 grupos, semana por semana

|                        | 4 grupos    | 3 grupos    |
|------------------------|-------------|-------------|
| <b><i>Semana 1</i></b> | <b>0.55</b> | <b>0.25</b> |
| <b><i>Semana 2</i></b> | <b>0.35</b> | <b>0.17</b> |
| <b><i>Semana 3</i></b> | <b>0.40</b> | <b>0.16</b> |
| <b><i>Semana 4</i></b> | <b>0.31</b> | <b>0.17</b> |

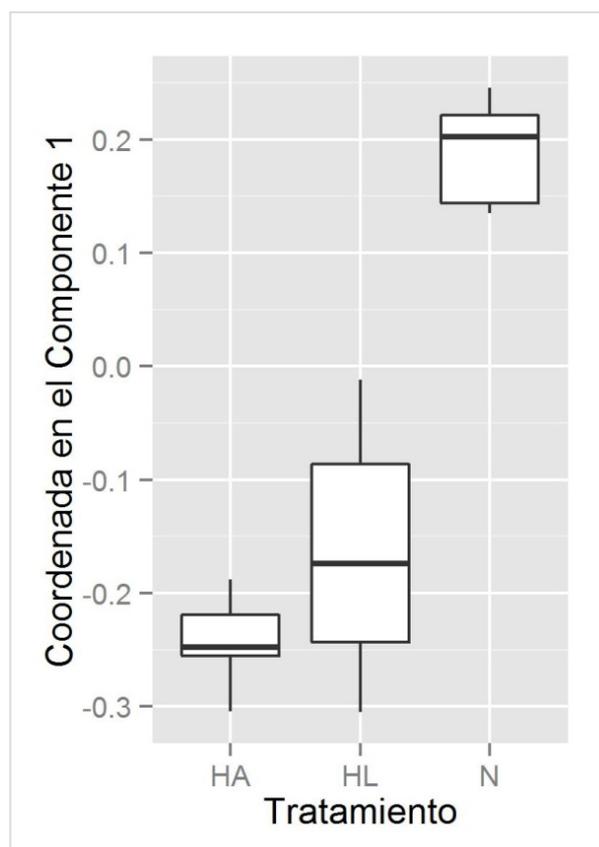
A partir de estos resultados preliminares, el trabajo de identificación de biomarcadores se realizó sobre la clasificación en tres grupos semana por semana. La complejidad de los mejores modelos medida como el número de componentes y el número de variables de estos modelos varió considerablemente semana por semana, tal y como se muestra en la **Tabla 4.13**.

**Tabla 4.13.** Componentes, variables y tasa de error de los cinco mejores modelos de la clasificación de tres grupos (N, HA y HL) en las cuatro semanas de estudio.

| <i>Semana</i> | <i>Componentes</i> | <i>Variables</i> | <i>Tasa de error</i> |
|---------------|--------------------|------------------|----------------------|
| 1             | 1                  | 21               | 0.24                 |
| 1             | 1                  | 13               | 0.25                 |
| 1             | 1                  | 23               | 0.26                 |
| 1             | 1                  | 25               | 0.26                 |
| 1             | 1                  | 27               | 0.26                 |
| 2             | 2                  | 50               | 0.17                 |
| 2             | 2                  | 44               | 0.17                 |
| 2             | 2                  | 37               | 0.17                 |
| 2             | 2                  | 41               | 0.17                 |
| 2             | 2                  | 45               | 0.17                 |
| 3             | 2                  | 14               | 0.15                 |
| 3             | 2                  | 9                | 0.17                 |
| 3             | 2                  | 11               | 0.17                 |
| 3             | 2                  | 15               | 0.17                 |
| 3             | 2                  | 20               | 0.17                 |
| 4             | 2                  | 1                | 0.13                 |
| 4             | 2                  | 3                | 0.18                 |
| 4             | 2                  | 4                | 0.18                 |
| 4             | 2                  | 2                | 0.18                 |
| 4             | 2                  | 5                | 0.19                 |

El número máximo de componentes necesario para distinguir los tres grupos es de dos. Las semanas 2 a 4 constan de modelos de 2 componentes, mientras que en la semana 1 los mejores modelos sólo tienen 1 componente. La mayor complejidad de los modelos en términos del número de variables (péptidos) necesarias para segregar los grupos se da en la semana 2, con entre 37 y 50 péptidos por modelo. La semana 1 tiene de 13 a 25 péptidos, la semana 3 de 9 a 20 y la semana 4 de 1 a 5 (**Tabla 4.13**).

El modelo para la semana 1 consta de un solo componente. Esto quiere decir que los tres grupos son segregables a lo largo de un solo gradiente de perfil peptídico. En la **Figura 4.12** se muestra el diagrama de caja de las coordenadas en el componente 1. Los animales con dieta estándar (grupo N) se encuentran en el extremo positivo del gradiente, mientras que los animales con dieta alta en grasa (HA y HL) se encuentran en la parte negativa. Sin embargo, hay que destacar que los que ingieren zumo de tomate (HL) se encuentran en una posición intermedia entre los de dieta normal y los de dieta alta en grasa sin suplemento de zumo (HA).



**Figura 4.12.** Representación en un solo componente de los tres grupos experimentales en la semana 1.

Un total de 27 péptidos aparecen en al menos uno de los 5 mejores modelos para la semana 1, pero sólo 12 cumplen el criterio de selección (valor absoluto de carga  $\geq 0.15$ ). Los péptidos con carga alta, es decir, los que tienen una correlación relativamente alta con el gradiente que segrega los grupos experimentales, son muy constantes, tanto en presencia en los cinco modelos como en la carga en cada modelo. Hay 8 péptidos con cargas superiores a 0.15 (positivo) lo que quiere decir que tienen niveles altos en los animales de dieta normal y 4 péptidos con cargas inferiores a -0.15 (negativa) (Tabla 4.14) y por tanto, tendrán niveles elevados sobre todo en los animales experimentales con dieta alta en grasa y sin suplemento de zumo de tomate (HA) (Figura 4.12).

Las Tablas 4.14, 4.15 y 4.16 indican la selección de péptidos con carga igual o superior a 0.15 hallada en al menos uno de los 5 mejores modelos (MM) a lo largo de las 4 semanas analizadas. En las Figuras 4.13, 4.14 y 4.15 se muestra la evolución de los gradientes que segregan los grupos en función de sus perfiles peptídicos en las semanas 2 a 4. Si en la primera semana un solo gradiente es suficiente para segregar los tres grupos con N y HA en un extremo

y HL en una posición intermedia (pero más cercano a HA), en las siguientes semanas las diferencias entre grupos se describen mejor con dos gradientes (componentes). En todos los casos, el primer componente (abscisas, X) segrega los animales experimentales de dieta normal de los de dieta alta en grasa y el segundo gradiente (ordenadas, Y) segrega los animales experimentales de dieta alta en grasa y agua (HA) de aquellos que reciben la misma dieta y zumo de tomate (HL).

**Tabla 4.14.** Selección de péptidos con carga igual o superior a 0.15 en al menos uno de los 5 mejores modelos (MM1-5) durante la semana 1

| Semana | Componente | ID Péptido | MM1   | MM2   | MM3   | MM4   | MM5   |
|--------|------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1      | 1          | 7035       | 0,41  | 0,48  | 0,41  | 0,39  | 0,38  |
| 1      | 1          | 10615      | 0,38  | 0,43  | 0,38  | 0,37  | 0,35  |
| 1      | 1          | 13476      | 0,34  | 0,37  | 0,34  | 0,33  | 0,32  |
| 1      | 1          | 13640      | -0,34 | -0,36 | -0,34 | -0,33 | -0,32 |
| 1      | 1          | 17766      | 0,34  | 0,36  | 0,34  | 0,33  | 0,32  |
| 1      | 1          | 7744       | -0,30 | -0,30 | -0,30 | -0,29 | -0,29 |
| 1      | 1          | 14576      | 0,25  | 0,22  | 0,25  | 0,25  | 0,25  |
| 1      | 1          | 13862      | 0,22  | 0,17  | 0,22  | 0,22  | 0,22  |
| 1      | 1          | 11124      | -0,21 | -0,15 | -0,21 | -0,21 | -0,22 |
| 1      | 1          | 10647      | -0,14 | -0,05 | -0,15 | -0,16 | -0,17 |
| 1      | 1          | 13451      | 0,13  | 0,02  | 0,13  | 0,14  | 0,15  |
| 1      | 1          | 11115      | 0,12  | 0,02  | 0,13  | 0,14  | 0,15  |

Respecto a la semana 2, la cantidad de péptidos se eleva bastante en comparación con el resto de semanas. Sin embargo, atendiendo al criterio de selección mencionado anteriormente (carga igual o superior a 0.15), se hallaron un total de 29 péptidos distribuidos entre los dos componentes (**Tabla 4.15**). En el componente 1 (que distingue entre dieta alta en grasa y dieta estándar) se detectaron 3 péptidos con carga positiva y por tanto se encuentran principalmente en los grupos HA y HL, y 11 con carga negativa, por lo que presentan niveles más elevados en el grupo N. En el componente 2, que distingue entre ingesta de zumo o de agua, hay 8 péptidos con carga negativa y por tanto, con mayor abundancia en el grupo HL y 7 con carga positiva, por lo que presentaban niveles más elevados en el grupo HA, encontrándose el grupo N en una situación intermedia entre ambos (**Figura 4.13**).

En la semana 3, se detectaron 18 péptidos según el criterio de selección (**Tabla 4.16**), repartidos equitativamente en los componentes 1 y 2. En el componente 1, 8 péptidos presentan una carga positiva y por tanto, se hallan con mayor abundancia en el grupo HL

(Figura 4.14) y 1 péptido tiene carga negativa, por lo que se encuentra principalmente en el grupo HA. El grupo N se encuentra en una situación intermedia entre ambos.

Finalmente, en la semana 4 se seleccionan únicamente 2 péptidos con una carga superior a 0.15 (Tabla 4.16). En el componente 1 encontramos 1 péptido con carga negativa y por tanto, sus niveles serán más elevados en el grupo N, y en el componente 2 encontramos otro péptido con carga negativa por lo que, en este caso tendrá niveles más elevados en el grupo HL (Figura 4.15).

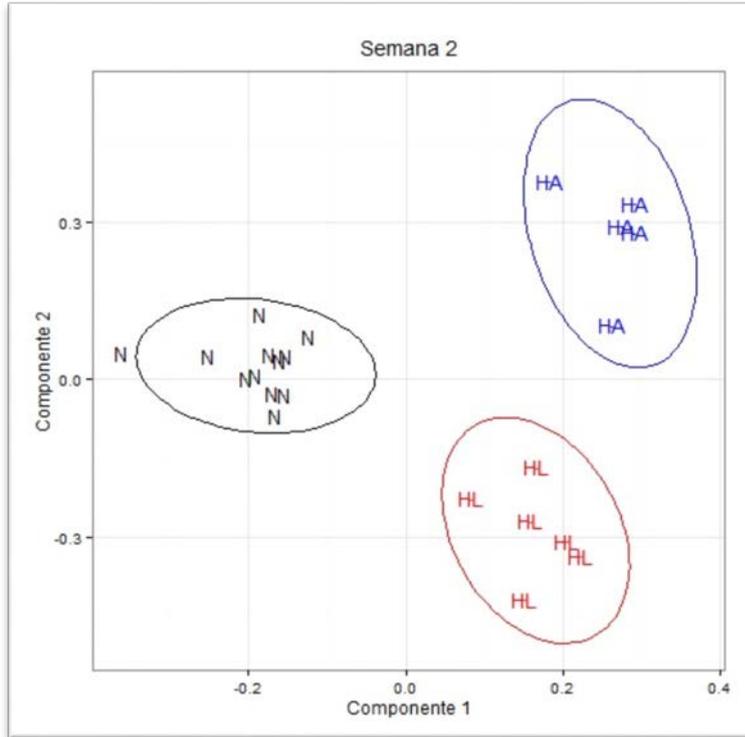
**Tabla 4.15.** Selección de péptidos con carga igual o superior a 0.15 en al menos uno de los 5 mejores modelos (MM1-5) durante la semana 2.

| Semana | Componentes | ID Péptido | MM1    | MM2    | MM3    | MM4    | MM5    |
|--------|-------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 2      | 1           | 10013      | -0.365 | -0.382 | -0.396 | -0.387 | -0.378 |
| 2      | 1           | 13862      | -0.349 | -0.364 | -0.377 | -0.369 | -0.361 |
| 2      | 1           | 14941      | -0.313 | -0.325 | -0.335 | -0.329 | -0.323 |
| 2      | 1           | 8057       | -0.287 | -0.296 | -0.303 | -0.299 | -0.294 |
| 2      | 1           | 24835      | 0.234  | 0.239  | 0.241  | 0.240  | 0.238  |
| 2      | 1           | 17689      | -0.234 | -0.239 | -0.241 | -0.240 | -0.238 |
| 2      | 1           | 11667      | -0.213 | -0.216 | -0.216 | -0.216 | -0.215 |
| 2      | 1           | 9863       | -0.208 | -0.210 | -0.210 | -0.210 | -0.210 |
| 2      | 1           | 10377      | -0.203 | -0.204 | -0.204 | -0.204 | -0.204 |
| 2      | 1           | 17855      | 0.181  | 0.180  | 0.178  | 0.180  | 0.181  |
| 2      | 1           | 9540       | -0.177 | -0.176 | -0.174 | -0.175 | -0.176 |
| 2      | 1           | 12640      | -0.171 | -0.169 | -0.166 | -0.168 | -0.170 |
| 2      | 1           | 13476      | -0.168 | -0.166 | -0.163 | -0.165 | -0.167 |
| 2      | 1           | 14976      | 0.158  | 0.155  | 0.151  | 0.153  | 0.155  |
| 2      | 2           | 13429      | -0.377 | -0.380 | -0.389 | -0.389 | -0.380 |
| 2      | 2           | 13543      | -0.303 | -0.309 | -0.317 | -0.316 | -0.308 |
| 2      | 2           | 15097      | 0.269  | 0.278  | 0.287  | 0.284  | 0.276  |
| 2      | 2           | 7243       | 0.265  | 0.276  | 0.286  | 0.282  | 0.274  |
| 2      | 2           | 8984       | -0.258 | -0.257 | -0.259 | -0.260 | -0.258 |
| 2      | 2           | 2712       | -0.243 | -0.242 | -0.242 | -0.244 | -0.243 |
| 2      | 2           | 4970       | 0.239  | 0.247  | 0.253  | 0.251  | 0.245  |
| 2      | 2           | 9955       | 0.224  | 0.232  | 0.239  | 0.236  | 0.231  |
| 2      | 2           | 10240      | -0.218 | -0.213 | -0.210 | -0.212 | -0.214 |
| 2      | 2           | 11153      | 0.214  | 0.225  | 0.233  | 0.229  | 0.223  |
| 2      | 2           | 10124      | 0.208  | 0.213  | 0.217  | 0.215  | 0.212  |
| 2      | 2           | 4768       | -0.179 | -0.177 | -0.174 | -0.175 | -0.177 |
| 2      | 2           | 20632      | -0.165 | -0.154 | -0.143 | -0.148 | -0.156 |
| 2      | 2           | 15844      | 0.161  | 0.167  | 0.168  | 0.166  | 0.166  |
| 2      | 2           | 4524       | -0.153 | -0.142 | -0.132 | -0.137 | -0.144 |

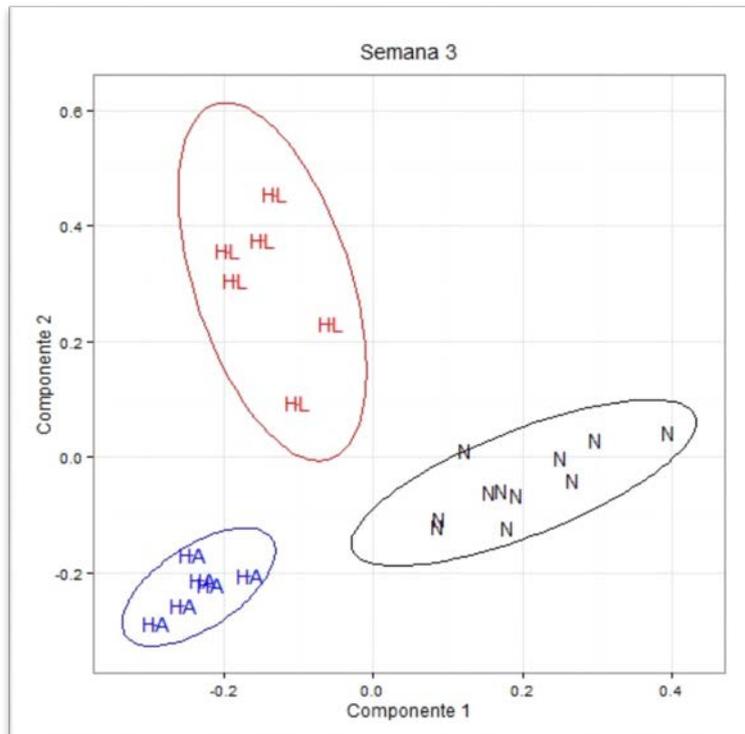
**Tabla 4.16.** Selección de péptidos con carga igual o superior a 0.15 en al menos uno de los 5 mejores modelos (MM1-5) durante las semanas 3 y 4

| Semana | Componentes | ID Péptido | MM1    | MM2    | MM3    | MM4    | MM5    |
|--------|-------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 3      | 1           | 13476      | 0.469  | 0.676  | 0.660  | 0.452  | 0.385  |
| 3      | 1           | 14544      | -0.348 | -0.386 | -0.386 | -0.343 | -0.315 |
| 3      | 1           | 10648      | 0.318  | 0.312  | 0.316  | 0.315  | 0.297  |
| 3      | 1           | 8116       | 0.316  | 0.308  | 0.313  | 0.314  | 0.296  |
| 3      | 1           | 13451      | 0.307  | 0.286  | 0.292  | 0.305  | 0.291  |
| 3      | 1           | 17002      | 0.302  | 0.275  | 0.282  | 0.301  | 0.288  |
| 3      | 1           | 14576      | 0.269  | 0.196  | 0.207  | 0.271  | 0.269  |
| 3      | 1           | 16532      | 0.211  | 0.056  | 0.075  | 0.218  | 0.235  |
| 3      | 1           | 17766      | 0.206  | 0.044  | 0.064  | 0.214  | 0.232  |
| 3      | 2           | 13970      | 0.522  | 0.571  | 0.538  | 0.518  | 0.498  |
| 3      | 2           | 19332      | 0.516  | 0.567  | 0.534  | 0.512  | 0.492  |
| 3      | 2           | 4486       | 0.491  | 0.540  | 0.512  | 0.488  | 0.469  |
| 3      | 2           | 8197       | -0.247 | -0.186 | -0.234 | -0.250 | -0.257 |
| 3      | 2           | 5870       | 0.209  | 0.125  | 0.188  | 0.212  | 0.225  |
| 3      | 2           | 21145      | 0.179  | 0.077  | 0.152  | 0.183  | 0.201  |
| 3      | 2           | 18962      | 0.152  | 0.044  | 0.125  | 0.156  | 0.176  |
| 3      | 2           | 17050      | 0.151  | 0.042  | 0.124  | 0.155  | 0.174  |
| 3      | 2           | 5198       | 0.137  | 0.027  | 0.110  | 0.142  | 0.163  |
| 4      | 1           | 6975       | -1.000 | -0.919 | -0.879 | -0.926 | -0.852 |
| 4      | 2           | 11644      | -1.000 | -0.942 | -0.878 | -0.958 | -0.855 |

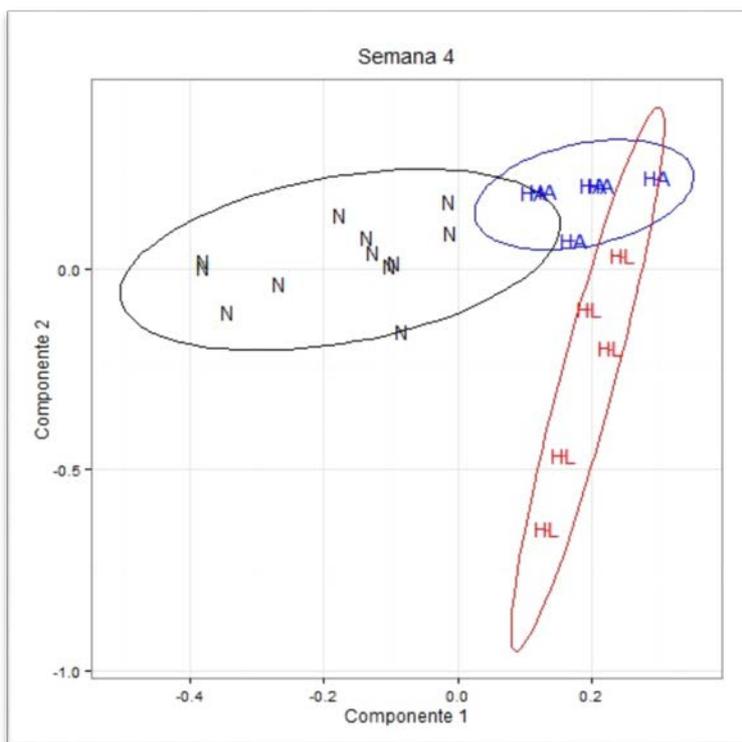
Los resultados en el perfil peptídico muestran que hay una interesante evolución a lo largo de las semanas 2 a 4. El grupo HA siempre es el más compacto, con menos variabilidad interna; en cambio los grupos N y HL se van haciendo progresivamente más variables internamente como muestra claramente la elongación de sus respectivas elipses del intervalo de confianza al 95% del centroide del grupo. Esta elongación se produce sobre todo a lo largo del Componente 1 para el grupo N y del Componente 2 para el grupo HL (**Figuras 4.13, 4.14 y 4.15**).



