



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Funcionalidad de los Carotenoides Dietéticos
sobre Biomarcadores de la Esteatosis
Inducida por Dieta Grasa en Ratas: un Enfoque
Preventivo y Terapéutico**

D^a Laura Inés Elvira Torales

2019



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

FACULTAD DE VETERINARIA

**Funcionalidad de los carotenoides dietéticos
sobre biomarcadores de la esteatosis inducida
por dieta grasa en ratas: un enfoque preventivo y
terapéutico**

Dña. Laura Inés Elvira Torales
2019



Funcionalidad de los carotenoides dietéticos sobre biomarcadores de la esteatosis inducida por dieta grasa en ratas: un enfoque preventivo y terapéutico

Memoria presentada por la Maestra en Ciencias en Alimentos D^a. Laura Inés Elvira Torales para optar al grado de Doctor, en el área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología.

Fdo. Laura Inés Elvira Torales

VB^o
El Director

VB^o
El Director

María Jesús Periago Castón

Francisco Javier García Alonso



D^a. María Jesús Periago Castón, Catedrática de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología, y D. Francisco Javier García Alonso, Profesor Titular 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 “**Funcionalidad de los carotenoides dietéticos sobre biomarcadores de la esteatosis inducida por dieta grasa en ratas: un enfoque preventivo y terapéutico**”, realizada por D^a. Laura Inés Elvira Torales, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, 27 de Junio de 2019

Fdo.: Dra. M^a. Jesús Periago Castón

Fdo.: Dr. Francisco Javier García Alonso

AGRADECIMIENTOS

El camino hacia la construcción de esta tesis ha llegado a su fin. Fue un sueño lejano hace varios años, pero que con la fe y esperanza puesta en Dios y el apoyo de muchas personas que contribuyeron de forma directa o indirecta hoy se ha vuelto una realidad. ¡Muchas gracias!

Comienzo ofreciendo mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Jesús Periago Castón, tutora y directora de esta tesis, por aceptar y acoger en su laboratorio a una persona que no conocía y confiar en mí para llevar a cabo este gran proyecto. Esta tesis doctoral es producto de su trabajo constante, amor y dedicación a la investigación. Gracias por guiarme y dirigirme científicamente durante estos 4 años de estudio. Además de tutora y directora, ha tomado el papel de madre y amiga. ¡Muchas gracias por su apoyo incondicional!

En segundo lugar, al Dr. Francisco Javier García Alonso, quien además de ser mi director de tesis, es un gran compañero y amigo. Gracias por su apoyo y ayuda infinita.

Al Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca y a la Secretaría de Educación Pública (Programa PRODEP ITESTB-003) por el apoyo y la beca concedida para realizar mis estudios de doctorado en la Universidad de Murcia. ¡Muchas gracias!

Al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación recibida para el proyecto titulado "*Efecto del consumo de carotenoides antioxidantes (licopeno, luteína y zeaxantina) en marcadores de la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Estudio metabólico y*

molecular” (BFU 2012–38103), que ha permitido la realización del trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

A la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia y al Campus Mare Nostrum, que me concedieron una beca para realizar una estancia en el extranjero, contribuyendo a enriquecer mi trabajo de investigación.

Muchas gracias al Dr. Alejandro Martínez Martínez y al Dr. Joaquín Rodrigo García del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, por permitirme realizar mi estancia predoctoral en el Departamento de Ciencias Biológicas. A todas las personas de su equipo, por su colaboración y ayuda en la realización de mi investigación. Gracias por hacer mi estancia más agradable Manuel, Misael y Gloria.

A todo el equipo del servicio del animalario, especialmente a Nuria por su apoyo y despejar cada una de mis dudas. Gracias

También quiero expresar mi agradecimiento a Rocío, Inma, Gala, Marina, Guillermo y Carlos por el apoyo recibido en el desarrollo y análisis de los estudios *in vivo*.

Agradecer también a cada uno de los profesores, estudiantes y compañeros del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología (Dr. Gaspar, Mamen, Marina, Toñi, Gema, Carmen, Rubén, Amparo, Lorena, Carlos, Clara, Carmen Candel y Ana) por esos momentos agradables e inolvidables que hemos compartido. Inma, Gala, Elvira y Lorena MZ muchas gracias por escucharme y darme ánimos, por ser además de compañeras muy buenas amigas, las quiero chicas. Agradezco

al Dr. Sancho por el apoyo brindado desde el momento en que empecé esta aventura hasta el final de ella. David, Tere, Leticia e Irene me llevo los minutos de risas y buenos instantes que pasamos juntos, los recordaré siempre. ¡Gracias infinitas por hacer esta estancia de cuatro años la mejor de mi vida!

Gracias a mi amiga Sheila por su apoyo incondicional todos estos años en España, por tus consejos, aventuras, maravillosos momentos, pero sobre todo agradezco a Dios y a Alejandra por colocarte de nuevo en mi camino, donde puedo ahora asegurar que “el mundo es muy pequeño”. Nunca me cansaré de agradecerte por las noches de desvelo que compartías conmigo en el hospital y en mi casa para que yo me recuperara pronto de esa mala racha que estaba pasando. Te quiero como a una hermana mi Shey.

Muchas gracias a mis amigas Sofi, Nataly, Priscila, Alba, Silvia y Camila por la alegría infinita y la motivación que me proporcionaron día a día. Con ustedes pude reír, tomarme un café, comer, conocer otros países, pero sobre todo generar lazos que sobrevivirán hasta la eternidad. Lorenzo y Adriana los conocí al final de esta aventura, pero hoy puedo decir que se ganaron un lugar en mi corazón. Gracias

A mis médicos Joaquín Durán, Refugio López, José M. Moraleda y a Eduardo Salido por sus cuidados, atenciones y sobre todo por ayudarme a tener confianza en mí, del “TU PUEDES”. Muchas gracias

Quiero agradecer muy especialmente a mi familia por ayudarme a construir nuevos caminos, retos e ilusiones. Mami gracias por no dejarme caer, por tus mensajes y llamadas de aliento, por contagiarme esa fuerza

y valentía para seguir adelante. Papi no cabe duda de que eres el mejor compañero de aventuras y viajes, gracias por proporcionarme alegrías y confianza en mí, por ser siempre "tu chapi". Ade eres la mejor hermana que Dios me pudo regalar, gracias por tus sabios consejos, por la fuerza y paciencia en los momentos más difíciles. A mi sobrina Camila que me llenaba de felicidad cada vez que estaba en México, como olvidar esas lágrimas que me ganaban por dejarla triste cada vez que regresaba a España. A mi cuñado Rubén, por el apoyo constante y su confianza puesta en mí. También quiero agradecer a mis amigos Abraham y Guadalupe, que siempre estuvieron pendientes de mí, que, a pesar de la distancia, he recibido su apoyo incondicional. Agradezco a la Maestra Edith, que ahora se ha convertido en mi nuevo ángel, gracias por tu hermosa amistad amiga mía, que Dios te ilumine donde estés. A mi tío Vicente por su inspiración y motivación a ser una mejor persona cada día y a su gran apoyo en esta aventura que está por terminar.