**Figura 4.13.** Evolución de los gradientes que separan a los grupos N, HA y HL en función de su perfiles peptídicos en la semana 2



**Figura 4.14.** Evolución de los gradientes que separan a los grupos N, HA y HL en función de su perfiles peptídicos en la semana 3.



**Figura 4.15.** Evolución de los gradientes que separan a los grupos N, HA y HL en función de su perfiles peptídicos en la semana 4.

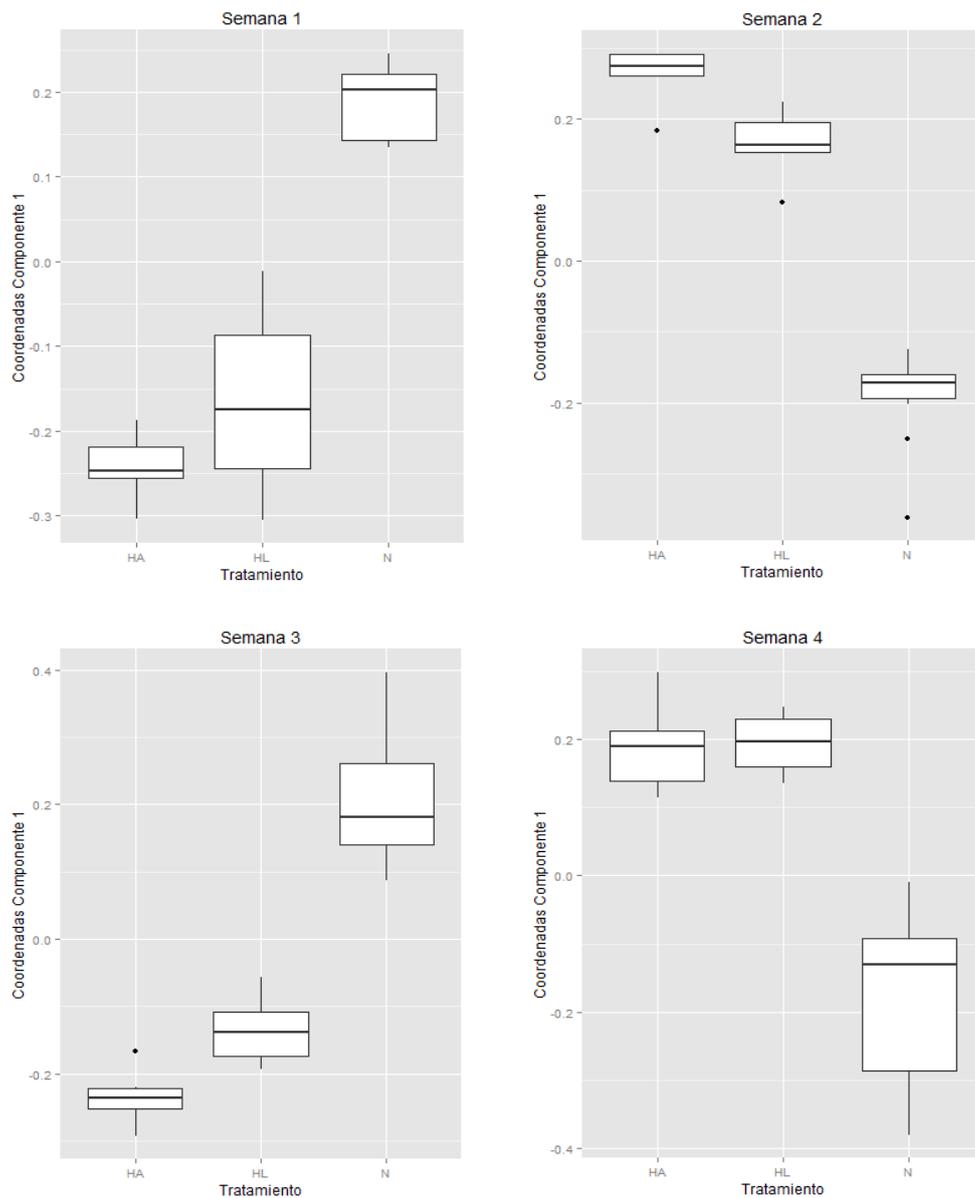
### **Resultados selección de biomarcadores de origen peptídico**

Las muestras de orina analizadas para el estudio de biomarcadores de origen peptídico se recogieron semanalmente desde el inicio del tratamiento hasta el final, obteniendo datos de un total de 4 semanas. Tras el análisis estadístico de los datos mediante la técnica sPLS-DA (*sparse partial least squares-discriminant analysis*) se observó que los grupos NA y NL presentaban un perfil peptídico muy similar (**Figura 4.17**), es decir, que este método no predijo la clasificación de los individuos como pertenecientes a dos grupos diferentes con tratamientos diferentes sino que lo hacía como parte del mismo grupo. Por este motivo, las muestras de los grupos NA y NL fueron tratadas como un único grupo (N). Por tanto, el tratamiento estadístico fue realizado comparando únicamente entre tres grupos: N, HA y HL. La **Figura 4.18** muestra la evolución de los perfiles peptídicos de los tres grupos (N, HA y HL) a lo largo del periodo de estudio. En esta figura se puede observar cómo el perfil peptídico del grupo HL presenta cierto parecido al del grupo control, por lo que dichos resultados sugieren que la ingesta de zumo de tomate podría influir en los mecanismos fisiopatológicos de la NAFLD en estos animales, aproximándose hacia un estado más similar al del grupo control. Esta tendencia también se observa cuando se analiza el gradiente de los tres grupos de estudio (N, HA y HL) en un solo componente (**Figura 4.16**), especialmente de la semana 1 a la semana 3.

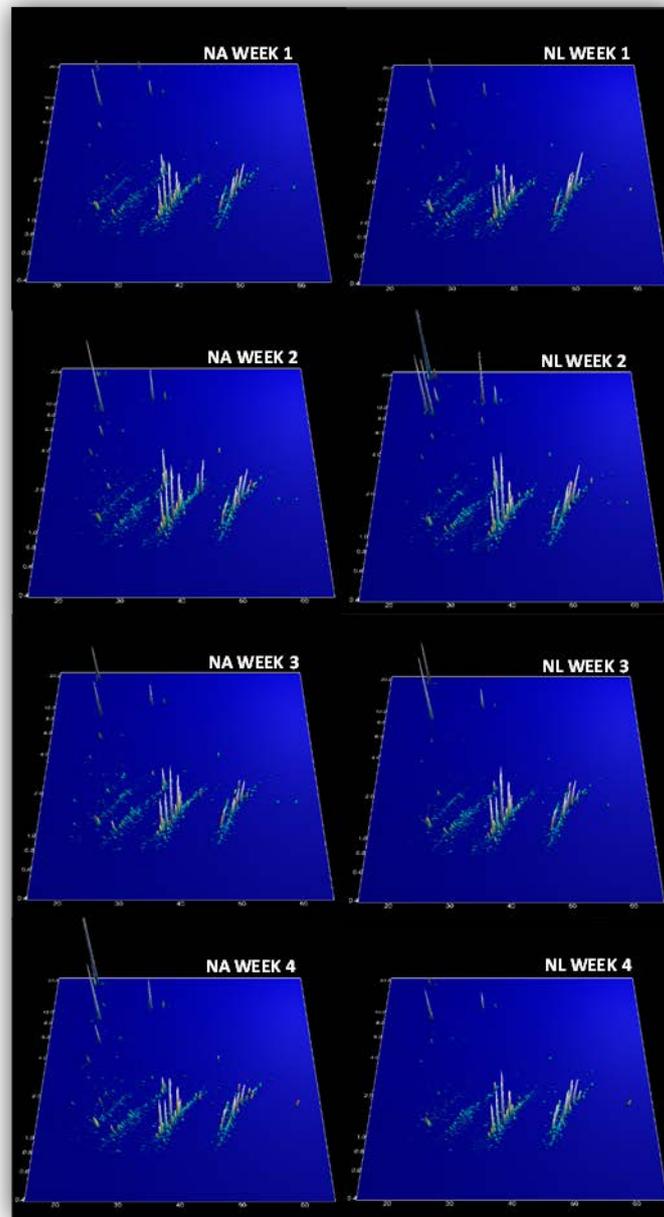
La técnica sPLS-DA, la cual permite una adecuada selección de las variables/péptidos (Lê Cao *et al.*, 2011), se llevó a cabo comparando los tres grupos dentro de cada semana, ya que estos modelos producían una tasa de error menor. De los 800 péptidos obtenidos inicialmente tras el análisis de las muestras, únicamente 61 péptidos cumplieron con los criterios establecidos en la sección de métodos para ser considerados interesantes como biomarcadores (**Tabla 4.17**), es decir, predicen mejor la pertenencia de los individuos a un grupo u otro. Además, estos péptidos seleccionados también cumplen el criterio de frecuencia empleado como criterio de selección, es decir, al menos uno de los grupos de estudio presentó ese péptido en un 30% de las muestras (Mullen *et al.*, 2011).

La **Tabla 4.17** muestra los 61 péptidos seleccionados a lo largo de las 4 semanas analizadas, los cuales van cambiando durante ese periodo y algunos de ellos pueden hallarse en más de una semana. De hecho, ese fue el caso de 5 péptidos: 13451 (semanas 1 y 3), 13476 (semanas 1, 2 y 3), 13862 (semanas 1 y 2), 14576 (semanas 1 y 3) y 17766 (semanas 1 y 3). De este modo, realmente habría un total de 55 péptidos diferentes. En dicha tabla se pueden

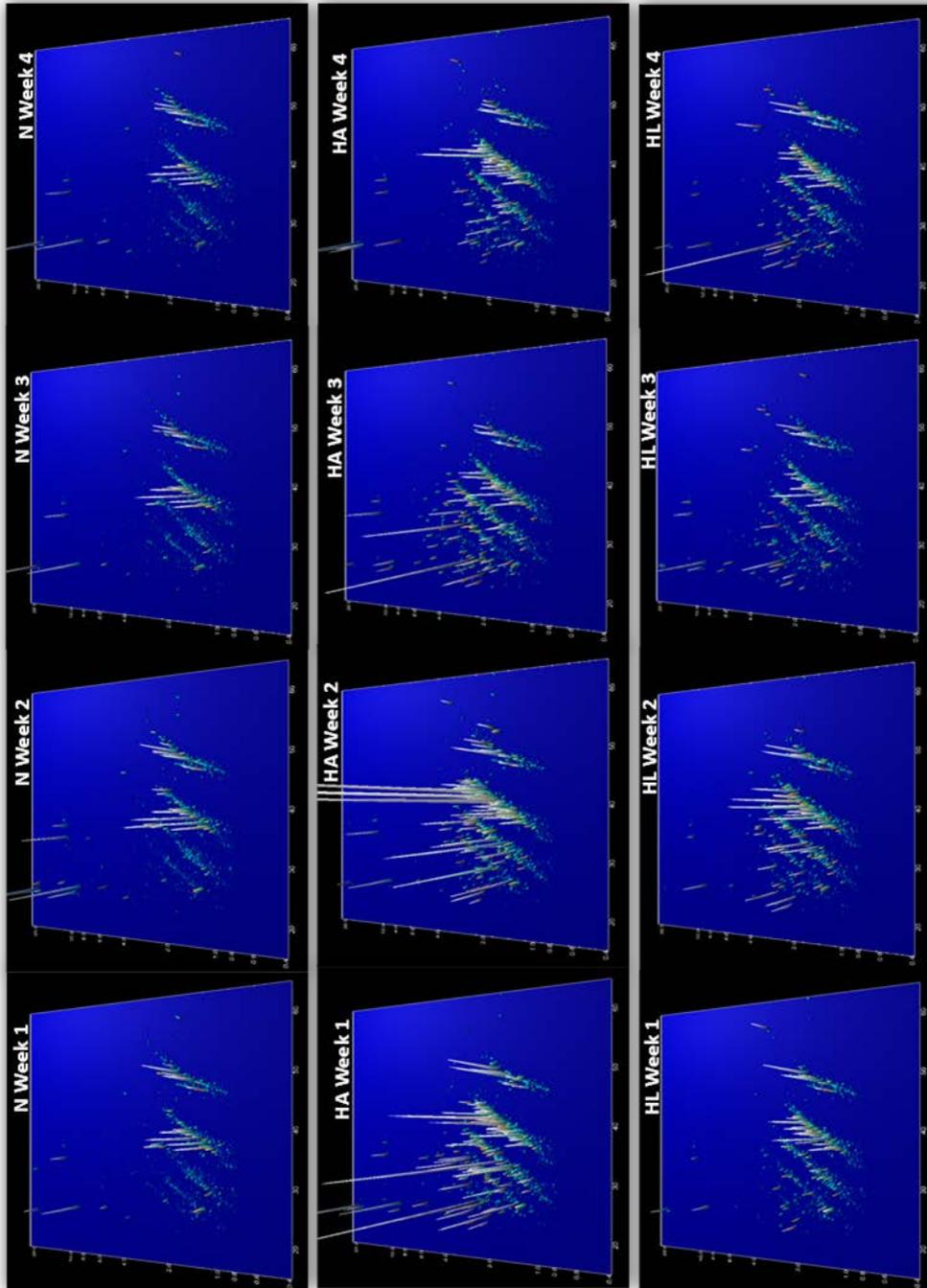
encontrar los valores de abundancia relativa media del péptido en cada uno de los grupos, así como la frecuencia y el nombre de la proteína a la que pertenece. También aparece reflejado el *fold change* de los grupos HA y HL, es decir, las veces que cambian los valores de abundancia relativa media de estos grupos, tanto por encima como por debajo (valores positivos y negativos, respectivamente) con respecto al grupo N.



**Figura 4.16.** Representación del gradiente de los grupos N, HA y HL a lo largo de las 4 semanas en un solo componente.



**Figura 4.17.** Datos del perfil proteómico de las muestras de orina procedentes de los grupos NA y NL a lo largo del periodo de estudio. En el eje X se representa el tiempo de migración CE (min), el eje Y muestra la masa molecular (KDa) a escala logarítmica y el eje Z representa la media de la señal de intensidad del péptido.



**Figura 4.18.** Datos del perfil proteómico de las muestras de orina procedentes de los grupos N, HA y HL a lo largo del periodo de estudio. En el eje X se representa el tiempo de migración CE (min), el eje Y muestra la masa molecular (kDa) a escala logarítmica y el eje Z representa la media de la señal de intensidad del péptido.

**Tabla 4.17. 61 Péptidos con mayor poder discriminante entre grupos (N, HA y HL) a lo largo de las cuatro semanas. na: no aplicable.**

| Semana | ID Péptido | Masa (Da) | Tiempo (CE) | Secuencia             | Nombre de la proteína                                       | Media Grupo N |       | Frec. Grupo |       | Media Grupo |       | Frec. Grupo |       | Fold Change |    |
|--------|------------|-----------|-------------|-----------------------|---|---------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|----|
|        |            |           |             |                       |   | N             | HL    | HA          | HL    | HA          | HL    | HA          | HL    |             |    |
| 2      | 10124      | 1396.7    | 31.8        | SRLAPLAEGVQEK         | Apolipoprotein A-IV   | 132.4         | 66.7  | 378.2       | 80.0  | 254.3       | 16.7  | 2.86        | 1.92  | na          | na |
| 2      | 17855      | 2096.1    | 35.8        | FQDKLGNINTYADDLONK    | Apolipoprotein A-IV precursor                               | 0.0           | 0.0   | 1731.4      | 100.0 | 642.7       | 100.0 | na          | na    | na          | na |
| 2      | 9540       | 1354.6    | 48.8        | EPGTTGPpGTAGPQG       | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 1212.4        | 100.0 | 382.3       | 40.0  | 697.7       | 50.0  | -3.17       | -1.74 | na          | na |
| 2      | 12640      | 1584.8    | 34.0        | DGQPGAKGpGDTGVKG      | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 323.8         | 100.0 | 101.6       | 100.0 | 120.8       | 66.7  | -3.19       | -2.68 | na          | na |
| 2      | 13476      | 1652.8    | 40.9        | GEpGpGQTGPAGSRGPA     | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 541.2         | 91.7  | 304.1       | 20.0  | 0.0         | 0.0   | -1.78       | na    | na          | na |
| 2      | 14976      | 1799.9    | 41.5        | PPTGPFVPPDLFLK        | Proline-rich protein  | 441.3         | 83.3  | 51010.5     | 100.0 | 14119.9     | 100.0 | 115.59      | 32.00 | na          | na |
| 2      | 4768       | 1051.5    | 36.5        | TGVKGDAGPPGP          | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 134.6         | 100.0 | 106.8       | 60.0  | 220.0       | 100.0 | -1.26       | 1.63  | na          | na |
| 2      | 20632      | 2428.3    | 26.6        | DGILGRDTPHEDQKGRQLHS  | Contrapsin-like protease inhibitor 1 precursor              | 84.2          | 16.7  | 254.8       | 80.0  | 983.1       | 100.0 | 3.03        | 11.68 | na          | na |
| 2      | 15844      | 1887.9    | 40.9        | AKALYQAEAFADFQOS      | Contrapsin-like protease inhibitor 6 precursor              | 62.1          | 33.3  | 450.6       | 80.0  | 135.7       | 16.7  | 7.25        | 2.18  | na          | na |
| 2      | 4524       | 1035.5    | 35.6        | GPpGPEGKGA            | Collagen alpha-1(III) chain                                 | 461.9         | 58.3  | 471.4       | 60.0  | 896.5       | 100.0 | 1.02        | 1.94  | na          | na |
| 3      | 13476      | 1652.8    | 40.9        | GEpGpGQTGPAGSRGPA     | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 624.1         | 100.0 | 171.8       | 33.3  | 192.1       | 50.0  | -3.63       | -3.25 | na          | na |
| 3      | 14544      | 1756.9    | 41.9        | GNFIDQTRVNLNLPIT      | Uromodulin  | 0.0           | 0.0   | 2190.6      | 100.0 | 976.5       | 100.0 | na          | na    | na          | na |
| 3      | 10648      | 1435.7    | 39.6        | SpGSPGDGKTGPpGP       | Collagen alpha-1(I) chain precursor                         | 1141.3        | 100.0 | 147.2       | 16.7  | 0.0         | 0.0   | -7.75       | na    | na          | na |
| 3      | 8116       | 1263.6    | 32.3        | ISSDLGDHPVK           | Transketolase   | 392.6         | 100.0 | 66.1        | 50.0  | 104.0       | 100.0 | -5.94       | -3.77 | na          | na |
| 3      | 13451      | 1649.8    | 41.3        | TDVTOQLNLFQDK         | Apolipoprotein A-IV   | 1740.8        | 100.0 | 509.9       | 100.0 | 922.7       | 100.0 | -3.41       | -1.89 | na          | na |
| 3      | 17002      | 2008.0    | 31.2        | DGESGRpGpGERGLpPpG    | Collagen alpha-1(III) chain                                 | 507.3         | 100.0 | 68.9        | 33.3  | 136.2       | 100.0 | -7.36       | -3.72 | na          | na |
| 3      | 14576      | 1759.9    | 34.0        | SADTLWDIQDLKDL        | L-lactate dehydrogenase B chain                             | 683.8         | 100.0 | 31.0        | 16.7  | 150.3       | 83.3  | -22.03      | -4.55 | na          | na |
| 3      | 16532      | 1960.0    | 35.5        | RpGEVGPpGpPAGEKGSpG   | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 170.7         | 100.0 | 0.0         | 0.0   | 97.1        | 50.0  | na          | -1.76 | na          | na |
| 3      | 17766      | 2088.1    | 36.3        | AGRpGEVGPpGpPAGEKGSpG | Collagen alpha-1(I) chain precursor                         | 164.6         | 100.0 | 20.0        | 16.7  | 79.9        | 50.0  | -8.22       | -2.06 | na          | na |
| 3      | 13970      | 1702.0    | 22.8        | ELEKETKTKDp           | Alpha-1-acid glycoprotein precursor                         | 0.0           | 0.0   | 75.3        | 50.0  | 303.6       | 100.0 | na          | na    | na          | na |
| 3      | 19332      | 2260.0    | 26.3        | MADEAAEAHQEGDTRTRKRG  | Fibrinogen alpha chain precursor                            | 28.4          | 9.1   | 10.6        | 16.7  | 47.4        | 83.3  | -2.69       | 1.67  | na          | na |
| 3      | 4486       | 1032.5    | 36.9        | pGpGPRGpG             | Collagen alpha-1(XVII) chain                                | 12.4          | 36.4  | 8.1         | 16.7  | 21.3        | 83.3  | -1.52       | 1.72  | na          | na |
| 3      | 8197       | 1269.6    | 39.2        | GpGGAAGRTGPpGP        | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 30.4          | 45.5  | 130.6       | 83.3  | 13.9        | 50.0  | 4.30        | -2.19 | na          | na |
| 3      | 5870       | 1124.6    | 30.8        | DLEDVAGHGGR           | Cd99 protein  | 10.5          | 9.1   | 0.0         | 0.0   | 21.0        | 50.0  | na          | 1.99  | na          | na |
| 3      | 21145      | 2497.4    | 38.7        | DLPGQpVSEQAQKLPPLALK  | Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 2 | 34.6          | 9.1   | 71.2        | 33.3  | 161.9       | 83.3  | 2.06        | 4.69  | na          | na |
| 3      | 18962      | 2216.1    | 26.6        | DHGKELSSSLGpALVDKAPAK | Similar to CG7896-PA  | 0.0           | 0.0   | 22.4        | 33.3  | 36.1        | 83.3  | na          | na    | na          | na |
| 3      | 17050      | 2013.0    | 36.7        | DEQYPDATEDLTSRMK      | Osteopontin precursor                                       | 26.9          | 54.5  | 58.8        | 33.3  | 57.7        | 100.0 | 2.19        | 2.15  | na          | na |
| 3      | 5198       | 1079.5    | 47.6        | GpGpGpGpGTA           | Collagen alpha-1(III) chain                                 | 9.2           | 63.6  | 0.0         | 0.0   | 15.0        | 66.7  | na          | 1.62  | na          | na |
| 4      | 6975       | 1194.6    | 37.7        | SpGPDGKTGPpGP         | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 12172.0       | 100.0 | 6619.6      | 100.0 | 6543.0      | 100.0 | -1.84       | -1.86 | na          | na |
| 4      | 11644      | 1509.8    | 27.3        | GLpGpKDRGDGpK         | Collagen alpha-1(I) chain precursor                         | 52.9          | 83.3  | 50.7        | 16.7  | 187.6       | 100.0 | -1.04       | 3.55  | na          | na |

Tabla 4.17. Continuación

| Semana | ID Péptido | Masa (Da) | Tiempo (CE) | Secuencia              | Nombre de la proteína                                       | Media Grupo N |         | Frec. Grupo N |       | Media Grupo HA |       | Frec. Grupo HA |       | Media Grupo HL |       | Frec. Grupo HL |    | Fold Change |    |
|--------|------------|-----------|-------------|------------------------|---|---------------|---------|---------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|----|-------------|----|
|        |            |           |             |                        |   | N             | HL      | N             | HL    | N              | HL    | N              | HL    | HL             | HL    | HA             | HL | HA          | HL |
| 2      | 10124      | 1396.7    | 31.8        | SRLAPLAEGVQEK          | Apolipoprotein A-IV   | 132.4         | 254.3   | 66.7          | 16.7  | 378.2          | 80.0  | 254.3          | 16.7  | 2.86           | 1.92  | na             | na | na          | na |
| 2      | 17855      | 2096.1    | 35.8        | FODKLGINITYADDLQNK     | Apolipoprotein A-IV precursor                               | 0.0           | 642.7   | 0.0           | 100.0 | 1731.4         | 100.0 | 642.7          | 100.0 | na             | na    | na             | na | na          | na |
| 2      | 9540       | 1354.6    | 48.8        | EpGITTPpGTAGPQG        | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 1212.4        | 697.7   | 100.0         | 50.0  | 382.3          | 40.0  | 697.7          | 50.0  | -3.17          | -1.74 | na             | na | na          | na |
| 2      | 12640      | 1584.8    | 34.0        | DGQPGAKGEPDGTGKVG      | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 323.8         | 120.8   | 100.0         | 66.7  | 101.6          | 100.0 | 120.8          | 66.7  | -3.19          | -2.68 | na             | na | na          | na |
| 2      | 13476      | 1652.8    | 40.9        | GEpGEPQITGPAGSRGPA     | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 541.2         | 0.0     | 91.7          | 0.0   | 304.1          | 20.0  | 0.0            | 0.0   | -1.78          | na    | na             | na | na          | na |
| 2      | 14976      | 1799.9    | 41.5        | PPTGPFVPPDLFFLK        | Proline-rich protein  | 441.3         | 14119.9 | 83.3          | 100.0 | 51010.5        | 100.0 | 14119.9        | 100.0 | 115.59         | 32.00 | na             | na | na          | na |
| 2      | 4768       | 1051.5    | 36.5        | TGVKGDAGPPGP           | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 134.6         | 220.0   | 100.0         | 100.0 | 106.8          | 60.0  | 220.0          | 100.0 | -1.26          | 1.63  | na             | na | na          | na |
| 2      | 20632      | 2428.3    | 26.6        | DGILGRDTPHEDQKGRQLHS   | Contrapsin-like protease inhibitor 1 precursor              | 84.2          | 983.1   | 16.7          | 100.0 | 254.8          | 80.0  | 983.1          | 100.0 | 3.03           | 11.68 | na             | na | na          | na |
| 2      | 15844      | 1887.9    | 40.9        | AKALYQAEAFADFQQS       | Contrapsin-like protease inhibitor 6 precursor              | 62.1          | 135.7   | 33.3          | 16.7  | 450.6          | 80.0  | 135.7          | 16.7  | 7.25           | 2.18  | na             | na | na          | na |
| 2      | 4524       | 1035.5    | 35.6        | GppGPEGKQGA            | Collagen alpha-1(III) chain                                 | 461.9         | 896.5   | 58.3          | 100.0 | 471.4          | 60.0  | 896.5          | 100.0 | 1.02           | 1.94  | na             | na | na          | na |
| 3      | 13476      | 1652.8    | 40.9        | GEpGEPQITGPAGSRGPA     | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 624.1         | 192.1   | 100.0         | 50.0  | 171.8          | 33.3  | 192.1          | 50.0  | -3.63          | -3.25 | na             | na | na          | na |
| 3      | 14544      | 1756.9    | 41.9        | GNFIDQTRVLNLGPIT       | Uromodulin  | 0.0           | 976.5   | 0.0           | 100.0 | 2190.6         | 100.0 | 976.5          | 100.0 | na             | na    | na             | na | na          | na |
| 3      | 10648      | 1435.7    | 39.6        | SpGSPGDGKTGPpGP        | Collagen alpha-1(I) chain precursor                         | 1141.3        | 0.0     | 100.0         | 0.0   | 147.2          | 16.7  | 0.0            | 0.0   | -7.75          | na    | na             | na | na          | na |
| 3      | 8116       | 1263.6    | 32.3        | ISSDLDGHPVVK           | Transketolase   | 392.6         | 104.0   | 100.0         | 100.0 | 66.1           | 50.0  | 104.0          | 100.0 | -5.94          | -3.77 | na             | na | na          | na |
| 3      | 13451      | 1649.8    | 41.3        | TDVTQQLTLFQDK          | Apolipoprotein A-IV   | 1740.8        | 509.9   | 100.0         | 100.0 | 509.9          | 100.0 | 922.7          | 100.0 | -3.41          | -1.89 | na             | na | na          | na |
| 3      | 17002      | 2008.0    | 31.2        | DGESGRpRqGERGLpGpPG    | Collagen alpha-1(III) chain                                 | 507.3         | 136.2   | 100.0         | 100.0 | 68.9           | 33.3  | 136.2          | 100.0 | -7.36          | -3.72 | na             | na | na          | na |
| 3      | 14576      | 1759.9    | 34.0        | SADTLWDIQDLKDL         | L-lactate dehydrogenase B chain                             | 683.8         | 150.3   | 100.0         | 83.3  | 31.0           | 16.7  | 150.3          | 83.3  | -22.03         | -4.55 | na             | na | na          | na |
| 3      | 16532      | 1960.0    | 35.5        | RpGEVGPpPpGAGEKSpG     | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 170.7         | 97.1    | 100.0         | 50.0  | 0.0            | 0.0   | 97.1           | 50.0  | na             | -1.76 | na             | na | na          | na |
| 3      | 17766      | 2088.1    | 36.3        | AGRpGEVGPpPpGAGEKSpG   | Collagen alpha-1(I) chain precursor                         | 164.6         | 20.0    | 100.0         | 50.0  | 20.0           | 16.7  | 79.9           | 50.0  | -8.22          | -2.06 | na             | na | na          | na |
| 3      | 13970      | 1702.0    | 22.8        | ELEKTKKTKDP            | Alpha-1-acid glycoprotein precursor                         | 0.0           | 303.6   | 0.0           | 100.0 | 75.3           | 50.0  | 303.6          | 100.0 | na             | na    | na             | na | na          | na |
| 3      | 19332      | 2260.0    | 26.3        | MADEAAEAHQEGDTRTKRG    | Fibrinogen alpha chain precursor                            | 28.4          | 47.4    | 9.1           | 83.3  | 10.6           | 16.7  | 47.4           | 83.3  | -2.69          | 1.67  | na             | na | na          | na |
| 3      | 4486       | 1032.5    | 36.9        | pPpGPRGpPpG            | Collagen alpha-1(XVII) chain                                | 12.4          | 21.3    | 36.4          | 83.3  | 8.1            | 16.7  | 21.3           | 83.3  | -1.52          | 1.72  | na             | na | na          | na |
| 3      | 8197       | 1269.6    | 39.2        | GfPpGAAgRTGPpGP        | Collagen alpha-2(I) chain                                   | 30.4          | 13.9    | 45.5          | 50.0  | 130.6          | 83.3  | 13.9           | 50.0  | 4.30           | -2.19 | na             | na | na          | na |
| 3      | 5870       | 1124.6    | 30.8        | DLEDVAGHGGR            | Cd99 protein  | 10.5          | 21.0    | 9.1           | 50.0  | 0.0            | 0.0   | 21.0           | 50.0  | na             | 1.99  | na             | na | na          | na |
| 3      | 21145      | 2497.4    | 38.7        | DLPGQQPVSEAOQKLPPLALLK | Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 2 | 34.6          | 161.9   | 9.1           | 83.3  | 71.2           | 33.3  | 161.9          | 83.3  | 2.06           | 4.69  | na             | na | na          | na |
| 3      | 18962      | 2216.1    | 26.6        | DHGKELSSLGPALVDKAPAK   | Similar to CG7896-PA  | 0.0           | 36.1    | 0.0           | 83.3  | 22.4           | 33.3  | 36.1           | 83.3  | na             | na    | na             | na | na          | na |
| 3      | 17050      | 2013.0    | 36.7        | DEQYPDATDEDLTSRMK      | Osteopontin precursor                                       | 26.9          | 57.7    | 54.5          | 100.0 | 58.8           | 33.3  | 57.7           | 100.0 | 2.19           | 2.15  | na             | na | na          | na |
| 3      | 5198       | 1079.5    | 47.6        | GpPpGpPpGTA            | Collagen alpha-1(III) chain                                 | 9.2           | 15.0    | 63.6          | 66.7  | 0.0            | 0.0   | 15.0           | 66.7  | na             | 1.62  | na             | na | na          | na |
| 4      | 6975       | 1194.6    | 37.7        | SpGPDGKTGPpGP          | Collagen alpha-1(I) chain                                   | 12172.0       | 6543.0  | 100.0         | 100.0 | 6619.6         | 100.0 | 6543.0         | 100.0 | -1.84          | -1.86 | na             | na | na          | na |
| 4      | 11644      | 1509.8    | 27.3        | GLpSpKGDGDAGPKG        | Collagen alpha-1(I) chain precursor                         | 52.9          | 187.6   | 83.3          | 100.0 | 50.7           | 16.7  | 187.6          | 100.0 | -1.04          | 3.55  | na             | na | na          | na |

Prestando mayor atención a estos 5 péptidos que se manifiestan de forma repetida, principalmente entre las semanas 1 y 3, observamos de forma particular que: 1) En el caso del péptido 13451, este es capaz de diferenciar con claridad el grupo N del grupo HA, quedando el grupo HL en una posición intermedia. Esta situación se mantiene de forma aún más clara en la semana 3. 2) El péptido 13476 también presenta un comportamiento interesante, ya que en las semanas 1 y 2 es capaz de diferenciar claramente el grupo de dieta estándar (N) con los grupos de dieta alta en grasa y colesterol (H). Sin embargo, en la semana 2 se observa un aumento de los niveles del grupo HL, quedando este más alejado del grupo HA y situándose en dirección al grupo N. 3) Con respecto al péptido 13862, se observa que en la primera semana clasifica bastante bien a los tres grupos (N, HA y HL) y en la segunda semana cambia y sus niveles se igualan en los grupos HA y HL, diferenciando muy bien entre los dos tipos de dieta. 4) El péptido 14576 se comporta de forma similar a los dos primeros. Durante la primera semana diferencia con claridad entre dietas (N y H) y en la tercera semana se observa un ligero aumento de los niveles en HL, dirigiéndose a la situación del grupo N. 5) Finalmente el péptido 17766, de nuevo, clasifica muy bien los grupos por dieta en la semana 1 y sin embargo, en la semana 3, se observa un cambio en los niveles de HL, aumentando en dirección al grupo N.

La mayoría de los 61 péptidos discriminativos diferencian con claridad entre los grupos con dieta estándar (N) y los grupos con dieta alta en grasa y colesterol (H), como se puede observar en los valores de *fold change* de la **Tabla 4.17**, por lo que la alteración en los niveles de dichos péptidos estaría sugiriendo una relación con el estado patológico de los animales que tomaron dieta alta en grasa. Aunque son necesarios más estudios para poder crear un panel de biomarcadores específicos de la enfermedad del hígado graso, este estudio podría aportar información interesante como inicio para la creación de dicho panel.

Sin embargo, en algunos de los péptidos se observó un fuerte aumento o disminución con respecto al grupo N, quedando el grupo HL en una situación más próxima a la hallada en el grupo control. Este es el caso de los péptidos pertenecientes a las proteínas apolipoproteína A-IV (péptido 13451), cadena de colágeno alpha-1 (II), precursor de la cadena de fibrinógeno alpha, precursor extracelular de superóxido dismutasa (Cu-Zn), proteína rica en prolina, uromodulina, transquetolasa y la cadena de L-lactato deshidrogenasa B.

La apolipoproteína A-IV, cuyos niveles se encuentran disminuidos en los grupos H pero especialmente en el grupo HA, se secreta en el intestino delgado en respuesta a la absorción de grasa y está implicada en la homeostasis de la glucosa, transporte reverso del colesterol y

transporte de lípidos a través de los quilomicrones y lipoproteínas HDL. Además, posee importantes propiedades anti-oxidativas y anti-inflamatorias. Todo ello, ha supuesto que sus niveles circulatorios sean considerados un objetivo en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad cardiovascular, así como de diabetes y desórdenes relacionados con la obesidad (Wang *et al.*, 2015). Esto explicaría porque los niveles hallados en los grupos H están disminuidos con respecto al grupo de dieta estándar (N), ya que esta apolipoproteína forma parte, principalmente, de las lipoproteínas HDL, encontrándose esta fracción de colesterol disminuida en estos grupos. Sin embargo, en el grupo HL estos niveles son superiores tras el consumo de zumo de tomate, lo que se relaciona con cambios en el metabolismo del colesterol asociado a la acumulación del licopeno, ya que a medida que transcurren las semanas los niveles de esta apolipoproteína aumentan ligeramente en el grupo HL.