A mi familia

*“Cuando siento que estoy a punto de rendirme por alcanzar
mis metas; el amor a Dios, a la vida y a nuestros
semejantes por servir, me renueva las fuerzas”*

Jorge Elvira

LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

1. Elvira-Torales LI, Navarro-González I, González-Barrio R, Martín-Pozuelo G, Doménech G, Seva J, García-Alonso J, Periago-Castón MJ. Tomato juice supplementation influences the gene expression related to steatosis in rats. *Nutrients*. 2018; 10(9): 1215.
2. Elvira-Torales LI, Periago MJ, González-Barrio R, Hidalgo N, Navarro-González I, Gómez-Gallego C, Masuero D, Soini E, Vrhovsek U, García-Alonso FJ. Spinach consumption ameliorates the gut microbiota and dislipaemia in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Food Funct*. 2019; 10(4): 2148–2160.
3. Elvira-Torales LI, Martín-Pozuelo G, González-Barrio R, Navarro-González I, Pallarés FJ, Santaella M, García-Alonso J, Sevilla A, Periago-Castón MJ. Ameliorative effect of spinach on non-alcoholic fatty liver disease induced in rats by a high-fat diet. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(7): 1662.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
REFERENCIAS	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. CAROTENOIDES	11
2.1.1. Estructura química.....	11
2.1.2. Fuente de carotenoides.....	12
2.1.3. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad	16
2.1.4. Requerimientos nutricionales	18
2.2. CAROTENOIDES Y SALUD HEPÁTICA.....	20
2.2.1. Patogénesis de la EHGA	20
2.2.2. β -caroteno.....	24
2.2.3. Licopeno	27
2.2.4. Luteína.....	31
2.2.5. β -criptoxantina	32
2.2.6. Otros carotenoides.....	33
REFERENCIAS	38
3. OBJETIVOS	49
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	53
4.1. ÉTICA BIOMÉDICA	53
4.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA Y DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	53
4.3. ESTUDIOS CON ANIMALES	54
REFERENCIAS	55
5. ESTUDIOS	57
5.1. (ESTUDIO 1): La suplementación de la dieta con zumo de tomate modula la expresión de genes relacionados con la esteatosis en ratas	59
5.1.1. Introducción	61
5.1.2. Materiales y Métodos.....	64
5.1.2.1. Zumo de tomate	64
5.1.2.2. Animales y diseño experimental.....	64
5.1.2.3. Examen histopatológico	67
5.1.2.4. Parámetros bioquímicos del plasma.....	67
5.1.2.5. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo	67
5.1.2.6. Análisis del licopeno mediante cromatografía líquida de alta eficacia	68
5.1.2.7. Estudio de la expresión de genes involucrados en la enfermedad de hígado	68
5.1.2.8. Análisis de los metabolitos del hígado por HPLC-espectrometría de masas (MS)	69
5.1.2.9. Análisis estadístico.....	69
5.1.3. Resultados	70
5.1.3.1. Aumento de peso, volumen de alimento consumido y excreta	70
5.1.3.2. Contenido de licopeno y sus isómeros en el hígado.....	70
5.1.3.3. Examen histopatológico y parámetros bioquímicos.....	73

5.1.3.4. Expresión de genes en el hígado de rata	76
5.1.3.5. Niveles intracelulares de metabolitos hepáticos	78
5.1.4. Discusión	81
5.1.4.1. Señales de esteatosis	81
5.1.4.2. Cambios en la expresión génica relacionados con el hígado graso	84
5.1.4.3. Cambios en los metabolitos hepáticos	89
REFERENCIAS	92
5.2. (ESTUDIO 2): Efecto preventivo de las espinacas en la enfermedad del hígado graso no alcohólico inducida por una dieta alta en grasa en ratas	97
5.2.1. Introducción	99
5.2.2. Materiales y Métodos.....	101
5.2.2.1. Espinacas y preparación de las dietas.....	101
5.2.2.2. Animales y diseño experimental.....	102
5.2.2.3. Examen histopatológico	104
5.2.2.4. Parámetros bioquímicos del plasma.....	104
5.2.2.5. Determinación de biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo.....	105
5.2.2.6. Análisis de carotenoides en la alimentación y el hígado	105
5.2.2.7. Análisis de fibra dietética total y compuestos fenólicos totales en piensos	106
5.2.2.8. Análisis de lípidos en el hígado.....	106
5.2.2.9. Estudio de la expresión de genes implicados en la enfermedad del hígado graso	106
5.2.2.10. Análisis de metabolitos hepáticos por HPLC-MS	107
5.2.2.11. Análisis estadístico.....	107
5.2.3. Resultados	108
5.2.3.1. Composición del alimento, ganancia de peso y volumen de alimento consumido	108
5.2.3.2. Examen histopatológico y parámetros bioquímicos.....	112
5.2.3.3. Contenido de carotenoides, grasas totales, ácidos grasos y colesterol en el hígado	116
5.2.3.4. Expresión génica relacionada con EHGNA	120
5.2.3.5. Metabolitos en el hígado	121
5.2.4. Discusión	128
5.2.4.1. Consumo de carotenoides y biomarcadores de la estetaosis.....	128
5.2.4.2. Bioactividad de dietas suplementadas con espinacas: modulación de la expresión génica	133
5.2.4.3. Cambios en los metabolitos hepáticos	138
REFERENCIAS	140
5.3. (ESTUDIO 2): Efecto del consumo de espinacas en la microbiota intestinal y cambios en el perfil lipídico de ratas con enfermedad de hígado graso no alcohólico inducida por la dieta	145
5.3.1. Introducción	147
5.3.2. Materiales y Métodos.....	150
5.3.2.1. Diseño experimental.....	150
5.3.2.2. Espinacas y preparación de las dietas experimentales	151
5.3.2.3. Inicio de la EHGNA	154
5.3.2.4. Análisis de la microbiota mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	154

5.3.2.5. Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).....	155
5.3.2.6. Análisis de catabolitos fenólicos microbianos mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas con ionización por electrospray (UPLC-ESI-MS/MS).	159
5.3.2.7. Parámetros bioquímicos de plasma e índices de resistencia a la insulina [Log (HOMA-IR)] y sensibilidad a la insulina [QUICKI]	160
5.3.2.8. Análisis estadístico.....	161
5.3.3. Resultados	161
5.3.3.1. Ingesta diaria de nutrientes y compuestos fenólicos.	161
5.3.3.2. Efecto en la producción de microbiota y AGCC	163
5.3.3.3. Catabolitos fenólicos microbianos.....	166
5.3.3.4. Parámetros bioquímicos e índices de resistencia/sensibilidad a la insulina.....	169
5.3.3.5. Estudio de correlación entre las variables analizadas.....	170
5.3.4. Discusión	171
5.3.4.1. Cambios en la composición de la microbiota y concentraciones de AGCC.....	172
REFERENCIAS	177
5.4. (ESTUDIO 3): Efecto de la suplementación de la dieta con carotenoides procedentes de espinacas y tomate en el tratamiento de la esteatosis inducida en ratas	181
5.4.1. Introducción	183
5.4.2. Materiales y Métodos.....	186
5.4.2.1. Obtención de las espinacas, tomate y preparación de las dietas experimentales	186
5.4.2.2. Composición química de las dietas experimentales	187
5.4.2.3. Animales y diseño experimental.....	187
5.4.2.4. Examen histopatológico	190
5.4.2.5. Parámetros bioquímicos del plasma.....	190
5.4.2.6. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo	190
5.4.2.7. Análisis de carotenoides en las dietas, el hígado y las heces.....	191
5.4.2.8. Análisis de lípidos en el hígado y en las heces	191
5.4.2.9. Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces y contenido intestinal	192
5.4.2.10. Estudio de la expresión de genes implicados en la enfermedad de hígado graso	193
5.4.2.11. Western Blot.....	194
5.4.2.12. Análisis estadístico.....	195
5.4.3. Resultados	196
5.4.3.1. Ingesta diaria de nutrientes y carotenoides, reducción de peso y volumen de alimento ingerido	196
5.4.3.2. Examen histopatológico y parámetros bioquímicos.....	200
5.4.3.3. Contenido de carotenoides en el hígado y en las heces	204
5.4.3.4. Contenido de grasa total, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos en el hígado	207
5.4.3.5. Contenido de grasa total y colesterol en materia fecal y AGCC en heces y contenido intestinal	210
5.4.3.6. Identificación de los genes relacionados con la EHNA	215
5.4.3.7. Expresiones de la proteína ACOX1, IGF1, LXR β and APOA1 en el hígado.....	217
5.4.4. Discusión	218

5.4.4.1. Ingesta de carotenoides y su acción en los biomarcadores de esteatosis.....	219
5.4.4.2. Cambios en la concentración de AGCC y su efecto prebiótico	225
5.4.4.3. Componentes bioactivos de espinacas y tomate modulan la expresión génica relacionada con la esteatosis	227
REFERENCIAS	232
6. CONCLUSIONES	241
7. RESUMEN/ABSTRACT.....	247
ANEXOS	255

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En las últimas décadas, los principales carotenoides dietéticos, como el licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina y β -criptoxantina, han despertado un gran interés en la nutrición humana, al actuar como antioxidantes biológicos, contribuyendo a la defensa del organismo contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maiani *et al.*, 2009; Sugiura 2013), desempeñando así mismo, un papel protector en afecciones como la diabetes y las ECV (Coyne *et al.*, 2009), además de impactar en las rutas de señalización celular e influenciar la expresión de ciertos genes o inhibir enzimas específicas involucradas en el desarrollo de ciertas formas de cáncer (Sharoni *et al.*, 2012). La principal fuente de carotenoides de la dieta son especialmente los alimentos de origen vegetal, y a una mayor diversidad de frutas y verduras más cantidad y más tipo de carotenoides se ingerirán. Aunque de forma general, la disponibilidad y posterior absorción y almacenamiento de estos antioxidantes dietéticos en el organismo es amplia, se han descrito valores de biodisponibilidad muy variables, que oscilan, por ejemplo, entre el 3.5% y el 90% para el β -caroteno (Haskell *et al.*, 2012). Esta gran variabilidad se debe a que existen diferentes factores como la estructura del alimento, el pH, las características de hidrofobicidad y el contenido en grasa (Desmarchelier y Borel, 2017), que pueden afectar a su biodisponibilidad, y, por lo tanto, a las concentraciones plasmáticas e hícticas (Maiani *et al.*, 2009) que encontramos tras su ingesta.

Los carotenoides de la dieta se acumulan principalmente en el hígado, desde donde son transferidos para ser transportados por las diferentes lipoproteínas para su liberación en la circulación sanguínea y así ser depositados y almacenados en tejidos específicos (Parker *et al.*, 1999). Aunque, los diferentes carotenoides se almacenan en distintas partes del cuerpo, como puede ser el tejido graso, la próstata, la mácula, el bazo, la epidermis

etc., el principal órgano que actúa como primera reserva es el hígado y la acumulación de estos antioxidantes, así como sus metabolitos, pueden ejercer un efecto positivo en el metabolismo del hepatocito, regulando el estado oxidativo celular en determinadas patologías hepáticas.

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), considerada actualmente como una de las patologías hepáticas crónicas más frecuentes en el mundo, representa un problema clínico grave y en aumento en los países desarrollados y en vías de desarrollo (Azzam y Malnick, 2015; Mikolasevic *et al.*, 2016), que puede presentarse en diferentes estados, desde una esteatosis simple hasta una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con fibrosis hepática y cirrosis, que puede derivar finalmente en carcinoma hepatocelular (Yilmaz *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2016; Ferramosca *et al.*, 2017). En cuanto a los mecanismos involucrados en el metabolismo celular, la acumulación de grasa en el hígado produce un desequilibrio entre la disponibilidad y la eliminación de los lípidos, como consecuencia de la alteración de la β -oxidación de ácidos grasos libres y la secreción de lipoproteínas (Musso *et al.*, 2009). La β -oxidación de lípidos en la mitocondria se ve disminuida, contribuyendo al acumulo de ácidos grasos, (Wei *et al.*, 2008; Musso *et al.*, 2009). Esta disfunción mitocondrial producida durante el hígado graso no alcohólico (HGNA) origina la formación continua de especies reactivas de oxígeno (Wei *et al.*, 2008), produciendo una lipoperoxidación, acompañada de inflamación y favoreciendo la apoptosis en el hepatocito, que conlleva a lesiones consideradas irreversibles en el hígado (Cazanave y Gores, 2010).