La uromodulina ha sido validada como biomarcador de hipertensión y daño renal, hallándose niveles más elevados en pacientes con hipertensión en comparación con individuos sanos (Matafora *et al.*, 2014). En los grupos H pero especialmente en el grupo HA se observó una mayor abundancia relativa de uromodulina, ya que la dieta alta en grasa está asociada con alteraciones en la tensión arterial (Verwaerde *et al.*, 1999).

Por otra parte, la enzima transquetolasa, cuya abundancia se halló muy disminuida en los grupos H pero sobre todo en HA, participa en numerosas rutas metabólicas a nivel celular, como la ruta de las pentosas fosfato. Su actividad se va visto alterada en diversas patologías, como la diabetes. De hecho, esta enzima desempeña una importante función en la prevención del daño vascular por hiperglucemia producida principalmente por daño de la función mitocondrial debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno (Hammes *et al.*, 2003). Además, Boren *et al.* (2006) demostraron que la actividad de esta enzima también está presente en los peroxisomas de las células parenquimales del hígado, por lo que un daño hepático podría repercutir en la actividad de dicha enzima.

Las proteínas ricas en prolina (*proline-rich protein* o PRPs) son un grupo heterogéneo de proteínas con importantes funciones biológicas, como la expresión de propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes, en modificaciones secundarias de moléculas de colágeno y en la modulación de interacciones proteína-proteína, por lo que desempeñan un papel crucial en las rutas de transducción de señalización celular (Vitali *et al.*, 2015). Su aumento, especialmente hallado en el grupo HA, podría deberse a la alteración del sistema redox, como se puede observar en la **Tabla 4.10**. Lo mismo ocurre con el precursor extracelular de

superóxido dismutasa Cu-Zn, ya que esta enzima cataliza la conversión de moléculas oxidativas, como el óxido nítrico y el anión superóxido y por tanto, previenen del daño endotelial y disfunción mitocondrial, alteraciones que participan en el proceso de patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (Fukai *et al.*, 2011).

En lo que respecta a la cadena de colágeno alpha-1 (I) y al precursor de la cadena de fibrinógeno alpha, ambos han sido validados como biomarcadores de enfermedad cardiovascular y diabetes (Siwy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Concretamente, estos péptidos se hallaron en mayor abundancia en el grupo HA con respecto a los grupos N y HL, lo que podría estar relacionado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en este grupo con esteatosis.

Con respecto a la cadena B de L-lactato deshidrogenasa, esta enzima se encuentra presente en las mitocondrias, por lo que un daño en dicho orgánulo podría suponer su disminución, lo que explicaría los bajos niveles observados en el grupo HA (Brooks *et al.*, 1999), y a su vez podría sugerir un efecto protector del consumo de zumo de tomate, al hallarse unos valores de HL en una situación intermedia entre el grupo HA y el grupo control.

Al igual que ocurre en la apolipoproteína A-IV, en el resto de biomarcadores aumentados especialmente en HA, se observa un cambio con respecto al grupo HL, que en algunos casos está más aumentado y en otros más disminuido, quedando este en una situación intermedia entre los grupos N y HA, por lo que la ingesta de zumo de tomate puede estar suponiendo una mejora en la situación patológica de los animales que ingirieron dieta alta en grasa.

Por otro lado, es interesante observar que el número de biomarcadores peptídicos se encuentra muy disminuido en la semana 4 con respecto al resto de semanas, lo que podría estar indicando que a nivel biológico se puede estar produciendo una adaptación del organismo a la situación patológica, observándose por ello, los principales cambios al inicio del estudio, cuando se están generando la mayor parte de alteraciones fisiológicas debidas al consumo de una dieta elevada en grasa y colesterol.

### **Resultados de la relación biomarcadores-enfermedad cardiovascular**

Los péptidos seleccionados con mayor poder discriminante fueron introducidos en la base de datos (Mosaiques diagnostics and therapeutics. AG, Hannover, Alemania) que contiene un perfil completo del proteoma humano presente en la orina. Esta base de datos es actualizada continuamente gracias a la participación de grupos de investigación de todo el mundo. Sin embargo, aún no se ha descrito un perfil de biomarcadores peptídicos en lo que respecta a la esteatosis hepática. Por este motivo, los péptidos seleccionados procedentes de las muestras de orina de las ratas del presente estudio fueron comparados con el perfil proteómico establecido en los individuos que presentan enfermedad cardiovascular (EC), puesto que la esteatosis hepática está estrechamente relacionada con el síndrome metabólico y este a su vez con la enfermedad cardiovascular (Hamaguchi *et al.*, 2007; Byrne *et al.*, 2009; Fon Tacer y Rozman, 2011).

El proteoma urinario empleado para realizar la comparación con los resultados obtenidos a partir de la orina de rata, está basado en el perfil peptidómico de humanos que han sufrido esta patología (EC). Sin embargo, tal y como demostraron Siwy *et al.* (2012) tras la evaluación del perfil peptidómico a partir de las muestras de orina de ratas Zucker obesas y diabéticas, los biomarcadores del modelo de rata mostraron una importante similitud con el proteoma humano de enfermedad cardiovascular. Por tanto, el modelo de rata podría ser un interesante modelo experimental para investigar el daño por EC relacionado con el síndrome metabólico.

Los péptidos con mayor poder discriminante fueron comparados con los incluidos en la base de datos de enfermedad cardiovascular, hallándose tres relaciones positivas: el péptido Collagen alpha-1(II) chain (ID: 9863) en la semana 2, el péptido Collagen alpha-1(I) chain precursor en la semana 3 (ID: 10648) y el péptido Collagen alpha-1(I) chain en la semana 4 (ID: 6975). El péptido 9863 presentó mayor poder discriminante en la semana 2, cuyos valores de *fold change* en HA y HL fueron de -1.17 y -2.94, respectivamente. A pesar de que la diferencia de *fold change* fue menor en el grupo HA, si se observa el dato de frecuencia habría que tener en cuenta que este péptido estuvo presente únicamente en un 20% de los animales, a diferencia del grupo HL, que estuvo en un 80%. El péptido 10648 presentó un valor muy bajo en el grupo HA y nulo en el grupo HL con respecto al grupo control con valores de *fold change* de -7.75 y na, respectivamente. Al igual que ocurre con el péptido anterior, en el péptido 10648 la frecuencia es muy baja en el grupo HA (17%), por lo que en ambos grupos la

abundancia de dicho péptido se podría considerar prácticamente nula en ambos grupos H. Por último, respecto al péptido 6975 se observó una reducción muy similar de la abundancia relativa en los grupos H en comparación con el valor presente en el grupo N, tal y como reflejan los datos de *fold change* (-1.84 y -1.86 en HA y HL, respectivamente). Además, la frecuencia fue del 100% en los tres grupos, por lo que la significación de los resultados adquiere mayor relevancia (**Tabla 4.17**). La presencia de fragmentos de colágeno está asociada con alteraciones de la matriz generada en los vasos sanguíneos como consecuencia de un daño endotelial (Pasterkamp *et al.*, 2000; Delles *et al.*, 2010; Mullen *et al.*, 2011).

Sin embargo, al estar comparando péptidos identificados en humanos con los resultados obtenidos en un ensayo con un modelo animal, es posible que no existan coincidencias en los péptidos más significativos. A pesar de que el estudio realizado por Siwy *et al.* (2012) demostró una buena relación entre el perfil peptídico de rata y de humano en el caso de la enfermedad cardiovascular, es posible que al tratarse de un modelo de rata diferente, no se obtengan los mismos resultados.

## *Capítulo 5. Conclusiones*



## 5. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones globales:

1. El consumo de zumo de tomate en animales normocolesterolémicos, aunque no se asocia con una reducción de las concentraciones plasmáticas de colesterol total ni de triglicéridos, incrementó significativamente la concentración plasmática de colesterol HDL, mejorando el índice aterogénico. Además, se observó una disminución significativa en la actividad de la enzima HMGCoA-R hepática, estando determinada por la cantidad de licopeno ingerida. Estos resultados sugieren un posible efecto hipocolesterolémico asociado al consumo de zumo de tomate y a la acumulación de licopeno en el hígado.
2. En los animales normocolesterolémicos, tras el consumo de zumo de tomate, únicamente se observó un cambio significativo en la concentración de ácido butírico en las heces, que estuvo relacionada con el tipo de tratamiento tecnológico aplicado al zumo y su contenido en licopeno. Hay que destacar que no se observaron cambios en la cantidad de ácido propiónico detectada en las heces.
3. El licopeno del zumo de tomate se acumuló en el hígado y su biodisponibilidad estuvo determinada por la cantidad de grasa en la dieta, al presentar el grupo de ratas alimentadas con dieta alta en grasa una mayor concentración de licopeno total.
4. En los animales con esteatosis inducida a partir de la dieta, el consumo del zumo de tomate redujo las concentraciones plasmáticas de triglicéridos e incrementó las concentraciones de colesterol HDL, mostrando una tendencia hacia un perfil lipídico más fisiológico.
5. El consumo de zumo de tomate y la acumulación de licopeno en el hígado mitigan la depleción de aminoácidos, detectada en los metabolitos hepáticos, asociada al consumo de la dieta alta en grasa. Este comportamiento conduce a que el patrón metabólico en los animales con esteatosis, que fueron suplementados con el zumo de

- tomate, se asemeje al que mostraron los animales con un metabolismo hepático fisiológico.
6. Hay que destacar los resultados de dos aminoácidos, por su función relevante en el metabolismo lipídico, tras el consumo de zumo de tomate en los animales con esteatosis. La arginina, que disminuyó significativamente, y la carnitina, que se incrementó significativamente. Esto nos indica que el zumo de tomate regula el metabolismo lipídico a través de la lipólisis, la lipogénesis y la  $\beta$ -oxidación.
  7. El consumo de zumo de tomate y la acumulación de licopeno en hígado incrementaron la expresión génica de proteínas relacionadas con el transporte de lípidos, con la lipólisis, y con la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, regulando el metabolismo lipídico.
  8. El grado de esteatosis de los animales alimentados con dieta alta en grasa no se relacionó con cambios en las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6). Aunque el consumo de dieta grasa estuvo relacionado con cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo (MDA e isoprostanos), el consumo de zumo de tomate disminuyó significativamente la concentración urinaria de isoprostanos y la relación entre GSH/GSSG y entre NAD/NADH en el hígado, mejorando el estado redox asociado a la esteatosis inducida.
  9. Los resultados obtenidos en el análisis de biomarcadores peptídicos sugieren que el consumo de zumo de tomate, en ratas con esteatosis inducida, modifica ligeramente el perfil peptídico urinario, dirigiéndolo hacia un nivel más próximo al de las ratas alimentadas con dieta estándar.
  10. Estos resultados sugieren que el consumo de zumo de tomate o productos derivados que proporcionen licopeno a la dieta, tendrían que ser considerados dentro de las estrategias dietéticas dirigidas al tratamiento de la esteatosis hepática. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios que permitan conocer y determinar los mecanismos de actuación del licopeno en el metabolismo lipídico en la enfermedad de hígado graso no alcohólica y a su vez, que contribuyan al desarrollo de un panel específico de biomarcadores de origen peptídico de esta enfermedad hepática, que permita su prevención y diagnóstico precoz.

## *Capítulo 6. Extended Summary and Conclusions*



---

## SUMMARY

---

### Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disorder in Western countries with a high prevalence; in fact, almost one-quarter of the general population is affected by this pathology. NAFLD used to be an adult disease but, currently, the prevalence is increasing in obese children and adolescents, since obesity is becoming in a severe healthy issue due to the increasing prevalence noted over the last three decades. NAFLD covers a spectrum ranging from hepatic steatosis to steatohepatitis (NASH), fibrosis and cirrhosis. Obesity, type 2 diabetes, dyslipidaemia and hypertension are most important risk factors, since NAFLD is considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome. The hallmark of NAFLD is hepatic lipid accumulation, mainly triglycerides, in the absence of significant ethanol consumption. Although significant progress in understanding the pathogenesis of NAFLD has been achieved in years, the mechanisms leading to liver steatosis and further progress to NASH still remain unclear (Wei *et al.*, 2008; Musso *et al.*, 2009)

Two steps or hits have been proposed for the pathophysiology of NAFLD and NASH: the first hit is owing to the triglycerides accumulation as consequence of insulin resistance. The second hit includes oxidative stress, lipid peroxidation, increased cytokine production and inflammation, resulting in NASH (Tessari *et al.*, 2009).

Furthermore, abnormalities in lipid and lipoprotein metabolism accompanied by chronic inflammation are considered an important risk to development of cardiovascular disease (CVD). In fact, the current evidence raises the possibility that NADLD may be not only a marker but also an early mediator of atherosclerosis (Targher *et al.*, 2007; Fon Tacer y Rozman *et al.*, 2011).

Dietary factors may modulate liver steatosis. Indeed, lifestyle modification including diet and exercise are crucial to achieve significant improvements. In this regard, several studies have been carried out to ascertain the beneficial effects of different dietary compounds in NAFLD (Oliveira *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012), and the Mediterranean diet has been suggested as the dietary strategy for this disease due to the high consumption of plant-based foods and low intake of total and saturated fats and refined sugars (Ryan *et al.*, 2013). In addition to low dietary fat and caloric restriction, vegetables and fruits provide a wide range of bioactive compounds with antioxidant properties that can contribute to the treatment of

NAFLD. Tomatoes are a dietary source of natural antioxidants such as vitamins C and E, phenolic compounds and carotenoids, especially, lycopene (Jacob *et al.*, 2008). Previous studies have shown the consumption of tomatoes and tomato products strengthened the antioxidant system and inhibited lipid peroxidation in humans (Visioli *et al.*, 2003). Moreover, lycopene has displayed to have a preventive effect on the development of NASH induced by a high fat diet in animal models, as well as, an inhibitory effect of lipid peroxidation in the liver tissues of rats after oral lycopene administration (Bahcecioglu *et al.*, 2010). On the other hand, scientific evidence has suggested the role of lycopene as antioxidant agent in the prevention of CVD in relation to the effect of this carotenoid in lipoprotein metabolism, decreasing total cholesterol (Jacob *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2008), and content and oxidation of LDL-cholesterol (Hsu *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2009; García-Alonso *et al.*, 2012).

On this basis, the main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the effect of tomato juice on liver lipid metabolism in order to elucidate the possible mechanisms of action of tomato lycopene *in vivo*, using a Sprague Dawley rat model. For that, we carried out 2 experiments involving the intake of tomato juice; firstly with rats fed a standard rodent diet and secondly with rats with diet-induced hepatic steatosis (high-fat and high cholesterol diet).

## **Study 1. Effect of tomato juice intake in normocholesterolemic rats**

### **Materials and Methods**

#### **❖ Experimental design**

In this study, 24 male Sprague Dawley rats (12 week-old) weighing approximately 400 g, were randomly divided into three groups (n=8) fed to standard diet for rodents and different drink as follows: control group (tap water as drink), group 1 (commercial tomato juice with a low content of lycopene) and group 2 (commercial tomato juice with a high content of lycopene). Rats were placed individually in metabolic cages and they had free access to feed and drink *ad libitum*. Rats were maintained under controlled temperature (22°C), air humidity (55%) and 12-h light-dark cycle conditions. Animals were weighed before starting the experiment and at the end. The amount of food and drink consumed was recorded daily, as well as, the urine and faeces excreted. After three weeks, rats were sacrificed and blood and liver samples were collected. Plasma was drawn by centrifugation (3000 g, 10 min 4°C).

Furthermore, faeces samples were collected at the beginning and at the end of the experimental period. All samples were immediately stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The study was carried out under appropriate guidelines and approved by the Bioethics Committee of the University of Murcia (**Figure 3.1**, Chapter 3).

#### ❖ Analytical methods

In study 1, biochemical lipid parameters were analyzed in plasma, cholesterol and HMGCoA-R activity was determined in livers, short chain fatty acids (SCFA) were ascertained in faeces and the lycopene content accumulated in liver and excreted in faeces was analyzed. Lycopene intake mean value along the intervention study was estimated in groups 1 and 2, and the apparent absorption of lycopene was calculated in both groups.

### Results and discussion

The daily intake of lycopene was 0.48 and 3.59 mg/day in group 1 and 2 respectively and the apparent absorption in both experimental groups was very high with final values of 94.37% and 93.59%, respectively, exhibiting similar values in both groups (**Table 4.2**, Chapter 4). The ingested lycopene was stored in liver, since it is the first organ to receive nutrients after their absorption from the gut (Zhao *et al.*, 1998; Boileau *et al.*, 2002) and it was expected, the content was significantly higher in group 2 than in group 1, (2.03 and 0.84  $\mu\text{g/g}$ , respectively) owing to the differences in the amount of lycopene intake daily. These results showed a positive relationship with the amount of tomato juice ingested and with the amount of lycopene (2.7 mg/100g in group 1 and 12 mg/100g in group 2) in the juices.

Regarding the biochemical parameters of plasma (**Table 4.3**, Chapter 4), no significant differences were found in triglycerides, total cholesterol or VLDL-c. However, significant differences were observed between initial and final values of LDL-c, being these concentrations higher at the end of the study, but not when values were compared between three groups. HDL-c concentration showed significant differences between groups, with higher levels in groups 1 and 2. The consumption of tomato juice did not exert a cholesterol-lowering effect in the different fractions. However, the increase of HDL cholesterol led to a significant difference in the atherogenic index, showing lesser values in groups 1 and 2.

The activity of the HMGCoA-R was measured as ratio HMG/mevalonate (**Figure 4.1**, Chapter 4), and whereas in control group and group 1 did not show significant differences,

group 2 showed a significant reduction of the activity of this enzyme, showing a higher value for this ratio. This finding was related to the amount of lycopene ingested, and hence, with the accumulation of lycopene in the liver.

Despite cholesterol levels in liver were very similar in three groups (**Figure 4.2**, Chapter 4), an inhibitory effect of the activity of HMGCoA-R in liver was showed in group 2. Recently, our research group has reported that lycopene may inhibit the activity of the HMGCoA-R, since this carotenoid may interact with the active site of the enzyme to form a complex similar to that formed between the substrate HMGCoA, thus impeding mevalonate formation and consequently reducing cholesterol synthesis. Molecular docking calculations have showed that lycopene is fitted tightly into the active site of HMGCoA-R, where it was seen to bind with higher affinity than the substrate and the statin cerivastatin (Navarro-González *et al.*, 2014).

To study other plausible mechanism of the hypocholesterolemic effect of tomato juice, the prebiotic effect was evaluated indirectly by measuring the SCFA in feces, taking special attention to the content of propionic acid as modulator of the lipid metabolism. A significantly higher concentration of butyrate was observed in group 2 (**Figure 4.3**, Chapter 4) but no differences between groups were found in the rest of SCFA (**Figure 4.4**, Chapter 4). Contrarily to it was expected, group 2 consumed juice with less content in fiber (0.8 %) but with higher content in lycopene, as compared with group 1 which took tomato juice with a higher content in fiber (1.7%) and less lycopene content. These results could be explained by the fact that rats of group 2 drank more tomato juice and hence the final amounts of fiber were similar in both groups. Moreover, the thermal processing to obtain both tomato juices was different, reaching higher temperatures in tomato juice of group 2 and therefore, leading to solubilization of hemicellulose and soluble compounds are more fermentable by microbiota. It is remarkable that no changes were detected in propionate, and any relationship were observed with the inhibition of HMGCoA-R, since the hypocholesterolemic effect could be associated with the accumulation of lycopene in the liver, instead of prebiotic effect of tomato juice.