Hasta la fecha, las modificaciones en el estilo de vida que incluyen pérdida de peso, aumento de la actividad física y cambios en la dieta siguen siendo la terapia alternativa para el tratamiento de la EHGNA, ya que no hay agentes farmacológicos eficaces aprobados (Kwak y Kim, 2017). La dieta de pacientes con EHGNA incluyen el consumo

excesivo de energía, carbohidratos y lípidos, y la escasez de ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales que son considerados índices de una baja ingesta de alimentos de origen vegetal (Yasutake, *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que una dieta equilibrada y con menor aporte calórico constituye una de las pautas de tratamiento y prevención de la EHGNA, la sustitución de alimentos de origen animal por alimentos de origen vegetal ayuda a conseguir los objetivos propuestos a la vez que incrementa de forma significativa la ingesta de antioxidantes. El tratamiento con antioxidantes de tipo carotenoide en la dieta está considerado como uno de los posibles mecanismos en la terapia de la EHGNA evitando de este modo la progresión hacia EHNA y otro tipo de padecimientos hepáticos crónicos (Bernal *et al.*, 2013; Martín-Pozuelo *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016; Matsuura *et al.*, 2016; Kitade *et al.*, 2017; Elvira-Torales *et al.*, 2019). El posible efecto protector de los carotenoides dietéticos frente la esteatosis, podría explicarse no sólo por su efecto antioxidante, sino que se han postulado otros posibles mecanismos de acción nutrigenéticos a partir de cambios en la expresión génica, incluyendo la modulación del metabolismo lipídico, así como otras rutas metabólicas relacionadas con la enfermedad.

REFERENCIAS

- Azzam H, Malnick S. Non-alcoholic fatty liver disease - the heart of the matter. *World J Hepatol.* 2015; 7(10): 1369–1376.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M, Periago MJ. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem.* 2013; 24(11): 1870–1881.
- Cazanave SC, Gores GJ. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clin Lipidol.* 2010; 5(1): 71–85.
- Coyne T, Ibiebele TI, Baade PD, McClintock CS, Shaw JE. Metabolic syndrome and serum carotenoids: findings of a cross-sectional study in Queensland, Australia. *Br J Nutr.* 2009. 102(11): 1668–1677.
- Desmarchelier C, Borel P. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends Food Sci Technol.* 2017. 69(Part B): 270–280.
- Elvira-Torales LI, Martín-Pozuelo G, González-Barrio R, Navarro-González I, Pallarés FJ, Santaella M, *et al.* Ameliorative effect of spinach on non-alcoholic fatty liver disease induced in rats by a high-fat diet. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(7): 1662.
- Ferramosca A, Di Giacomo M, Zara V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(23): 4146–4157.
- Haskell MJ. The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: betacarotene bioavailability and conversion—evidence in humans. *Am J Clin Nutr.* 2012. 96:1193s–1203s.
- Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10180–10188.
- Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients.* 2017; 9(4): E387.
- Kwak MS, Kim D. Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *Korean J Intern Med.* 2018; 33(1): 64–74.
- Lan QY, Zhang YJ, Liao GC, Zhou RF, Zhou ZG, Chen YM, Zhu HL. The Association between Dietary Vitamin A and Carotenes and the Risk of Primary Liver Cancer: A Case-Control Study. *Nutrients.* 2016; 8(10): E624.
- Maiani G, Periago Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, *et al.* Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(2): S194–S218.
- Martín-Pozuelo G, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J, Hidalgo N, *et al.* The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur J Nutr.* 2015; 54(6): 933–944.
- Matsuura B, Miyake T, Yamamoto S, Furukawa S, Hiasa Y. Usefulness of Beta-cryptoxanthin for nonalcoholic fatty liver diseases. *J Food Nutr Disord.* 2016; 5:3.
- Mikolasevic I, Milic S, Turk Wensveen T, Grgic I, Jakopcic I, Stimac D, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease - A multisystem disease? *World J Gastroenterol.* 2016; 22(43): 9488–9505.
- Murillo AG, DiMarco DM, Fernandez ML. The potential of non-provitamin A carotenoids for the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Biology.* 2016; 5(4): 42.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insight into lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res.* 2009; 48(1): 1–26.

Parker RS, Swanson JE, You CS, Edwards AJ, Huang T. Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proc Nutr Soc.* 1999; 58(1): 155–162.

Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K, Khanin M, Salman H, Veprik A, Danilenko M, Levy J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: a review. *Mol Nutr Food Res.* 2012. 56(2): 259–269.

Sugiura M. Carotenoids: Liver diseases prevention. In: Watson RR and Preedy VR, editors. Bioactive foods as dietary interventions for liver and gastrointestinal disease. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2013. p.421–436.

Wei Y, Rector RS, Thyfault P, Ibdah J. Non-alcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(2): 193–199.

Yasutake K, Kohjima M, Kotoh K, Nakashima M, Nakamuta M, Enjoji M. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(7): 1756–1767.

Yilmaz B, Sahin K, Bilen H, *et al.* Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015; 4(3):161–171.

2. *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos lipofílicos sintetizados por plantas, hongos, algas y bacterias (Johnson, 2002; Milani *et al.*, 2017). En las plantas, los carotenoides contribuyen en el sistema fotosintético y las protegen contra el fotodaño, además de ayudar en la producción de fitohormonas (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Como pigmentos, son responsables de los colores rojo, naranja, rosa y amarillo de las hojas de las plantas, frutas, verduras y algunas aves, insectos, peces y crustáceos (Stahl y Sies, 2003; Rao y Rao, 2007; Saini *et al.*, 2015). Se han identificado más de 750 tipos de carotenoides en la naturaleza, pero solo unos 100 están presentes en cantidades detectables dentro de la dieta humana (Milani *et al.*, 2017). Se han encontrado entre 30 y 40 carotenoides en muestras de sangre humana y solo seis representan más del 95% de los carotenoides hallados en el plasma sanguíneo, siendo los más abundantes el licopeno, la luteína, el β -caroteno, la β -criptoxantina, el α -caroteno y la zeaxantina (Böhn, 2008; Eggersdorfer y Wyss, 2018).

2.1.1. Estructura química

Típicamente los carotenoides están compuestos por cuarenta átomos de carbono formados por la unión de ocho unidades de isopreno enlazadas covalentemente. Estas estructuras pueden ser totalmente lineales o tener anillos en uno o ambos extremos, estos anillos, pueden contener grupos hidroxilo, cetónicos, epóxidos u otros. Los carotenoides pertenecen a dos grupos estructurales: carotenos que contienen átomos de carbono e hidrógeno y xantofilas que contienen al menos un átomo de oxígeno (von Elbe y Schwarts, 2000; Ornelas-Paz *et al.*, 2012). Además, los carotenoides se pueden clasificar en dos categorías, carotenoides con actividad provitamina A (β -caroteno y β -criptoxantina) y

carotenoides sin actividad provitamina A (licopeno y luteína) (Rühl, 2013). Los diferentes carotenoides se originan básicamente por modificaciones en la estructura de base, por ciclación de los grupos finales y por la introducción de grupos de oxígeno que les otorgan sus colores característicos y propiedades antioxidantes (Rao y Rao, 2007). Algunas estructuras de diversos carotenos y xantofilas se muestran en la **Figura 2.1**.

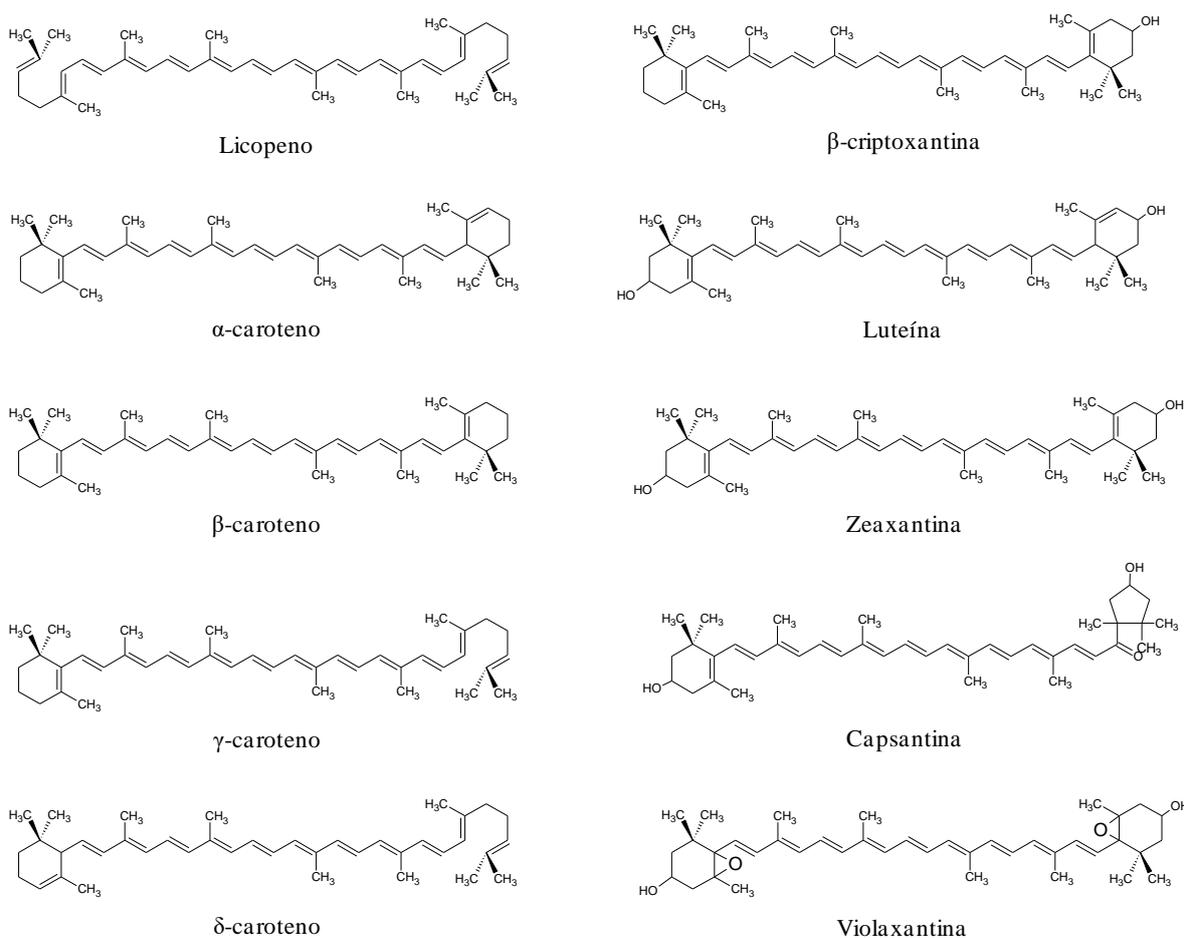


Figura 2.1. Estructuras químicas de los principales carotenoides presentes en los alimentos (fuente: elaboración propia).

2.1.2. Fuente de carotenoides

La principal fuente de carotenoides en la dieta humana son las frutas y verduras, que proporcionan el 80–90% de estos compuestos en países desarrollados y un 82% en países

en vías de desarrollo (Khachik *et al.*, 1997; Woodside *et al.*, 2015). Puesto que los carotenoides no pueden ser sintetizados en el cuerpo humano, son utilizados como biomarcadores para reflejar la ingesta de frutas y verduras, estableciendo una relación directa entre el consumo de vegetales y la concentración sanguínea de carotenoides (Carlsen *et al.*, 2011; Baldrick *et al.*, 2011).

Los carotenoides se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal, pero Britton y Khachik (2009) establecieron una clasificación de las fuentes dietéticas de acuerdo a su contenido de carotenoides, estableciendo fuentes con un contenido bajo (0–0.1 mg/100 g producto fresco), moderado (0.1–0.5 mg/100 g producto fresco), alto (0.5–2 mg/100 g producto fresco) y muy alto (>2 mg/100 g producto fresco).

El β -caroteno es el principal carotenoide presente en la dieta humana. Se encuentra principalmente en frutas y verduras de color amarillo-naranja y verde oscuro, como zanahorias, calabaza, espinacas, papaya, mango, albaricoques y camote (Rodríguez-Amaya *et al.*, 2008; Shete y Quadro, 2013). El licopeno es un carotenoide que carece de actividad de provitamina A y es responsable de los colores rojos a rosa en frutas y verduras como los tomates, toronja roja, sandía, albaricoques, guayaba rosa y papaya (Ferramosca *et al.*, 2017; Latief y Ahmad, 2018). Los tomates y los productos a base de tomate son las fuentes más comunes de licopeno en la dieta humana y representan más del 85% de la ingesta dietética de este carotenoide en América del Norte (Murillo *et al.*, 2016a). Así mismo, en la dieta europea, la ingesta de licopeno a base de tomate y productos de tomate (tomates enlatados, puré, sopas y salsas de tomate) constituye el 57% en Francia, 56% en República de Irlanda y Reino Unido, 61% en los Países Bajos y 97% en España (O'Neill *et al.*, 2001). La luteína es un carotenoide no provitamina A que pertenece a la familia de las xantofilas u oxicarotenoides (Murillo *et al.*, 2016a). Se distribuye en una gran variedad de verduras, como el kale, espinaca y calabaza de invierno, y frutas como mago, papaya,

duraznos, ciruelas y naranjas (Perry *et al.*, 2009). Comercialmente la luteína se extrae a partir de la flor del tagete (*Tagetes erecta* L.) que contienen de 0.1–0.2% de carotenoides, de los cuales 80 son diésteres de luteína (Šivel *et al.*, 2014; González-Barrio 2018). La β -criptoxantina es una xantofila con actividad pro-vitamina A y uno de los carotenoides menos conocidos, suele estar presente en las calabazas, pimientos, zanahorias, naranjas, melocotones, mandarinas y en frutas tropicales como la papaya (Krinsky y Johnson 2005; Grammone *et al.*, 2015; Burri *et al.*, 2016; Latief y Ahmad, 2018). En la **Tabla 2.1** se muestra el contenido de los seis carotenoides más importantes en dieta para diferentes frutas y verduras.