## Study 2. Effect of tomato juice intake in rats with induced liver steatosis.

### Materials and Methods

#### ❖ Experimental design

In study 2, twenty four male Sprague Dawley rats (8 weeks old) weighing approximately 250 g, were randomly divided into 2 groups fed to standard diet (N) (*Teklad global 14% protein rodent maintenance diet, Harlan Laboratories*) or hypercholesteraemic and high fat diet (H)(*Atherogenic rodent diet TD-02028, Harlan Laboratories*) and, water as drink for a 2 week adaptation period. After that, each group was again randomly divided into two others groups and were placed individually in metabolic cages. Rats were maintained under controlled temperature (22°C), air humidity (55%) and 12-h light-dark cycle conditions. The four experimental groups (n=6) were constituted according to the diet and beverage as follows: NA (standard diet and water), NL (standard diet and tomato juice), HA (high fat diet and water) and HL (high fat diet and tomato juice). The experimental period was 5 weeks and during this time, the animals were given free access to feed and drink. Food intake, drink consumption, as well as, the amount of excreted faeces and the volume of excreted urine were measured daily and rats were weighed at weekly intervals. After this period, all rats were deprived of food overnight, anaesthetised with isoflurane and sacrificed using an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital. Blood, adipose tissue, aorta and liver were collected as biological samples. Moreover, urine and faeces samples were collected weekly. Plasma was drawn by centrifugation and all samples were immediately stored at -80°C. The study was carried out under appropriate guidelines and approved by the Bioethics Committee of the University of Murcia as well (**Figure 3.2**, Chapter 3).

#### ❖ Analytical methods

In study 2, a histopathological examination was carried out in liver samples to determine the grade of steatosis. Plasma samples were analysed to obtain biochemical lipid parameters, AST, ALT and PON enzymes, using an automatic analyser, cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 and soluble adhesion molecular (s-ICAM-1 and s-VCAM-1) through Elisa Kits and the hydrophilic antioxidant capacity by ORAC method. Cytokine TNF- $\alpha$  was also analysed in adipose tissue samples using an Elisa kit. Urine was employed to analyse isoprostanes content by Elisa Kit and the profile of proteomic biomarkers by CE-MS. Faeces were used to determine the lycopene content spectrophotometrically and the concentration of long chain fatty acid by gas-liquid chromatography. Lycopene and its isomers were quantified in livers by HPLC-MS.

Moreover, determination of malondialdehido (MDA) by HPLC and metabolites by HPLC-MS. The study of gene expression was carried out in liver samples using 96-well PCR arrays design for the evaluation the rat fatty acid metabolism genes (PARN-007 Qiagen SABiosciences). The antioxidant capacity, vitamin C, free flavonoids and total phenolic compounds were also analysed in tomato juice to characterize its profile of bioactive compounds (**Figure 3.3**, Chapter 3).

## Results and Discussion

The daily lycopene amount from tomato juice consumed per day in groups HL and NL ranged from 3.15 to 3.5 mg/day, respectively, without significant differences (**Tables 4.4** and **4.7**, Chapter 4). These data were obtained from lycopene concentration in tomato juice (11 mg/100g) and the daily amount of tomato juice consumption. However, the apparent absorption of lycopene was significantly higher in the HL group compared with the NL group (63.07% *versus* 44.45%,  $p < 0.01$ ) because a high-fat diet allows for a higher absorption of lycopene in the intestine. These values are correlated with the amounts of lycopene accumulated in the livers, being their levels almost twofold higher in the HL group than in the NL group (6.00 *versus* 2.90  $\mu\text{g/g}$ ) (**Table 4.7**, Chapter 4).

Intake of high-fat and high-cholesterol diet clearly induced liver steatosis and caused other liver disturbances. For instance, histopathological examination of the livers revealed significant hepatic steatosis in grade 2 or 3, according to Brunt *et al.* (1999), characterised by swelling of hepatocytes and fat accumulation in rats fed hypercholesterolemic diet as compared with the NA and NL groups (**Figure 4.5**, Chapter 4). In this steatosis stage, no hepatocyte injuries (inflammation or fibrosis) were observed. Moreover, liver steatosis was confirmed by the high levels of plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) found in H groups, and by the higher fat content measured in liver by a gravimetric method (Hijona *et al.*, 2010) (**Table 4.5**, Chapter 4).

Other liver disturbances observed in rats fed H diet were, for example, the higher levels of liver MDA observed in H groups, indicating liver lipid peroxidation and deterioration in these groups (Sookoian *et al.*, 2010), a fact which was supported by the highest urinary isoprostanes excretion observed particularly in the HA group ( $p < 0.01$ ) (**Table 4.8**, Chapter 4). In this regard, tomato juice had a beneficial effect, reducing the urine isoprostanes content in the

HL group compared with the HA group (4.17 vs 9.87 ng/mg creatinine) and therefore, showing a positive effect on the amelioration of oxidative stress (Guha *et al.*, 2003).

Related to inflammation biomarkers, no significant differences were found in the plasma or in the adipose tissue level of TNF- $\alpha$  and IL-6 among the four groups, which is in agreement with the histopathological description in liver. Circulating biomarkers of atherosclerosis (sICAM-1 and sVCAM-1) were higher in H groups than N groups, however tomato juice intake had no positive effect on these biomarkers (**Table 4.8**, Chapter 4).

Regarding the lipid profile in plasma (**Table 4.5**, Chapter 4), no changes were observed between the two groups with the N diet except for LDL cholesterol content, showing the lowest level in the NL group. In contrast, animals fed the H diet showed a significant decrease in total and LDL cholesterol and an increase in HDL cholesterol at the end of the study. Moreover, final HDL cholesterol in the HL group was significantly higher ( $p < 0.05$ ) and the triglycerides (TG) lower than in the HA group, showing levels similar to the N groups. Therefore, main changes in plasma lipid profile were associated with the diet but the intake of tomato juice appeared to ameliorate these parameters. Thus, the intake of tomato juice was found to significantly reduce levels of final total cholesterol in NL, whereas in HL, a tendency towards reduced levels was observed for final VLDL and TG. Furthermore, a significant difference was found between initial and final total HDL in group HL. In numerous human intervention studies, lycopene has been considered a hypocholesterolemic agent (Mordente *et al.*, 2011), lowering plasma cholesterol through different mechanisms. In addition, the HMG-CoA activity in liver was significantly higher in HL group (**Figure 4.6**, Chapter 4). Recently, Navarro-González *et al.* (2014) reported, after a series of *in vivo* and *in vitro* studies, that lycopene competes with HMG-CoA in the liver, thus impeding formation of mevalonate and consequently reducing the synthesis of cholesterol by lowering the activity of the HMGCR rate-limiting step. For this reason, the consumption of tomato juice and the accumulation of lycopene in liver may improve plasma cholesterol levels in steatosis.

The main results of the metabolite analysis are shown in **Table 4.9** (Chapter 4). In a general view, lycopene addition to a hypercholesterolemic and high-fat diet changed the metabolic pattern, showing metabolite levels closer to those of the animals that took the maintenance diet with a physiological metabolism of liver. Samples from animals with a normal diet presented no remarkable differences independent of the administration of tomato juice. The majority of the levels of the measured metabolites decreased when the animals

were fed a hypercholesterolemic diet and tomato juice was not present (NA/HA comparison). This tendency was followed by several amino acids with a statically significant difference between the feed conditions. The only exception was Arg, which levels increased ( $p < 0.001$ ). When tomato juice was added to the hypercholesterolemic and high-fat diet, almost all measured amino acid levels increased, tending to a normal diet metabolic pattern (HA/HL comparison and even Arg concentration ( $p < 0.001$ ) was lowered to normal diet levels (**Table 4.9**). A similar pattern was found for some redox intermediates, such as hydroxyproline, GSH, GSSG and taurine, as well as metabolites involved in lipid metabolism, such as L-carnitine, biotin and OPE. It must be noted that, even though the glutathione ratio was almost two times higher when tomato juice was added in animals with NAFLD, its levels were 10 times higher when animals were fed with the maintenance diet (**Table 4.9**). Moreover, the ratio of NAD/NADH declined with the hypercholesterolemic and high-fat diet, whereas it was increased even more than that in the normal diet when tomato juice was added, as shown in **Table 4.10** (Chapter 4).

In general, lycopene intake has been related to a beneficial effect on the prevention of different diseases related to diet, including NAFLD, based on its antioxidant properties (Bernal *et al.*, 2013; Mateos *et al.*, 2005; Seybold *et al.*, 2004). It is remarkable that the intake of tomato juice, together with the hypercholesterolemic and high-fat diet, at least partially recovered amino acid levels in liver with statistical significance. Interestingly, the only exception to the amino acid depletion was Arg, which was higher in the HA group, whereas the intake of tomato juice reverted this increase significantly ( $P < 0.001$ ). The increase of Arg in the livers of animals fed a high-fat diet could be associated with decreasing lipogenesis since this amino acid regulates lipid metabolism, modulating the expression and function of the enzymes involved in lipolysis and lipogenesis (Kohjima *et al.*, 2007). Other metabolites involved in  $\beta$ -oxidation, such as L-carnitine and CoA, decreased in the livers of animals from the HA and HL groups, as have been described in NAFLD, in rat and human models (Periago *et al.*, 2009; Ramírez-Torres *et al.*, 2012). High levels of L-carnitine in the liver can be considered a preventive factor in the evolution of NAFLD to NASH. The significant differences found in the L-carnitine concentrations in the pairwise comparison showed that rats that took tomato juice had a higher level than their control groups (NA and HA, respectively), which could indicate a healthier status to maintain the mitochondrial activity concerning  $\beta$ -oxidation and protecting the fatty liver against inflammation and fibrosis.

It is generally accepted that oxidative stress is related to the development of NAFLD affecting the trans-sulphuration pathway (Bijland et al., 2013), and therefore, it is not surprising that four downstream products from methionine metabolism, namely, (a) homocysteine, (b) GSH, (c) GSSG and (d) taurine, revealed strong differences when a hypercholesterolemic and high-fat diet was supplied. Taurine and both forms of glutathione were depleted in NAFLD, probably because SAMe and the trans-sulphuration pathways are decreased due to the dietary conditions. Moreover, apart from L-cysteine, glutathione is formed from two amino acids, L-glutamate and glycine, which are also significantly depleted in rats fed a hypercholesterolemic and high-fat diet, showing a significant increase in the HL group compared with the HA group. These results indicate an impairment in glutathione synthesis (Abdelmalek *et al.*, 2009) in animals in the HA and HL groups, which can be confirmed by the abrupt GSH decrease (almost 60-fold in HA), whereas when lycopene was supplied, levels were more than 25 times lower than normal diet values (HL group). Additionally, taurine and homocysteine levels recovered normal diet values, probably due to the antioxidant properties of lycopene, which may be able to restore trans-sulphuration pathway activity. Even more importantly, the NAD/NADH ratio declined in the hypercholesterolemic and high-fat diet in agreement with previous studies (García Canaveras *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011), but, in contrast to GSH concentration, tomato juice administration restored the NAD/NADH ratio to the normal diet value, probably since the antioxidant activity of lycopene might alleviate some of the harmful effects of fat accumulation (Bahcecioglu *et al.*, 2010).

Taking into consideration the genes with significant change ( $p < 0.05$ ) at least two fold higher and based on their role in the fatty acid metabolism, in animals with induced steatosis, the intake of tomato juice together with an H diet led to an overexpression of mRNA levels of various enzymes involved in different steps of fatty acid metabolism: 1) intracellular fatty acid transport protein FATP (Fabp family and Slc27a1); 2) hydrolysis process proteins, like Lpl and Gdp2; and 3) genes involved in mitochondrial or peroxisome  $\beta$ -oxidation of fatty acids such as Cpt1c, Acsm2, Acot8 and Pecn (**Table 4.11**, Chapter 4)

In NL group an overexpression of several genes related to fatty acid transport (Fabp2 and Pecn) was observed, showing that under physiological conditions, the intake of lycopene improved the transport of fatty acid into hepatocytes and enabled more effective  $\beta$ -oxidation in the mitochondria, as these proteins are involved in the transformation of dienoil-CoA into

trans-enoyl-CoA, which allows continuation of  $\beta$ -oxidation when fatty acids cannot be cleaved by Acad enzymes due to the presence of double bounds (Musso *et al.*, 2009)

In animals with induced steatosis, an overexpression in the mRNA levels of different proteins involved in the fatty acid metabolism was observed after intake of tomato juice. First of all, this significant effect was detected in transport proteins, such as Fabp3 and Slc27a1 family. The Fabp family are transport proteins located in cytosol that facilitate intracellular transport of fatty acids and other lipophilic molecules controlling the availability of ligands to regulate transcription of genes involved in important metabolic and inflammatory processes (Helledie *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002). The intake of high fat diet increased expression of Fabp2 in HA and Fabp3 in HL animals, which helps to reduce serum fatty acids, prevent dyslipidemia and increase fatty acid oxidation (Auinger *et al.*, 2010). Another fatty acid transporter involved in FA transmembrane translocation, Slc27a1, was expressed only by group HL. The expression of FABP is regulated by hormones (insulin), by inflammatory mediators (TNF- $\alpha$  and IL-1), and, most importantly for its role in hepatic fatty acid homeostasis, by activators of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR- $\alpha$  or - $\gamma$ ) (Doege *et al.*, 2006; Courtney *et al.*, 2013)

Secondly, the rats with induced steatosis that received tomato juice showed an overexpression of the mRNA levels of proteins related to FA hydrolysis (Lpl and Gdp2). Several studies have reported an inverse relationship between Lpl content and plasma TG levels (Wong *et al.*, 2002; Augustus *et al.*, 2003). In this study, the HL group showed an overexpression of Lpl mRNA, accompanied by a decrease in plasma TG; hence, the upregulation of Lpl gene could be associated with the accumulation of lycopene in the liver. In the HA group, the HSL (intracellular hormone-sensitive lipase), encoded by Lipe gene, was overexpressed, leading to an increase in lipid metabolism through hydrolysis of a variety of esters (Fernández *et al.*, 2011). In contrast, Gdp2 mRNA, an enzyme that plays an important role in the synthesis of TG (Lee *et al.*, 2013), was only increased in HA, which correlates with the plasma TG levels in these animals.

In third place, an overexpression of genes involved in the  $\beta$ -oxidation of fatty acids was also observed. The mRNA overexpression of Acad9, Acads, Acsl5, Acsm2 and Acsm4 in group HA, and Acsm2 in group HL, suggests an enhancement of lipid metabolism due to steatosis, leading to a higher influx of fatty acid into the mitochondria, and particularly in the second group, the oxidation of medium chain fatty acids was associated with the lowest content of

linolenic acid in the liver. The gene *Cpt1* was overexpressed in the HL group, which corresponds with the high carnitine content previously (liver metabolites study) found in the liver of these animals, showing a higher influx of long-chain fatty acids into the mitochondria related to the linoleic acid content in the liver. The *Cpt1* overexpression together with the upregulation of *Mcee* gene, suggest an enhancement of mitochondrial fatty acid oxidation. In steatosis, extramitochondrial oxidation is also activated (Gyamfi *et al.*, 2010; Kohjima *et al.*, 2007) as indicated by the overexpression of *Acox2* in HA and *Acot8* and *Pecr* in HL. *Acox2* enzyme is involved in the degradation of long branched fatty acids that facilitate mitochondrial oxidation. *Acot8* is responsible for most of the thioesterase activity of the peroxisomes, whereas *Pecr*, as described above, transforms the dienoyl- CoA into trans-enoyl-CoA, allowing continuation of  $\beta$ -oxidation in the mitochondria.

Related to urinary peptidomic biomarkers, a partial least squares–discriminant analysis (PLS-DA) was carried out to explore association between peptides and treatments. Groups NA and NL have a very similar peptide profiles; therefore PLS-DA was unable of correctly classifying individuals to treatments, that is to say their peptide profile was very similar. Consequently, further statistical treatment was carried out comparing only between three groups (N, HA and HL) (**Figure 4.18**). A total of 61 peptides were identified, from 800 initial peptides, as the most discriminant set between groups (**Table 4.17**), changing over the four weeks. It is interesting to remark the results displayed in the urinary proteomic fingerprint over the weeks, as rats with induced steatosis and supplemented with tomato juice (HL) showed a urinary proteomic profile closer to the group fed a standard diet (N). This fact is also observed in *fold changes* obtained in HL (calculated in relation to the mean abundance of peptides in group N), since most of the peptides stay in an intermediate position between groups N and HA.

---

## **CONCLUSIONS**

---

The following conclusions were extracted from the studies carried out in the present Doctoral Thesis:

1. The tomato juice consumption in normocholesterolemic rats, although it was not associated with the reduction of total cholesterol and triglycerides concentrations, produced a significant increase in plasma HDL-c, improving the atherogenic index. Moreover, a significant decrease in liver HMGCoA-R activity was observed, according to the amount of lycopene intake. These results suggest a possible hypocholesterolemic effect associated with the tomato juice consumption and the lycopene accumulated in the liver.
2. In normocholesterolemic rats, after the tomato juice intake, only a significant change was observed in the butyric acid concentration in faeces, which was related to the thermal procedure to obtain tomato juice and its lycopene content. It is remarkable that no changes were found in the propionic acid concentration in faeces.
3. Lycopene from tomato juice was accumulated in liver and its bioavailability was associated with the amount of fat in the diet, fact observed to find higher concentrations of lycopene in livers of rats fed the high fat diet.
4. In rats with steatosis induced by the high fat diet, the tomato juice consumption reduced the plasma triglycerides levels and increased the HDL-c, showing a tendency to lipid profile closer to the physiological condition.
5. Tomato juice intake and the accumulated lycopene in liver alleviated the amino acid depletion, especially detected in the results of liver metabolites, associated with the high fat diet consumption. Furthermore, the metabolic pattern improved in rats with steatosis induced and supplemented with tomato juice, recovering the redox balance in liver and reaching a hepatic metabolism more physiological.
6. It is necessary to remark the results of two aminoacids with relevant roles in lipid metabolism, displayed after tomato juice consumption in rats with steatosis. Arg,

which decreased significantly, and L-carnitine, which increased significantly. These changes point out a role of tomato juice in improving of lipid metabolism through lipolysis, lipogenesis and  $\beta$ -oxidation mechanisms.

7. The tomato juice consumption and the accumulated lycopene in liver increased the gene expression of proteins related to fatty acids transport, fatty acids hydrolysis and peroxisomal and  $\beta$ -oxidation; thus, regulating the lipid metabolism.
8. The grade of steatosis in rats fed a high fat diet did not produce any changes in proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6). Although the consumption of high fat diet was related to the increase of oxidative stress biomarkers (MDA and isoprostanes), the tomato juice intake decreased significantly the urinary isoprostanes concentrations and the GSH/GSSG and NAD/NADH ratios in the liver; thus, regulating the redox status associated with induced steatosis.
9. Results in the urinary proteomic biomarkers suggest that tomato juice intake by rats with induced steatosis modifies slightly the urinary peptide profile leading to a status closer to the healthy group.
10. These results suggest that tomato juice or tomato products should be taken into consideration in the dietary strategies of treatment of NAFLD, but also that further researches should be carried out to elucidate the mechanisms of lycopene in hepatic metabolism in non-alcoholic fatty liver disease, and in order to develop a panel of specific peptidomic biomarkers for this hepatic pathology, leading an early diagnosis and prevention.



## *Capítulo 7. Bibliografía*



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J, *et al.* Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: results of a randomized placebo controlled trial. *Hepatology*. 2009; 50: 1818–26.
- Agarwal A, Sen H, Agarwal S, Rao AV. Lycopene content of tomato products: its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *J Med Food*. 2001; 4: 9-15.
- Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*. 2000; 163 (6): 739-44.
- Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*. 1998; 33: 981-984.
- Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24, 1463-1471.
- Albalat A, Mischak H, Mullen W. Urine proteomics in clinical applications: technologies, principal considerations and clinical implementation. *Prilozi*. 2011; 32 (1): 13-44.
- Albornoz López R y Pérez Rodrigo I. Nutrición y Síndrome metabólico. *Nutr Clin Diet Hosp*. 2012; 32 (3): 92-97.
- Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1801: 1175-1183.
- Alshatwi AA, Al Obaaid AA, Al Sedairy SA, Al-Assaf AH, Zhang JJ, Lei KY. Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. *Nutr Res*. 2010; 30: 66-73.
- Anderson N, Borlak J. Molecular mechanism and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol*. 2008; 60 (3): 311-357.
- Anese M, Falcone P, Fogliano V, Nicoli MC, Massini R. Effect of equivalent thermal treatments on the color and the antioxidant activity of tomato purées. *J Food Sci*. 2002; 67: 3442-3446.
- Arab L, Steck S. Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71: 1691S-5S.
- Augustus AS, Kako Y, Yagyu H, Goldberg IJ. Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Meta*. 2003; 284: E331–E339
- Auinger A, Hlwih U, Rubin S, Herrmann J, Jahreis G, Pfeuffer M *et al.* Human intestinal fatty acid binding protein 2 expression is associated with fat intake and polymorphisms. *J Nutr*. 2010; 140:1411–1417
- Ayala I, Cámara P, Fernández-Pardo J, Flores I, Cascales AI, Gutiérrez Panizo C *et al.* Modelos animales experimentales de

- enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. *An Vet (Murcia)*. 2008; 24: 5-16.
- Bahcecioglu IH, Kuzu N, Metin K, Ozercan IH, Ustundag B, Sahin K, *et al.* Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental non-alcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. *Vet Med Int*. 2010, doi: 10.4061/2010/262179.
- Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and 812 quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-813 tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006; 1125: 76-88.
- Barallobre-Barreiro J, Chung YL, Mayr M. Proteomics and Metabolomics for Mechanistic Insights and biomarker Discovery in cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol*. 2013; 66 (8): 657-661.
- Barker W, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemom*. 2003; 17: 166-173.
- Baskaran V, Sugawara T, Nagao A. Phospholipids affect the intestinal absorption of carotenoids in mice. *Lipids*. 2003; 38: 705-711.
- Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*. 1976; 70: 241-250.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M *et al.* Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem*. 2013; 24:1870-1881
- Bijland S, Mancini SJ, Salt LP. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci*. 2013; 124: 491-507 53.
- Böhm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, *et al.* Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of a-carotene, b-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 221-226.
- Boileau TW, Boileu AC, Erdman Jr JW. Bioavailability of all-trans- and cis-isomers of lycopene. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227: 914-919.
- Borel P, Drai J, Faure H, Fayol V, Galabert C, Laromiguiere M *et al.* Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Ann Biol Clin*. 2005; 63: 165-177.
- Boren J, Ramos-Montoya A, Bosch KS, Vreeling H, Jonker A, Centelles JJ *et al.* In situ localization of transketolase activity in epithelial cells of different rat tissues and subcellularly in liver parenchymal cells. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54 (2): 191-199.
- Bose KS, Agrawal BK. Effect of lycopene from tomatoes (cooked) on plasma antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in grade-I hypertension. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51: 477-481.
- Bowen P, Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C, Sharifi R, Ghosh L, *et al.*

- Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227: 886-893.
- Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G194-198.
- Bravo E, Palleschi S, Aspichueta P, Buque X, Rossi B, Cano A, et al. High fat diet induced non- alcoholic fatty liver disease in rats is associated with hyperhomocysteinemia caused by down regulation of the transsulphuration pathway. *Lipids Health Dis*. 2011; 10: 60.
- Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobsen J. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett*. 2000; 154: 201-210.
- Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz E. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc Nad Acad Sci USA*. 1999; 96: 1129-1134.
- Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feed-back regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res*. 1980; 21: 505-517.
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004; 114: 147-152.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40: 1387-1395.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94: 2467-2474.
- Bunk B, Kucklick M, Jonas R, Munch R, Schobert M, Jahn D, et al. MetaQuant: a tool for the automatic quantification of GC/MS-based metabolome data. *Bioinformatics*. 2006; 22: 2962-5.
- Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci*. 2009; 116: 539-564.
- Cahill GF, Veech RL. Ketoacids? Good medicine? *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2003; 114: 149-163.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993; 14: 303-311.
- Cao G, Prior R. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*. 1998; 44 (6): 1309-1315.
- Carey JO, Neuffer D, Farrar RP, Veerkamp JH, Dohm GL. Transcriptional regulation of muscle fatty acid-binding protein. *Biochem J*. 1994; 298: 613-617.

- Charatcharoenwitthya P, Lindor KD. Lipid metabolism and control in nonalcoholic fatty liver disease. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Watson RR, editors. Nutrition, diet therapy, and the liver. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group; 2010. p. 67–80.
- Clark RM, Herron KL, Waters D, Fernández ML. Hypo- and hyperresponse to egg cholesterol predicts plasma lutein and beta-carotene concentrations in men and women. *J Nutr.* 2006; 136: 601-607.
- Clinton SK. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev.* 1998; 56: 35-51.
- Courtney M, Stahl A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol Aspects Med.* 2013; 34: 516–528.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CPE, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal hepatic and venous-blood. *Gut.* 1987; 28:1221-1227.
- Dakna M, He Z, Yu WC, Mischak H, Kolch W. Technical, bioinformatical and statistical aspects of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) based clinical proteomics: A critical assessment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877 (13): 1250-1258.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology.* 1998; 114: 842-845.
- Delles C, Schiffer E, Von Zur Muhlen C, Peter K, Rossing P, Parving HH *et al.* Urinary proteomic diagnosis of coronary artery disease: identification and clinical validation in 623 individuals. *J Hypertens.* 2010; 28: 2316-2322.
- Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2008; 582: 68-73.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 3010-3014.
- Doerge H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, *et al.* Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology.* 2006; 130 (4): 1245-58.
- Doerge H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid intake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21: 259-268.
- Dominguez DC, Lopes R, Torres ML. Introduction to Proteomics. *Clin Lab Sci.* 2007; 20 (4): 234-244.
- Dongiovanni P, Lanti C, Riso P, Valenti L. Nutritional therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2015; doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.024.
- Dorais M, Gosselin A, Papadopoulos. Greenhouse tomato fruit quality. *Hortic Rev.* 2001; 26: 239-306.

- Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med.* 2010; 103: 71-83.
- During A, Harrison EH. An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Res Int.* 2005; 38: 1001-1008.
- During A, Harrison EH. Chapter 68: Digestion and intestinal absorption of dietary carotenoids and vitamin A. *Physiology of the gastrointestinal Tract.* 4<sup>o</sup> ed. Volume 2, 2006. p. 1735-1752
- Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 157-185.
- Esteve MJ, Farré R, Frígola A, López JC, Romera JM, Ramírez M, Gil A. Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chem.* 1995; 52: 99-102.
- Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 2012-30.
- Fernández C, Schumann K, Herzog R, Fielding B, Frayn K, Schevchenko A, *et al.* Altered desaturation and elongation of fatty acids in hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS ONE.* 2011; 6:e21603-e31615.
- Fernández MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T *et al.* Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science.* 2006; 313: 1628-1632.
- Fernandez-García E, Carvajal-Lerida I, Jaren-Galan M, Garrido-Fernandez J, Perez-Galvez A, Hornero-Mendez D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res Int.* 2012; 46(2):438-450
- Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argiles A, Jankowski V, Girolami M, *et al.* Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18 (4): 1057-1071.
- Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids.* 2011; 2011: 783976.
- Frayn KN. *Metabolic regulation: A human perspective.* Oxford: Blackwell Science Limited. 2003.
- Fruchard JC, Duriez P. Mode of action of fibrates in the regulation of triglycerides and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today.* 2006; 42: 39-64
- Fructuoso S, Sevilla A, Bernal C, Lozano A, Iborra JL, Canovas M. EasyLCMS: 809 Asynchronous web application for automated quantification of LC-MS data. *BMC Res Notes.* 2012; 5: 428.
- Fuhrman B, Elis A, Aviram M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 233: 658-662.

- Fujita K, Nozaki K, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, *et al.* Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology*. 2009; 50 (3): 772-780.
- Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M, Matsushita S, Iijima Y, Aoki K *et al.* Esculeogenin A, new tomato sapogenol, ameliorates hiperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 2400-2406.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxido dismutases: role in redox signaling, vascular function and diseases. *Antioxidant and Redox signaling*. 2011; 15 (6): 1583-1606.
- Gahler S, Otto K, Böhm V. Alterations of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *Food Chem*. 2003; 51:7962-7968.
- Gajic M, Zaripheh S, Sun F, Erdwan Jr JW. Apo-8'-lycopenal and apo-12'-lycopenal are metabolic products of lycopene in rat liver. *J Nutr*. 2006; 136: 1552-1557.
- García-Alonso FJ, Bravo S, Casas J, Pérez-Conesa D, Jacob K, Periago MJ. Changes in antioxidant compounds during the shelf life of comercial tomato juices in different packaging materials. *J Agric Food Chem*. 2009; 57: 6815-6822.
- García-Alonso FJ, Vidal VJ, Ros G, Periago MJ. Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. *Eur J Nutr*. 2012; 51: 415-424.
- García-Canaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. A comprehensive untargeted metabonomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J Proteome Res*. 2011; 10: 4825-34.
- García-Closas R, Berenguer A, Tormo MJ, Sánchez MJ, Quiors JR. Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *Brit J Nutr*. 2004; 91: 1005-1011.
- García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 1995; 48: 825-834.
- García-Valverde V, Navarro-González I, García-Alonso J, Periago M. Antioxidant Bioactive Compounds in Selected Industrial Processing and Fresh Consumption Tomato Cultivars. *Food Bioprocess Technol*. 2011: 1-12.
- Gark VK, Douglas TJ. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase in plants. In: Sabine JR,

- editor. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. Boca Raton (Fla): CRC Press; 1983.p. 29-37.
- Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 317-331.
- Girard-Pipau F, Pompei A, Schneider S, Nano J, Hebuterne L, Boquet X, *et al.* Intestinal microflora short chain and cellular fatty acids influence of a probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Microbial Ecology in Health Disease.* 2002; 14: 220-227.
- Gómez-Coronado Cáceres D. Salida Celular y transporte reverso de colesterol. *Clin Invest Arterioscl.* 2010; 22 (1): 12-16.
- Goñi I, Serrano J, Saura-Calixto F. Bioaccessibility of  $\beta$ -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 5382–5387.
- González I, Lê Cao, KA. Déjean S. MixOmics: Omics Data Integration Project. 2011. URL: <http://www.mixomics.org>
- Gottfries J, Blennow K, Wallin A, Gottfries CG. Diagnosis of dementias using partial least squares discriminant analysis. *Dementia.* 1995; 6: 83–88.
- Gouranton E, Thabuis C, Riollet C, Malezet-Desmoulins, El Yazidi C, Amiot MJ *et al.* Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. *J Nutr Biochem.* 2011; 22 (7): 642-648.
- Greco D, Kotronen A, Westerbacka, J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 294: G1281-7.
- Guha IN, Moore K. F<sub>2</sub>-isoprostanes and the liver. *Prostaglandins and other Lipid Mediators.* 2003; 72: 73-84.
- Gyamfi D, Patel V. Liver Metabolism: Biochemical and Molecular Regulations. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Ross Watson R, editors. Nutrition, Diet Therapy, and the liver. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group; 2010. p. 3-15.
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol.* 2007; 13 (10): 1579-84.
- Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q *et al.* Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature Medicine.* 2003; 9 (3): 294-299.
- Hayes WA, Smith PG, Morris AEJ. The production and quality of tomato concentrates. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1998; 38: 537-564.
- Hedges LJ, Lister CE. Nutritional attributes of tomatoes. *Crop & Food Research Confidential Report.* 2005; No. 1391.
- Helger R, Rindfrey H, Hilgenfeldt J. Direct estimation of creatinine in serum and in urine without deproteinization using a

- modified Jaffé method. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1974; 12: 344-349.
- Helledie T, Antonius M, Sorensen RV, Hertzell AV, Bernlohr DA, Kølvrå S *et al.* Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1740–51.
- Hijona E, Hijona L, Larzabal M, Sarasqueta C, Aldazabal P, Arenas J, Bujanda L. Biochemical determination of lipid content in hepatic steatosis by Soxtec method. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:1495-1499.
- Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr.* 2002, 132: 1012.
- Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Van de Wiele T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev.* 2011; 69(5): 245-258.
- Hozawa A, Jacobs DR, Steffes MW, Gross MD, Steffen LM, Lee DH. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery risk development in young adults (CARDIA/young adult longitudinal trends in antioxidants (YALTA) study. *Clin Chem.* 2007; 53: 447-455.
- Hu KQ, Liu C, Ernst H, Krinsky NI, Russell RM, Wang XD. The biochemical characterization of ferret carotene-9', 10'-monooxygenase catalysing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2006; 281: 19327-19338.
- Hui-Hui T, Jason Pik-Eu C. Non-alcoholic fatty liver disease. *Proceedings of Singapore Healthcare.* 2010; 19 (1): 36-50.
- Iniesta MD, Pérez-Conesa D, García-Alonso J, Ros G, Periago MJ. Folate content in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Influence of cultivar, ripeness, year of harvest and pasteurization and storage temperatures. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 4739-4745.
- Iseki S, Kondo H, Hitomi M, Ono T. Localization of liver fatty acid-binding protein and its mRNA in the liver and jejunum of rats: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Mol Cell Biochem.* 1990; 98:27–33.
- Ishii SK, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 15597-15602.
- Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001; 292: 1160-1164.
- Jacob K, Periago MJ, Böhm. Ros Berrueto G. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of

- oxidative stress and inflammation. *Br J Nutr.* 2008; 99 (1): 137-146.
- Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Bardbori AM, Niknahad H. Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 3612-5.
- Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namiesnik J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci.* 2010; 11:4631-4659.
- Jantos-Siwy J, Schiffer E, Brand K, Schumann G, Rossing K, Delles C *et al.* Quantitative urinary proteome analysis for biomarker evaluation in chronic kidney disease. *J Proteome Res.* 2009; 8: 268-281.
- Jobgen W, Fu WJ, Gao H, Li P, Meininger CJ, Smith SB, *et al.* High fat feeding and dietary L-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue. *Amino Acids.* 2009; 37: 187-98.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. [eds]. Compendium of Tomato diseases. APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA. 1991.
- Kalant D, Cianflone K. Regulation of fatty acid transport. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 309-314.
- Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB. Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002; 227 (10): 845-51.
- Khachik F, Spangler CJ, Smith JC, Canfield Jr LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem.* 1997; 69: 1873-1881.
- Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE *et al.* Identification and characterization of a mammalian enzyme catalysing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem.* 2001; 276: 14110-14116.
- Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, *et al.* Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res.* 2011; 10: 722-31.
- Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta.* 2011; 412: 1297-1305.
- Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T *et al.* Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2007; 20: 351-358
- Kolch W, NeusÜb C, Pelzing M, Mischak H. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev.* 2005; 24: 959-977.
- Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H *et al.* Increased hepatic CD36 expression contributes to

- dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007; 56: 2863-71.
- Kopsell DA, Kopsell DE. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crop. *Trends Plant Sci*. 2006; 11(10): 499-507.
- Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed S, Klein S. Liver, muscle and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1369-1375.
- Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: A novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 27-38.
- Lazzarino G, Amorini AM, Fazzina G, Vagnozzi R, Signoretti S, Donzelli S, et al. Single-sample preparation for simultaneous cellular redox and energy state determination. *Anal Biochem*. 2003; 322: 51-59.
- Lê Cao KA, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12: 253.
- Lee MT, Chen BH. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem*. 2002; 78: 425-432.
- Lee SEL, Lee EH, Lee TJ, Kim SW, Kim BH. Anti-obesity effect and action mechanism of *Adenophora triphylla* root ethanol extract in C57BL/6 obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77: 544-550.
- León Goñi AC, Blanco D, Peña A, Ronda M, González BO, Arteaga ME, et al. Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD. *Rev Electrón Vet*. 2011; 12:1-10.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 2129-2138.
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu YQ, Cao Q, Ren CL, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 502-509.
- Lim JW, Dillon J, Miller M. Proteomic and genomic studies of non-alcoholic fatty liver disease-clues in the pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20 (26): 8325-8340.
- Lindshield BL, Canenen-Adams K, Erdman Jr JW. Lycopene: are lycopene metabolites bioactive? *Arch Biochem Biophys*. 2007; 458: 136-140.
- Liu XJ, Qu D, He F, Lu Q, Wang J, Cai D. Effect of lycopene on the vascular endothelial function and expression of inflammatory agents in hyperhomocysteinemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007; 16 (1): 244-248.
- Liu Y, Wu G, Han L, Zhao K, Qu Y, Xu A et al. Association of the FABP2 Ala54Thr polymorphis with type 2 diabetes, obesity, and metabolic syndrome: a

- population-based case-control study and a systematic meta-analysis. *Gen Mol Res*. 2015; 14 (1): 1155-1168.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193 (1): 265-275.
- Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009; 30: 42-59.
- Martín Gómez MC, Ballesteros González M. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. En: Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, compilador. Monografía XXX: Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2010. p. 113-168.
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Sci Food Agric*. 2002; 82:323-330
- Maruyama C, Imamura K, Oshima S, Suzukawa M, Egami S, Tonomoto M, *et al*. Effect of tomato juice consumption on plasma and lipoprotein carotenoid concentrations and the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokio)*. 2001; 47: 213-221.
- Matafora V, Zagato L, Ferrandi M, Molinari I, Zerbini G, Casamassima N *et al*. Quantitative proteomics reveals novel therapeutic and diagnostic markers in hypertension. *BBA Clinical* 2. 2014: 79-87.
- Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B*. 2005; 827: 76-82.
- Mathieu P, Lemieux I, Despres JP. Obesity, inflammation and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther*. 2010; 87: 407-416.
- Mhairs C, Towler D, Hardie G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007; 100: 328-341.
- Miette V, Abdennour M, Sandrin L, Sasso M. Metabolic steatosis and fibrosis: Review of the Non-invasive tools for diagnosis and screening. In: Mizuguchi Y, editors. *Liver Biopsy in Modern Medicine*. InTech; 2011. p. 35-62.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias PM, Bramley CA, Rice-Evans. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Febs Lett*. 1996; 384 (3): 240-242.
- Minoggio M, Bramati L, Simmonetti P, Gardana C, Lemoli L, Santangelo E *et al*. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab*. 2003; 47: 64-69.