La composición y el contenido de carotenoides en frutas y verduras es muy variable, y depende de factores como la variedad, genotipo, estación, ubicación geográfica/condiciones climáticas, suelo, estado de maduración, tipo de procesamiento y condiciones de almacenamiento (Maiani *et al.*, 2009; Mercadante, 2008; Yahia y Ornelas-Paz, 2010). Generalmente, el contenido de carotenoides en los alimentos no se altera por los métodos comunes de cocción en el hogar (cocción por microondas, cocción al vapor y hervido), pero el calor extremo puede provocar la destrucción oxidativa de los carotenoides (Boon *et al.*, 2010).

Tabla 2.1. Datos de los contenidos de carotenoides principales en frutas y verduras comunes en la dieta humana (mg/100 g).

Alimentos	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α -caroteno	β -caroteno	Licopeno
Aguacate	0.21–0.36	0.01	0.02–0.03	0.02–0.03	0.05–0.08	-
Plátano	0.09–0.19	-	n.d.–0.01	0.06–0.16	0.04–0.13	n.d.–0.25
Durazno	-	-	-	-	-	0.01
Guayaba	-	-	0.02–0.12	n.d.	0.10–2.67	0.77–1.82
Higo	0.08	-	0.01	0.02	0.04	0.32
Kiwi	-	-	-	-	<0.02	<0.01
Mandarina	-	-	0.63–1.06	n.d.	0.11–0.32	-
Mango	-	-	0.02–0.32	n.d.	0.11–1.20	<0.01–0.72
Manzana	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	0.019	n.d.
Maracuyá	-	-	0.18	-	0.36–0.78	-
Naranja	-	-	0.07–0.14	n.d.	0.17–0.48	n.d.
Durazno	-	0.02–0.04	0.004–0.02	-	0.14–0.26	-
Papaya	0.09–0.32	-	n.d.–1.03	n.d.	0.08–0.66	n.d.–7.56
Piña	-	-	0.07–0.12	n.d.	0.14–0.35	0.27–0.61
Sandía	-	-	n.d.	n.d.	0.31–0.78	4.77–13.52
Toronja	-	-	-	-	-	0.75
Tangerina	0.17	Il	0.43	0.03	0.26	-
Uva	0.01	n.d.	n.d.	n.d.	0.02	n.d.
Ciruela	0.08–0.09	n.d.	n.d.	n.d.	0.09–0.14	n.d.
Albaricoque	0.12–0.19	n.d.–0.04	-	n.d.–0.04	0.59–3.80	0.05
Acelga	3.60	0.01	n.d.	n.d.	2.90	n.d.
Alcachofa	0.59–0.63	-	-	-	0.27–0.37	-
Brócoli	0.71–3.30	-	n.d.	n.d.	0.29–1.75	n.d.
Calabaza	0.63	-	0.06	-	0.49	0.50
Camote	0.05	-	-	-	7.83	-
Chícharo	1.91	Il	n.d.	n.d.	0.52	n.d.
Pimiento rojo	0.25–8.51	0.59–1.35	0.25–0.45	n.d.–0.29	1.44–2.39	-
Chile jalapeño	0.84	-	-	0.01–0.17	0.38–8.58	-
Espinaca	5.93–7.90	Il	n.d.	n.d.	3.10–4.81	n.d.
Lechuga	1.00–4.78	-	-	-	0.87–2.96	-
Maíz	0.41	0.22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pepino	0.46–0.84	Il	n.d.	n.d.	0.11–0.27	n.d.
Chile rojo	n.d.	-	-	-	6.53–15.40	-
Repollo	0.45	Il	n.d.	n.d.	0.41	n.d.
Tomate	0.05–0.21	Il	n.d.	n.d.	0.32–1.50	0.85–12.70
Zanahoria	0.25–0.51	Il	n.d.	2.84–4.96	4.35–8.84	n.d.
Kale	4.80–11.47	-	-	-	1.02–7.38	-
Perejil	6.40–10.65	Il	n.d.	n.d.	4.44–4.68	n.d.
Cilantro	6.00–14.80	-	-	2.90–11.30	4.80–8.40	-

Fuente: Maiani *et al.* (2009); Giuffrida *et al.* (2012); Dias *et al.* (2018). -: no incluido en las referencias, n.d.: no detectado o cuantificado, il: incluido en la luteína.

2.1.3. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad

Los carotenoides para ser absorbidos deben extraerse de la matriz alimentaria en la que se ingieren, transferirse a la emulsión de lípidos, incorporarse en las micelas que contienen lipasas pancreáticas y sales biliares, y luego estar disponibles para el transporte a los enterocitos (Rodríguez-Amaya, 2008; Saini *et al.*, 2015; Marze, 2015). La bioaccesibilidad de los carotenoides en vegetales es notablemente baja y estos compuestos se caracterizan por una tasa de absorción lenta ya que su estructura química interactúa profundamente con las macromoléculas dentro de la matriz alimentaria de las plantas (van Het Hof *et al.*, 2000).

Los factores que influyen en la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los carotenoides se pueden clasificar en dos grupos: (i) los relacionados con los carotenoides que incluyen la dosificación, la estructura química (formas isoméricas) y las interacciones entre los carotenoides; (ii) los no relacionados con los carotenoides que incluyen el procesamiento y almacenamiento de alimentos (crudos, deshidratados, congelados, cocinados), composición de la comida, tamaño de las partículas de los alimentos digeridos, biométrica de los consumidores y la eficiencia de transporte a través del enterocito (Maiani *et al.*, 2009; Rein *et al.*, 2013; Reboul, 2013; Donhowe y Kong, 2014; Lemmens *et al.*, 2014; Colle *et al.*, 2016; Desmarchelier y Borel, 2017). Entre los factores no relacionados, el tratamiento o procesado térmico de los alimentos aumenta la accesibilidad y biodisponibilidad de los carotenoides, debido a la ruptura de las paredes celulares y de los enlaces con otras macromoléculas, facilitando la liberación de los carotenoides y mejorando su absorción (Bernhardt y Schlich, 2006; Fernández-García *et al.*, 2012; Priyadarshani, 2017). El aumento de la biodisponibilidad de los carotenoides, cuando las temperaturas de procesado son superiores a 100 °C (enlatado y esterilización), se ha

asociado con la isomerización, ya que los isómeros *cis* (Z) son más biodisponibles (Maiani *et al.*, 2009). Además, el procesado mecánico, como el picado, y la masticación ayuda a reducir el tamaño de las partículas y libera los carotenoides de los cloroplastos y tejidos, aumentando su bioaccesibilidad (Yeum y Russell, 2002; Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Goltz *et al.*, 2012).

Otro de los factores que influyen en la biodisponibilidad de estos compuestos sería la presencia de otros componentes de la dieta. Así la presencia de grasa tiene un efecto positivo, y una ingesta de 3 a 5 g de grasa es esencial para la absorción óptima de los carotenoides ya que favorece su incorporación a la micela facilitando su posterior absorción (Roodenburg *et al.*, 2000; Periago *et al.*, 2013). Incluso algunos estudios han demostrado que los ácidos grasos de cadena media o larga, como el ácido oleico, resulta más beneficioso para la absorción de carotenoides no polares (carotenos) que de los no polares (xantofilas), al favorecer su incorporación en la micela (Lakshminarayana *et al.*, 2009; Victoria-Campos *et al.*, 2013). Por el contrario, la presencia de fibra dietética y la unión a proteínas afecta negativamente a su accesibilidad. La fibra dietética disminuye la absorción de los carotenoides al atraparlos e interactuar con los ácidos biliares, lo que conduce a un incremento de la excreción fecal de grasas y sustancias liposolubles como los carotenoides (Hoffmann *et al.*, 1999; Lemmens *et al.*, 2014). En el caso del complejo proteína-carotenoide (como por ejemplo la luteína y zeaxantina en espinacas) y la forma microcristalina de algunos carotenoides (como el licopeno en tomate o β -caroteno en zanahoria) los hace menos disponibles en comparación con aquellos que están completamente sumergidos en gotitas de lípidos (Soukoulis y Böhn, 2018; Fiedor y Burda, 2014).

Para evaluar la biodisponibilidad también hay que evaluar el estado fisiológico del consumidor. Se puede modificar la biodisponibilidad de los carotenoides por infestaciones

parasitarias (por helmintos intestinales) y cuando hay enfermedades que producen disfunción intestinal, observando alteraciones en la captación de carotenoides y en la bioconversión (Maiani *et al.*, 2009). Además, la edad parece ser otro factor que contribuye a la biodisponibilidad de los carotenoides, existiendo una relación directa entre las concentraciones de carotenoides plasmáticos y el consumo de alimentos vegetales en grupos de adultos jóvenes, pero no en grupos de edad avanzada (Jansen *et al.*, 2004), lo que podrían indicar una menor biodisponibilidad asociada a la edad.

2.1.4. Requerimientos nutricionales

Para mantener un elevado contenido de carotenoides en la dieta hay que considerar las fuentes dietéticas, los factores que influyen en su biodisponibilidad y la frecuencia de ingesta. Como se ha comentado anteriormente, las concentraciones séricas de carotenoides se utilizan como biomarcador para establecer la ingesta dietética de frutas y verduras (Brevik *et al.*, 2004; Böhn *et al.*, 2015; Böhn *et al.*, 2017). Sin embargo, la ingesta dietética y las concentraciones séricas de carotenoides muestran una alta variabilidad entre sujetos de diferentes poblaciones, así como entre individuos de una misma población (Riboli *et al.*, 1988; Olmedilla *et al.*, 2001), lo que puede deberse a la disponibilidad geográfica de frutas y verduras, estatus socioeconómico y factores culturales (Elia y Stratton, 2005). Así en los países europeos la ingesta total de carotenoides varía de 9.5 a 16 mg/día (3 a 6 mg/día para el β -caroteno), siendo la principal fuente dietética las verduras y las frutas (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2018). En Estados Unidos la ingesta promedio de licopeno varía de 6.6 a 10.5 mg/día para los hombres y 5.7–10.4 mg/día para las mujeres, del cual más del 85% de la ingesta proviene de tomates y productos de tomate (salsa, pasta, sopa, zumo y salsa cátsup) (Stice y Wang, 2018). La ingesta de carotenoides en la dieta de diversos países se muestra en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Consumo dietario de carotenoides en diferentes países (los datos son reportados como media y [mediana]).

Muestra (N), país	Mujeres/Hombres (Edad)	Consumo dietario (mg/día)					Total
		α -car	β -car	β -crip	Lut/ Zea	Lico	
EUROPA							
N=1968, Italia	M, H (> 1)	0.15	2.6	0.17	4.01	7.38	14.31
N=75, Francia	M, H (25–45)	[0.74]	[5.84]	[0.45]	[2.50]	[4.75]	14.28
N=65, Irlanda del Norte	M, H (25–45)	1.04	5.55	0.99	1.59	5.01	14.18
N=71, Reino Unido	M, H (25–45)	[1.04]	[5.55]	[0.99]	[1.59]	[5.01]	14.18
N=73, Irlanda	M, H (25–45)	1.23	5.16	0.78	1.56	4.43	13.16
N=72, Holanda	M, H (25–45)	0.68	4.35	0.97	2.01	4.86	12.87
N=159, Suecia	M (56–75)	1.03	3.47	0.46	2.64	2.15	9.75
N=3000, España	M, H (18–64)	0.27	1.46	0.32	1.24	3.06	6.35
OCEANÍA							
N=91, Australia	M (18–70)	[2.0]	[6.87]	-	[2.28]	[5.05]	16.2
AMÉRICA							
N=459, Costa Rica	115 M (59±10)	0.73	4.67	0.55	2.89	5.77	14.61
	344 H (56±11)	0.45	3.41	0.38	2.41	5.45	12.10
N=402, EE. UU. (Afroestadounidense)	155 H (34–84)	[0.33]	[2.21]	[0.11]	[1.85]	[3.16]	7.66
	247 M (34–84)	[0.25]	[2.21]	[0.13]	[1.93]	[2.60]	7.12
N=50, República Dominicana	M, H (50–90)	0.7	2.7	0.22	1.33	1.46	6.41
EE. UU.	M, H (\geq 20)	0.4	1.9	0.2	1.4	1.4	5.3
N=55950, Brasil	M, H (\geq 10)	0.16	0.92	0.16	0.83	0.83	2.9

Fuente: O'Neill *et al.* (2001); Lucarini *et al.* (2006); Rodríguez-Concepción *et al.* (2018).