- Mordente A, Guantario B, Meucci E, Silvestrini A, Lombardi E, Martorana GE, *et al.* Lycopene and cardiovascular diseases: an update. *Curr Med Chem.* 2011; 18: 1146–63.
- Moreira EAM, Fagundes RLM, Wilhelm D, Neves D, Sell F, Bellisle F, *et al.* Effects of diet energy level and tomato powder consumption on antioxidant status in rats. *Clin Nutr.* 2005; 24: 1038-46.
- Mosaïques diagnostics and therapeutics AG. Hannover; [citado 1 de octubre 2015] Disponible en: <http://mosaiques-diagnostics.de/>.
- Mullen W, González J, Siwy J, Franke J, Sattar N, Mullan A, *et al.* A pilot study on the effect of short-term consumption of a polyphenol rich drink on biomarkers of coronary artery disease defined by urinary proteomics. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 (24): 12850-7.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res.* 2009; 48: 1-26.
- Navarro-González I, García-Valverde V, García-Alonso J, Periago MJ. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Res Int.* 2011; 44 (5):1528–1535.
- Navarro-González I, Pérez-Sánchez H, Martín-Pozuelo G, García-Alonso J, Periago MJ. The inhibitory effects of bioactive compounds of tomato juice binding to hepatic HMGCR: In vivo study and molecular modelling. *PLoS ONE.* 2014; 9 (1): e83968.
- Neuhoff NV, Kaiser T, Wittke S, Krebs R, Pitt A, Burchard A, *et al.* Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface-enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004; 18: 149-156.
- Nguyen ML, Schwartz SJ. Lycopene stability during food processing. *Exp Biol Med.* 1998; 218: 101-105.
- Nguyen ML, Schwartz SJ. Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technol.* 1999; 53: 38-44.
- Noland RC, Koves TR, Seiler SE, Lum H, Lust RM, Ilkayeva O, *et al.* Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem.* 2009; 284: 22840–52.
- Nuttall FQ, Ngo A, Gannon MC. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: Is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev.* 2008; 24: 438-458.
- Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res.* 2012; ID145754: 1-12.
- Oliveira LPM, De Jesús RP, Freire TO, Oliveira CP, Castro Lyra A, Lyra LGC. Possible molecular mechanisms soy-mediated in preventing and treating nonalcoholic

- fatty liver disease. *Nutr Hosp.* 2012; 27: 991-998.
- Palozza P, Catalano A, Simone RE, Mele MC, Cittadini A. Effect of lycopene and tomato products on cholesterol metabolism. *Ann Nutr Metab.* 2012; 61: 126-134.
- Palozza P, Parrone N, Catalano A, Simone R. Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. *Curr Med Chem.* 2010; 17: 2547-2563.
- Palozza P, Simone R, Catalano A, Monego G, Barini A, Mele MC *et al.* Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF- $\kappa$ B nuclear binding and increase in PPAR $\alpha$  expression. *J Nutr Biochem.* 2011; 22: 259–268
- Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: Implications for non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2007; 132: 2191-2207.
- Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, De Kleijn DP, Teepen H, Van der Wal AC *et al.* Atherosclerosis arterial remodelling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000; 150: 245-325.
- Periago MJ, Garcia-Alonso J, Jacob K, Olivares AB, Bernal MJ, Iniesta MD, *et al.* Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening. *Int J Food Sci Nutr.* 2009; 60: 694-708.
- Peso Echarri P, Frontela-Saseta C, Santaella-Pascual M, García-Alcaráz A, Abdel I, Ros-Berruezo G *et al.* Sodium alginate as seed additive in cultured sea bream (*Sparus aurata*): Does it modify the quality of the flesh? *Food Chem.* 2012; 135: 699-705.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 55-74.
- Pol A, Martin S, Fernández MA, Ferguson C, Carozzi A, Luetterforst R *et al.* Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell.* 2004; 15 (1): 99-110.
- Postic C, Dentin R, Denechaud P, Girard J. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27: 179-192.
- Prior R, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 3273-3279.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity

- (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 3273-3279.
- Qiao YL, Qian JM, Wang FR, Zhen-yu Ma, Wang QW. Butyrate protects liver against ischemia reperfusion injury by inhibiting nuclear factor kappa B activation in Kupffer cells. *J Surg Res.* 2014; 187: 653-659.
- Qiu X, Gao DH, Xiang X, Xiong YF, Zhu TS, Liu LG *et al.* Ameliorative effects of lutein on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol.* 2015; 21 (26): 8061-8072.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Raiola A, Rigano MM, Calafiore R, Frusciante L, Barone A. Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for fortified food. *Mediators of Inflammation.* 2014. ID 139873: 1-16.
- Ramírez-Torres A, Barceló-Batlloiri S, Fernández-Vizarra E, Navarro MA, Amal C, Guillén N *et al.* Proteomics and gene expression analyses of mitochondria from squalene-treated apoE-deficient mice identify short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase changes associated with fatty liver amelioration. *J Proteomics.* 2012; 75: 2563–2575
- Rao AV, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases. *Nutr Res.* 1999; 19: 305-323
- Rao LG, Mackinno ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007a; 18: 109-115.
- Rao MS, Reddy JK. PPARalpha in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology.* 2004; 40: 783-786.
- Rao PV, Lu X, Standley M, Pattee P, Neelima G, Girishesh G, *et al.* Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2007b; 30 (3): 629-637.
- Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, André M, Portugal H *et al.* Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J.* 2005; 387: 455-461.
- Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ : An adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21: 193-230.
- Richelle M, Sánchez B, Tavazzi I, Lambelet P, Bortlik K, Williamson G. Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. *Br J Nutr.* 2010; 103: 1800-1807.
- Riso P, Visioli F, Grande S, Guarnieri S, Gardana C, Simonetti P, *et al.* Effect of tomato-based drink on markers of inflammation,

- immunomodulation and oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 2563-2566.
- Roche M, Rondeau P, Ranjan Singh N, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters.* 2008; 582: 1783-1787.
- Röschlau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im serum. *Z Klin Biochem.* 1974; 12: 403-407.
- Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S *et al.* The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013; 59: 138-143.
- SABiosciences A Qiagen Company. [Citado 1 de septiembre 2015]. Disponible en: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>
- Sánchez Pozo A, Gil A. Metabolismo lipídico tisular. En: Gil A, Sánchez de Medina F, editores. Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2010. p. 280.
- Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90 (7): 4267-75.
- Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, *et al.* Review: Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research.* 2009; 682:39-53.
- Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1994; 1: S35-S38.
- Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ *et al.* Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis.* 2007; 191: 391-396.
- Schnäbele K, Briviba K, Bub A, Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Effects of carrot and tomato juice consumption on faecal markers relevant to colon carcinogenesis in humans. *Br J Nutr.* 2008; 99: 606-613.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmans reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
- Seren S, Lieberman R, Bayraktar UD, Health E, Sahin K, Andic F, *et al.* Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther.* 2008; 15: 66-81.
- Seybold C, Fröhlich K, Bitsch R, Otto K, Böhm V. Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 7005-7010
- Sharma AK, Bharti S, Bhatia J, Nepal S, Malik S, Ray R *et al.* Sesamol alleviates diet-induced cardiometabolic syndrome in rats via up-regulating PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  and

- e-NOS. *J Nutr Biochem.* 2012; 23: 1482-1489
- Sharma SK, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Ital J Food Sci.* 1996; 8 (2): 107-113.
- Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J of Biol Chem.* 2013; 288 (26): 18707-18715.
- Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG, Fang R, et al. Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics.* 2005; 5 (15): 4034-4045.
- Sheriff SA, Devaki T. Lycopene stabilizes liver function during D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatitis in rats. *J Taibah Univ Sci.* 2013; 7: 8-16.
- Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Food Sci Nutr.* 2000; 40: 1-42.
- Shi J, Wu Y, Bryan M, Le Maguer M. Oxidation and isomerization of lycopene under thermal treatment and light irradiation in food processing. *Nutraceut Food.* 2002; 7: 179-183.
- Sies H, Stahl W. Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998; 218: 121-124.
- Silaste ML, Alfthan G, Aro A, Kesäniemi YA, Hörrkö S. Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. *Br J Nutr.* 2007; 98: 1251-1258.
- Sinclair AJ, Bayer AJ, Johnston J, Warner C, Maxwell SR. Altered plasma antioxidants status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1998; 13: 840-845.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16: 144-158.
- Siwy J, Zoja C, Klein J, Benigni A, Mullen W, Mayer B, et al. Evaluation of the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles. *Plos One.* 2012; 7 (12): e51334.
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010; 92: 1189-66.
- Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Rossellini MS, Fernández-Gianotti T, Mallardi P. Circulating levels and hepatic expression of molecular mediators of atherosclerosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 2010; 209: 585-591.
- Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr.* 1992; 122: 2161-2166.

- Stojsavljević S, Gomerčić Palčić M, Virović Jukić L, Smirčić Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20 (48): 18070-18091.
- Stutz H. Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis*. 2005; 26 (7-8): 1254-1290.
- Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B et al. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferators-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 5114–27.
- Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2007; 191: 235-240.
- Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19: 291-302.
- Theodorescu D, Fliser D, Wittke S, Mischak H, Krebs R, Walden M et al. Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis*. 2005; 26: 2797-2808.
- Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol*. 2006; 7: 230-40.
- Thompson KA, Marshall MR, Sims CA, Wei CI, Sargent SA, Scott JW. Cultivar, maturity and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Food Chem*. 2000; 65: 791-795.
- Tomonaga T, Masushite K, Yamagichi S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T et al. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Can Res*. 2004; 10: 2007–2014.
- Tonucci L, Holden J, Beecher G, Khackik F, Davis C, Mulokozi G. Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *J Agric Food Chem*. 1995; 43: 579-586.
- Tsitisimpikou C, Tsarouhas K, Kioukia-Fougia N, Skondra C, Fragkiadaki P, Papalexis P, et al. Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syndrome: A suggestion to alleviate detrimental clinical factors. *Food Chem Toxicol*. 2014; 74: 9-13.
- Um JH, Park SJ, Kang H, Yang ST, Foretz M, McBurney MW, et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes*. 2010; 59: 554–63.

- USDA 2006a. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19.
- USDA 2006b. USDA Database for the flavonoid content of selected foods, Release 2.
- Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 2006; 4: 107-110.
- Van der Wulp MYM, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 368: 1-16.
- Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Sveglia-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis.* 2010; 42: 320-330.
- Verwaerde P, Senard JM, Galinier M, Rougé P, Massabuau P, Galitzky J *et al.* Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *J Hypertens.* 1999; 17 (8): 1135-1143.
- Victor VM, Rocha M, Sola E, Banuls C, García-Malpartida K, Hernández-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2009; 15: 2988-3002.
- Vinaixa M, Rodriguez MA, Rull A, Beltran R, Blade C, Brezmes J, *et al.* Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *J Proteome Res.* 2010; 9: 2527-38.
- Visioli F, Riso P, Grande S, Galli C, Porrini M. Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *Eur J Nutr.* 2003; 42 (4): 201-206.
- Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44: 575-586.
- Vitali A. Proline-rich peptides: multifunctional bioactive molecules as a new potential therapeutic drugs. *Curr Protein Pept Sc.* 2015; 16 (2): 147-162.
- Wang F, Kohan AB, Lo CM, Liu M, Howles P, Tso P. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *J Lipid Res.* 2015; 56 (8): 1403-18.
- Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang X-D. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer.* 2010; 126: 1788-96.
- Watzl B, Kulling SE, Moseneder J, Barth SW, Bub A. A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82: 1052-1058.
- Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2008; 14 (2): 193-199.
- Wessinger EM, Wittke S, Kaiser T, Haller H, Bartel S, Krebs R, *et al.* Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry

- for diagnostic purposes. *Kidney Int.* 2004; 65 (6): 2426-2434.
- Wilcox JK, Catignani GL, Lazarus S. Tomatoes and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43: 1-18.
- Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. Tomatoes and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43 (1): 1-18.
- Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha -and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 2323-8.
- Wong H, Schotz MC. The lipase gene family. *J Lipid Res.* 2002; 43: 993-999.
- Xie ZQ, Li HK, Wang K, Lin JC, Wang Q, Zhao GP, *et al.* Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metab-Clin Exp.* 2010; 59: 554-60.
- Zaripheh S, Boileau TW, Lila MA, Erdman JW Jr. [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *J Nutr.* 2003; 133: 4189-4195.
- Zhang M, Fu G, Lei T. Two urinary peptides associated closely with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0122950.
- Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol.* 2010; 204: 233-240.
- Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, *et al.* Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPAR $\gamma$  in promoting steatosis. *Gastroenterology.* 2008; 134: 556-67.



*Capítulo 8. Resumen / Abstract*



---

## RESUMEN

---

**Introducción:** La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es la alteración hepática de mayor prevalencia en los países occidentales y se caracteriza principalmente por la acumulación de lípidos en el hígado en ausencia de un consumo excesivo de alcohol. La obesidad, diabetes tipo 2, dislipemia e hipertensión suponen importantes factores de riesgo, hasta tal punto que la NAFLD es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico. La fisiopatología de la NAFLD comprende alteraciones tales como la acumulación de triglicéridos en el hígado -consecuencia de la resistencia a la insulina-, que junto con procesos de estrés oxidativo, peroxidación lipídica y aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias pueden conducir a complicaciones como esteatohepatitis (NASH), fibrosis o incluso cirrosis.

Los factores dietéticos pueden modular la esteatosis hepática. De hecho, la modificación del estilo de vida, incluyendo dieta y ejercicio, es crucial para conseguir importantes mejoras. En este sentido, la dieta mediterránea se ha propuesto como estrategia dietética para esta enfermedad por su abundancia en frutas y verduras y menor ingesta de grasas saturadas y azúcares refinados. Entre los alimentos que forman parte de esta dieta, los tomates son una importante fuente natural de antioxidantes, especialmente de licopeno. Estudios previos han mostrado que el consumo de tomates y productos derivados fortalecen el sistema antioxidante e inhiben la peroxidación lipídica en humanos. Además, se ha observado un efecto preventivo del desarrollo de NASH inducida por la ingesta de una dieta alta en grasa en modelos animales, así como un efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica en el hígado de los mismos, tras la ingesta de licopeno.

**Objetivo:** El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto del consumo de zumo de tomate sobre el metabolismo lipídico en el hígado para explicar los posibles mecanismos de acción del licopeno procedente del tomate *in vivo*. Para ello, se llevaron a cabo 2 experimentos empleando ratas Sprague Dawley. El primero se llevó a cabo con ratas normocolesterolémicas, y el segundo en ratas con esteatosis inducida mediante el consumo de una dieta de alto contenido en grasa y colesterol.

**Diseño experimental:** En el estudio 1, 24 ratas macho de 12 semanas fueron divididas aleatoriamente en tres grupos (n=8) y alimentadas durante 3 semanas con dieta estándar de roedor y diferentes bebidas: agua (grupo control), zumo de tomate comercial con bajo contenido en licopeno (grupo 1) y zumo de tomate comercial con alto contenido en licopeno

(grupo 2). Tras el sacrificio se extrajeron muestras de sangre e hígado. Además, se recogieron muestras de heces al inicio y final del periodo experimental.

En el segundo estudio, 24 ratas macho de 8 semanas de edad fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos (n=6) y alimentadas durante 5 semanas del siguiente modo: dieta estándar y agua (NA) o zumo de tomate (NL), dieta alta en grasa y colesterol y agua (HA) o zumo de tomate (HL). Tras este periodo, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de sangre, tejido adiposo, aorta e hígado. Además, se recogieron muestras de orina y heces semanalmente.

**Resultados:** En el estudio 1, se observó un aumento de las concentraciones de colesterol HDL tras el consumo de tomate. A pesar de que las concentraciones de colesterol en el hígado fueron muy similares en los tres grupos, se observó una menor actividad de la enzima HMG-CoA –enzima limitante de la síntesis de colesterol- en hígado en el grupo 2. Respecto a los ácidos grasos de cadena corta analizados en heces, únicamente se halló una concentración de butirato significativamente mayor en el grupo 2.

En el estudio 2, se observó esteatosis en grado 2 en las muestras de hígado de los grupos alimentados con dieta grasa (HA, HL), que se confirmó por las elevadas concentraciones de las enzimas alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, el examen histológico y la presencia de dislipemia. Tras el consumo de tomate se observó una mejoría en la concentración de colesterol HDL en el grupo HL en comparación con HA y una disminución del estrés oxidativo, revelada por la reducción de isoprostanos en orina. En el grupo HL se observó una sobreexpresión de varios genes relacionados con el transporte de ácidos grasos, la hidrólisis lipídica y la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, lo que sugiere una mejoría en el metabolismo lipídico hepático asociada a la ingesta de tomate. Por otra parte, se observó una interesante modificación del perfil peptidómico urinario en el grupo HL, quedando este en una situación intermedia entre los grupos N y el grupo HA, lo cual evidencia que el consumo de zumo de tomate mejora el patrón metabólico en el grupo alimentado con dieta alta en grasa, dirigiéndolo hacia un estado más fisiológico

**Conclusiones:** Estos resultados sugieren que el licopeno procedente del zumo de tomate ejerce un efecto protector frente a la NAFLD y por tanto, el tomate y derivados deberían ser considerados dentro de las estrategias dietéticas recomendadas para su tratamiento. Sin embargo, se necesitan más estudios para elucidar los mecanismos de acción del licopeno en el metabolismo lipídico del hígado, así como para desarrollar un panel de biomarcadores específicos que permitan el diagnóstico y prevención de NAFLD.

---

## ABSTRACT

---

**Background:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disorder in Western countries with a high prevalence. It covers a spectrum ranging from hepatic steatosis to steatohepatitis (NASH), fibrosis and cirrhosis. Obesity, type 2 diabetes, dyslipidaemia and hypertension are most important risk factors; in fact, NAFLD is considered the hepatic manifestation of metabolic syndrome. The hallmark of NAFLD is hepatic lipid accumulation in the absence of significant ethanol consumption.

Two steps or hits have been proposed for the pathophysiology of NAFLD and NASH: the first hit is owed to the triglycerides accumulation as consequence of insulin resistance. The second hit includes oxidative stress, lipid peroxidation, increased cytokine production and inflammation, resulting in NASH.

Dietary factors may modulate liver steatosis. Indeed, lifestyle modification including diet and exercise are crucial to achieve significant improvements. In this regard, the Mediterranean diet has been suggested as the dietary strategy for this disease due to the high consumption of plant-based foods and low intake of saturated fats and refined sugars. Tomato products are a dietary source of natural antioxidants, especially, lycopene. Previous studies have shown the consumption of tomatoes and tomato products strengthened the antioxidant system and inhibited lipid peroxidation in humans. Moreover, lycopene has displayed to have a preventive effect on the development of NASH induced by a high fat diet in animal models, as well as, an inhibitory effect of lipid peroxidation in the liver tissues.

**Objective:** On this basis, the main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the effect of tomato juice on liver lipid metabolism in order to elucidate the possible mechanisms of action of tomato lycopene *in vivo*, using a Sprague Dawley rat model. For that, we carried out 2 experiments involving the intake of tomato juice; firstly with rats fed a standard rodent diet and secondly with rats with diet-induced hepatic steatosis (high-fat and high cholesterol diet).

**Experimental design:** In study 1, 24 male Sprague Dawley rats (12 weeks old) were randomly divided in three groups (n=8) fed to standard diet for rodents and different drink as follows: control group (tap water as drink), group 1 (commercial tomato juice with a low content of lycopene) and group 2 (commercial tomato juice with a high content of lycopene). After three

weeks, rats were sacrificed and blood and liver samples were collected. Furthermore, faeces samples were collected and the beginning and at the end of the experimental period.

In study 2, 24 male Sprague Dawley rats (8 weeks old) were randomly divided in four groups (n=6) fed to standard diet (N) or hypercholesteraemic and high fat diet (H) for 5 weeks and were provided water (A) or tomato juice (L) as drink. After this period, rats were sacrificed and blood, adipose tissue, aorta and liver samples were collected. Moreover, urine and faeces samples were collected weekly.

**Results:** In study 1, significant differences were found in HDL-cholesterol between control and experimental groups, being higher in latter groups. Despite of cholesterol levels in liver were very similar in three groups, an inhibitory effect of the activity of HMG-CoA-R in liver was shown in group 2. Finally, regarding short chain fatty acids (SCFA) analysed in the faeces, only a significantly higher concentration of butyrate was observed in group 2.

In study 2, steatosis grade 2 was observed in groups H which was confirmed by the levels of plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), histological examination and presence of dyslipidaemia. A significant improvement of HDL-c was observed in HL compared with HA, as well as an alleviation of oxidative stress through reduction of urine isoprostanes. In relation to fatty acid gene expression analysed in liver, an overexpression of several genes related to fatty acid transport, lipid hydrolysis and mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation was observed in HL. Interestingly, tomato juice intake partially reverted the metabolic pattern from a high-fat diet to a standard diet even in metabolites not related to the redox state. Furthermore, tomato juice consumption originated an interesting modification in patterns of urinary peptidomic biomarkers in group HL, staying in an intermediate position between group N and HA.

**Conclusions:** In summary, these results suggest that lycopene from tomato juice has a protective effect on NAFLD and therefore, tomato and tomato products should be taken into consideration in the dietary strategies of treatment of NAFLD. However, further researches should be carried out to elucidate the mechanisms of lycopene in liver lipid metabolism in NAFLD and to develop a panel of specific peptidomic biomarkers to lead an early diagnosis and prevention of NAFLD.

*Anexo*



Table 2  
LC-ESI-MS analytical parameters and method performance for compound standards of the quantified metabolites

| Metabolite  | Abbreviation       | Parent ion formula   | Diagnostic ions (relative abundance)    | RT (min) | SIM ion          | LOD <sup>a</sup> (nmol/ml) | LOQ <sup>b</sup> (nmol/ml) | R <sup>2</sup> | Intraday <sup>c</sup> RSD (%) | Interday <sup>c</sup> RSD (%) |
|---|--------------------|--|---|----------|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Glycine   | <b>Gly</b>         | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                 | 76 (82), 98 (8), 150 (52)               | 15.0     | 76               | 4.71                       | 15.71                      | 0.9782         | 8.75                          | 12.21                         |
| L-alanine   | <b>Ala</b>         | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                 | 90 (100), 112 (13), 134 (5)             | 14.3     | 90               | 4.81                       | 16.03                      | 0.9944         | 1.94                          | 8.40                          |
| L-serine  | <b>Ser</b>         | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> <sup>±</sup>                                 | 88 (20), 106 (100), 128 (10)            | 13.2     | 106              | 0.02                       | 0.05                       | 0.9826         | 1.50                          | 9.35                          |
| L-proline   | <b>Pro</b>         | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                 | 70 (2), 116 (100), 138 (10)             | 25.8     | 116              | 0.90                       | 3.00                       | 0.9905         | 1.38                          | 18.24                         |
| L-valine  | <b>Val</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                | 72 (5), 118 (80), 140 (15)              | 12.6     | 118              | 0.83                       | 2.77                       | 0.9935         | 1.14                          | 11.56                         |
| L-threonine   | <b>Thr</b>         | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> <sup>±</sup>                                 | 74 (5), 120 (100), 142 (10)             | 10.0     | 120 <sup>d</sup> | 0.91                       | 3.03                       | 0.9824         | 28.85                         | 6.58                          |
| L-homoserine  | <b>HomoSer</b>     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sup>±</sup>  | 74 (5), 120 (100), 142 (8)              | 14.2     | 120 <sup>d</sup> | 0.28                       | 0.94                       | 0.9981         | 0.79                          | 15.24                         |
| L-cysteine  | <b>Cys</b>         | C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S <sup>±</sup>                               | 102 (10), 122 (42), 144 (44)            | 11.7     | 122              | 0.91                       | 3.02                       | 0.9992         | 1.36                          | 7.91                          |
| Taurine   | <b>Taurine</b>     | C <sub>2</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S <sup>±</sup>                               | 126 (100), 146 (10), 148 (12), 251 (15) | 12.1     | 126              | 3.11                       | 10.36                      | 0.9950         | 2.40                          | 5.86                          |
| Thymine   | <b>Thymine</b>     | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                   | 127 (100), 149 (10), 171 (10)           | 4.0      | 127              | 0.07                       | 0.22                       | 0.9991         | 0.45                          | 13.75                         |
| L-hydroxyproline  | <b>HydroxyPro</b>  | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> <sup>±</sup>                                 | 86 (10), 132 (100), 154 (20)            | 14.1     | 132 <sup>d</sup> | 1.73                       | 5.77                       | 0.9947         | 13.41                         | 18.65                         |
| L-isoleucine  | <b>Ileu</b>        | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                | 86 (50), 132 (100), 154 (10)            | 10.7     | 132 <sup>d</sup> | 0.45                       | 1.50                       | 0.9899         | 0.33                          | 5.20                          |
| L-leucine   | <b>Leu</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                | 86 (50), 132 (100), 154 (10)            | 11.7     | 132 <sup>d</sup> | 0.07                       | 0.25                       | 0.9926         | 1.22                          | 16.74                         |
| L-asparagine  | <b>Asn</b>         | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>±</sup>                   | 87 (10), 133 (100), 155 (10)            | 14.5     | 133 <sup>d</sup> | 1.10                       | 3.66                       | 0.9834         | 1.31                          | 0.93                          |
| L-ornithine   | <b>Orn</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                  | 115 (25), 133 (100), 155 (10)           | 26.5     | 133 <sup>d</sup> | 0.43                       | 1.43                       | 0.9902         | 0.44                          | 2.55                          |
| L-aspartic acid   | <b>Asp</b>         | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> <sup>±</sup>                                 | 121 (20), 134 (100), 200 (75)           | 15.2     | 134              | 6.28                       | 20.93                      | 0.9837         | 2.78                          | 4.98                          |
| L-homocysteine  | <b>HomoCys</b>     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S <sup>±</sup>                               | 90 (10), 136 (100), 158 (10)            | 12.4     | 136              | 1.14                       | 3.82                       | 0.9859         | 0.37                          | 6.79                          |
| Hypoxanthine  | <b>Hypoxan</b>     | C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sup>±</sup>                                | 137 (70), 159 (100), 175 (10)           | 11.0     | 137              | 0.23                       | 0.77                       | 0.9986         | 2.52                          | 10.27                         |
| Acetylphosphate   | <b>Acetyl-P</b>    | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> P <sup>±</sup>                                | 116 (100), 141 (23), 163 (13)           | 15.3     | 141              | 0.76                       | 2.53                       | 0.9910         | 7.76                          | 11.93                         |
| O-phosphorylethanolamine                                  | <b>OPE</b>         | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> P <sup>±</sup>                               | 111 (5), 142 (100), 164 (10)            | 18.0     | 142              | 26.34                      | 87.80                      | 0.9705         | 4.00                          | 8.40                          |
| L-lysine  | <b>Lys</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                  | 84 (8), 130 (30), 147 (100), 169 (8)    | 25.9     | 147 <sup>d</sup> | 0.10                       | 0.35                       | 0.9892         | 1.10                          | 12.60                         |
| L-glutamine   | <b>Gln</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>±</sup>                  | 130 (50), 147 (100), 169 (67)           | 14.7     | 147 <sup>d</sup> | 0.73                       | 2.45                       | 0.9901         | 3.91                          | 9.97                          |
| L-glutamic acid   | <b>Glu</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> <sup>±</sup>                                | 102 (60), 148 (100), 170 (30)           | 14.9     | 148              | 0.37                       | 1.23                       | 0.9882         | 0.64                          | 5.00                          |
| L-methionine  | <b>Met</b>         | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub> S <sup>±</sup>                              | 104 (8), 150 (100), 172 (15)            | 11.6     | 150              | 0.01                       | 0.04                       | 0.9900         | 1.50                          | 3.03                          |
| L-histidine   | <b>His</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                   | 137 (25), 156 (100), 178 (5)            | 15.0     | 156              | 0.24                       | 0.79                       | 0.9801         | 7.08                          | 21.55                         |
| L-carnitine   | <b>Carnitine</b>   | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                  | 149 (1), 162 (100), 184 (5)             | 15.7     | 162              | 0.02                       | 0.08                       | 0.9899         | 4.04                          | 7.96                          |
| L-phenylalanine   | <b>Phe</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                 | 137 (35), 166 (100), 188 (20)           | 9.9      | 166              | 0.74                       | 2.47                       | 0.9987         | 2.08                          | 12.53                         |
| L-arginine  | <b>Arg</b>         | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                  | 140 (5), 175 (100), 197 (2)             | 24.5     | 175              | 0.02                       | 0.08                       | 0.9950         | 1.47                          | 16.47                         |
| L-citrulline  | <b>Citr</b>        | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>±</sup>                  | 159 (19), 176 (100), 198 (18)           | 15.3     | 176              | 0.38                       | 1.26                       | 0.9846         | 26.65                         | 14.25                         |
| Glucosamine   | <b>Glucosamine</b> | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> <sup>±</sup>                                | 162 (35), 180 (100), 202 (10)           | 14.4     | 180              | 3.45                       | 10.95                      | 0.9940         | 14.30                         | 7.96                          |
| L-tyrosine  | <b>Tyr</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> <sup>±</sup>                                 | 163 (15), 182 (100), 204 (5)            | 12.1     | 182              | 0.76                       | 2.55                       | 0.9892         | 0.97                          | 6.40                          |
| O-phospho-L-serine  | <b>P-serine</b>    | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> P <sup>±</sup>                               | 88 (18), 186 (100), 208 (5)             | 16.3     | 186              | 3.24                       | 10.80                      | 0.9923         | 1.19                          | 0.52                          |
| 2-Phosphoglyceric acid                                    | <b>2PG</b>         | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P <sup>±</sup>                                | 187 (92), 209 (33), 231 (19)            | 16.1     | 187 <sup>d</sup> | 1.87                       | 6.23                       | 0.9924         | 0.70                          | 3.17                          |
| 3-Phosphoglyceric acid                                    | <b>3PG</b>         | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P <sup>±</sup>                                | 187 (92), 209 (33), 231 (19)            | 17.1     | 187 <sup>d</sup> | 0.37                       | 1.24                       | 0.9932         | 0.82                          | 4.06                          |
| N-acetyl-L-glutamine                                      | <b>Ac-Gln</b>      | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>±</sup>                  | 172 (15), 189 (80), 211 (60)            | 13.3     | 189              | 5.80                       | 17.90                      | 0.9812         | 2.60                          | 0.63                          |
| L-tryptophan  | <b>Trp</b>         | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>±</sup>                 | 177 (10), 205 (100), 227 (30)           | 10.1     | 205              | 2.99                       | 9.97                       | 0.9897         | 5.13                          | 2.44                          |
| L-cystine   | <b>Cystin</b>      | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> <sup>±</sup>   | 156 (100), 241 (30), 263 (18)           | 17.0     | 241              | 12.07                      | 40.24                      | 0.9577         | 3.97                          | 0.87                          |
| Thymidine   | <b>Thymidine</b>   | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>±</sup>                 | 243 (38), 265 (100), 281 (38)           | 4.2      | 243              | 0.17                       | 0.57                       | 0.9949         | 0.19                          | 1.46                          |
| Biotin  | <b>Biotin</b>      | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sup>±</sup>               | 245 (43), 267 (30), 527 (55)            | 10.8     | 245              | 1.52                       | 5.07                       | 0.9974         | 4.87                          | 16.17                         |
| 2'-Deoxyadenosine   | <b>DA</b>          | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>±</sup>                 | 139 (10), 252 (100), 274 (15)           | 5.2      | 252              | 0.04                       | 0.13                       | 0.9946         | 0.55                          | 13.03                         |
| Glucosamine 6-phosphate                                   | <b>Gluc6P</b>      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>6</sub> P <sup>±</sup>                              | 242 (32), 260 (100), 282 (8)            | 17.4     | 260              | 7.83                       | 26.12                      | 0.9993         | 2.06                          | 5.10                          |
| L-glutathione   | <b>GSH</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sup>±</sup>               | 308 (100), 330 (10), 618 (10)           | 14.6     | 308              | 5.64                       | 18.82                      | 0.9864         | 0.30                          | 6.44                          |
| Thymidine monophosphate                                   | <b>TMP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> P <sup>±</sup>               | 207 (25), 323 (100), 345 (50)           | 14.4     | 323              | 15.8                       | 52.40                      | 0.9799         | 4.10                          | 0.80                          |
| Cytidine monophosphate                                    | <b>CMP</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> P <sup>±</sup>                | 112 (20), 266 (10), 324 (100)           | 16.0     | 324              | 1.25                       | 4.18                       | 0.9881         | 5.07                          | 0.96                          |
| Uridine monophosphate                                     | <b>UMP</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> P <sup>±</sup>                | 172 (90), 325 (100), 342 (25)           | 15.0     | 325              | 26.55                      | 88.51                      | 0.9820         | 3.53                          | 10.67                         |
| Thiamine monophosphate                                    | <b>ThiaMP</b>      | C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> PS <sup>±</sup>              | 122 (25), 345 (100), 367 (15)           | 20.5     | 345              | 2.30                       | 7.60                       | 0.9812         | 12.4                          | 14.66                         |
| Adenosine monophosphate                                   | <b>AMP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P <sup>±</sup>               | 268 (15), 348 (100), 370 (10)           | 14.7     | 348              | 0.64                       | 2.15                       | 0.9910         | 2.04                          | 18.44                         |
| Inosine monophosphate                                     | <b>IMP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> P <sup>±</sup>               | 138 (50), 349 (100), 371 (41)           | 15.4     | 349              | 93.71                      | 312.39                     | 0.9810         | 11.13                         | 23.16                         |
| Guanosine monophosphate                                   | <b>GMP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> P <sup>±</sup>               | 344 (18), 364 (100), 386 (42)           | 16.3     | 364              | 4.48                       | 14.92                      | 0.9885         | 10.29                         | 9.16                          |
| Xanthosine monophosphate                                  | <b>XMP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> P <sup>±</sup>               | 157 (50), 365 (100), 387 (27)           | 15.7     | 365              | 17.85                      | 59.49                      | 0.9945         | 2.57                          | 5.00                          |
| Cytidine diphosphate                                      | <b>CDP</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup>   | 381 (40), 404 (100), 426 (48)           | 16.0     | 404              | 2.32                       | 7.74                       | 0.9822         | 5.48                          | 8.82                          |
| Uridine diphosphate                                       | <b>UDP</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup>   | 301 (95), 405 (100), 427 (60)           | 15.4     | 405              | 73.50                      | 350.02                     | 0.9949         | 2.42                          | 0.93                          |
| Adenosine diphosphate                                     | <b>ADP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup>  | 348 (40), 428 (100), 450 (20)           | 15.7     | 428              | 1.95                       | 5.50                       | 0.9941         | 2.07                          | 9.41                          |
| Guanosine diphosphate                                     | <b>GDP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup>  | 150 (85), 444 (100), 466 (38)           | 16.0     | 444              | 4.70                       | 15.67                      | 0.9940         | 5.33                          | 5.40                          |
| Tetrahydrofolic acid                                      | <b>THF</b>         | C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> <sup>±</sup>                 | 399 (100), 446 (20), 468 (17)           | 16.0     | 446              | 1.06                       | 3.54                       | 0.9930         | 1.55                          | 16.46                         |
| Riboflavin-5'-monophosphate                               | <b>FMN</b>         | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> P <sup>±</sup>               | 399 (30), 457 (100), 479 (30)           | 13.6     | 457              | 2.33                       | 7.76                       | 0.9942         | 2.17                          | 11.57                         |
| Deoxycytidine triphosphate                                | <b>dCTP</b>        | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>   | 397 (50), 468 (100), 490 (75)           | 16.5     | 468              | 10.80                      | 30.70                      | 0.9991         | 18.60                         | 22.16                         |
| Deoxythymidine triphosphate                               | <b>TTP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>  | 419 (40), 483 (100), 505 (50)           | 15.2     | 483              | 34.72                      | 115.75                     | 0.9811         | 0.96                          | 10.09                         |
| Cytidine triphosphate                                     | <b>CTP</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>   | 177 (43), 484 (100), 506 (60)           | 16.7     | 484              | 0.62                       | 2.08                       | 0.9501         | 12.17                         | 8.47                          |
| Uridine triphosphate                                      | <b>UTP</b>         | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>   | 485 (100), 507 (50), 589 (20)           | 15.9     | 485              | 2.25                       | 7.49                       | 0.9961         | 5.56                          | 13.76                         |
| CDP-choline   | <b>CDP-choline</b> | C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup>  | 112 (20), 489 (100), 511 (80)           | 17.0     | 489              | 9.41                       | 31.38                      | 0.9949         | 5.70                          | 4.66                          |
| Deoxyadenosine triphosphate                               | <b>dATP</b>        | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>  | 252 (100), 492 (20), 512 (5)            | 15.3     | 492              | 5.90                       | 18.10                      | 0.9926         | 9.70                          | 5.72                          |
| Adenosine triphosphate                                    | <b>ATP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>  | 410 (15), 508 (100), 530 (20)           | 15.6     | 508              | 7.68                       | 25.62                      | 0.9877         | 1.74                          | 12.51                         |
| Inosine triphosphate                                      | <b>ITP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>  | 475 (50), 509 (100), 531 (49), 553 (35) | 16.4     | 509              | 11.71                      | 30.06                      | 0.9722         | 2.12                          | 8.42                          |
| Guanosine triphosphate                                    | <b>GTP</b>         | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup>  | 213 (15), 524 (100), 546 (30)           | 16.5     | 524              | 22.16                      | 73.86                      | 0.9883         | 9.11                          | 20.40                         |
| L-glutathione oxidised form                               | <b>GSSG</b>        | C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>±</sup>  | 307 (100), 613 (100), 635 (50)          | 16.5     | 613              | 4.09                       | 13.63                      | 0.9913         | 4.84                          | 5.44                          |
| Nicotinamide adenine dinucleotide oxidised form           | <b>NAD</b>         | C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup> | 123 (20), 333 (30), 664 (100), 686 (50) | 15.2     | 664              | 3.44                       | 11.46                      | 0.9943         | 3.08                          | 6.74                          |
| Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form            | <b>NADH</b>        | C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub> <sup>±</sup> | 334 (70), 666 (80), 688 (50)            | 16.0     | 666              | 49.24                      | 164.15                     | 0.9834         | 4.51                          | 7.81                          |
| Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidised form | <b>NADP</b>        | C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> <sup>±</sup> | 123 (50), 744 (100), 766 (37)           | 16.6     | 744              | 3.91                       | 13.03                      | 0.9947         | 2.12                          | 0.83                          |

(continued on next page)