Hasta la fecha no se han publicado recomendaciones específicas en relación con la ingesta de carotenoides; solo para los carotenoides provitamina A existe una recomendación diaria, en el caso de no consumir otras fuentes de esta vitamina.

Así se aconseja consumir de 10.8–21.6 mg/día con el fin de proporcionar la dosis diaria recomendada de retinol (900 a 700 μg de equivalentes/día) en adultos sanos (Ranard *et al.*, 2017). Para los demás carotenoides se han publicado algunas recomendaciones según el efecto deseado sobre la salud. Grune *et al.* (2010) proponen un consumo diario de 7 mg de β -caroteno para cubrir la necesidad básica de este carotenoide. Para el licopeno, la ingesta de 5 a 7 mg diario se ha recomendado en personas sanas para mantener los niveles circulantes de este carotenoide, con el fin de combatir el estrés oxidativo y la prevención de enfermedades crónicas (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006). Heath *et al.* (2006) reportaron que se pueden requerir concentraciones más altas de licopeno (35–75 mg/día) cuando hay una enfermedad, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Un nivel de ingesta diaria de hasta 10 mg de luteína y zeaxantina se ha recomendado para el tratamiento de la degeneración macular temprana relacionada con la edad (Huang *et al.*, 2015). Se ha sugerido una ingesta de 3 mg/día de β -criptoxantina para el tratamiento en pacientes con EHGNA (Matsuura *et al.*, 2016). No obstante, estas recomendaciones se basan en estudios de intervención y son propuestas por investigadores, no existiendo unas recomendaciones oficiales.

2.2. CAROTENOIDES Y SALUD HEPÁTICA

2.2.1. Patogénesis de la EHGNA

El hígado es el órgano más grande y vital del cuerpo y está involucrado en numerosos procesos metabólicos como son la regulación de hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

También, realiza funciones específicas como síntesis de hormonas esteroideas, desintoxicación de fármacos y conjugación de la bilirrubina (Gyamfi y Patel, 2017).

Las enfermedades más comunes del hígado se deben a infecciones víricas, al consumo de alcohol, a las enfermedades autoinmunes, la isquemia y los trastornos genéticos (Cabré Gelada *et al.*, 2017). La obesidad también se asocia con el daño hepático, y se relaciona con un mayor riesgo de enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) (Fabbrini *et al.*, 2010). Esta enfermedad afecta del 25–45% de la población general y tiene una mayor prevalencia en pacientes diabéticos y obesos. Investigaciones recientes han demostrado que en Estados Unidos más de un tercio de los adultos y el 17% de los jóvenes son obesos. Entre estos, del 70–80% tienen EHGNA (Singhal *et al.*, 2018). La prevalencia de la EHGNA en Sudamérica (evaluada por ecografía) se estimó en alrededor de 30.45%, parece ser la más alta que la tasa reportada para los Estados Unidos (20.0–29.9%). Un meta-análisis publicado en 2016 reportó una prevalencia promedio de 23.71% en Europa, variando de 5–44% en diferentes países (Younossi *et al.*, 2018). Se estima que en los próximos 20 años la EHGNA se convertirá en la principal causa de morbilidad y mortalidad relacionada con el hígado, siendo una de las principales causas para el trasplante de hígado (Calzadilla Bertot y Adams, 2016).

La EHGNA hace referencia a la acumulación de grasa excesiva en más del 5% de los hepatocitos, sin una ingesta significativa de alcohol (Mencin y Lavine, 2011), y abarca desde una esteatosis con inflamación, hasta progresar a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), fibrosis, cirrosis, y en algunos casos, carcinoma hepatocelular (Sayiner *et al.*, 2016). El mecanismo subyacente para la progresión de la esteatosis a la inflamación y la fibrosis no se conoce completamente, aunque está implicada la resistencia a la insulina, los trastornos en el metabolismo lipídico y el estrés oxidativo (Shiota y Tsuchiya, 2006; Rolo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). Actualmente, la hipótesis que se ha propuesto para

explicar la patogénesis de la EHNA defiende la existencia de dos impactos o *hits*, el primer hit se debe a la resistencia a la insulina y la sobrecarga de lípidos, que conducen a una esteatosis hepática simple, y el segundo hit involucra al estrés oxidativo, la peroxidación lipídica, la inducción de citoquinas proinflamatorias y el proceso de inflamación, las cuales son las principales causas que dirigen a la presencia de la EHNA (Ota *et al.*, 2007; Tilg y Moschen, 2010; Rolo *et al.*, 2012). La sobrecarga de lípidos es causada por una mayor entrada de ácidos grasos libres (AGL), dando lugar a la lipogénesis *de novo*. La resistencia a la insulina, asociada al síndrome metabólico, también incrementa la acumulación de grasa hepática aumentando la liberación de ácidos grasos libres y simulando procesos anabólicos (Rolo *et al.*, 2012; Cusi, 2012). El exceso de AGL se almacena en gotitas dentro del hepatocito, dando como resultado la esteatosis, que induce la respuesta inmune innata, con el reclutamiento de células inmunes como los macrófagos y las células T. Como consecuencia del exceso de grasa intracelular y al deteriorarse la capacidad oxidativa mitocondrial, se produce la oxidación en los peroxisomas y microsomas, originando un aumento de la peroxidación lipídica que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), dañando las proteínas y el ADN. Las células de Kupffer (macrófagos del hígado) producen citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en respuesta al estrés oxidativo, mediando la respuesta inflamatoria que puede provocar daño y muerte celular. Así, el estrés oxidativo junto con la inflamación conduce a la fibrogénesis, una característica fundamental de la progresión de esteatosis a EHNA (Karadeniz *et al.*, 2008).

Los mecanismos que representan la patogenia de la EHGNA se presentan en la **Figura 2.2**. La ruta KEGG para la EHGNA (hsa04932) se puede consultar en el **Anexo 1** (Kanehisa y Goto, 2000), este mapa muestra una progresión dependiente de la etapa de la EHGNA. Aunque se conoce la patogenia y evolución de la EHGNA a EHNA, no existe

un acuerdo sobre los agentes farmacológicos más eficaces para su tratamiento. Sin embargo, los antioxidantes, como los carotenoides pueden jugar un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo al evitar o retrasar la oxidación, al neutralizar radicales libres, secuestrando al oxígeno singlete e inhibiendo la progresión de esteatosis a esteatohepatitis (Sugiura, 2013). De hecho, diversas investigaciones han mencionado que los carotenoides como el β -caroteno, el licopeno, la luteína y la β -criptoxantina, tienen efectos antioxidantes contra la peroxidación de lípidos en el hígado de ratas (Chen y Tappel, 1996; Whittaker *et al.*, 1996; Werman *et al.*, 1999).

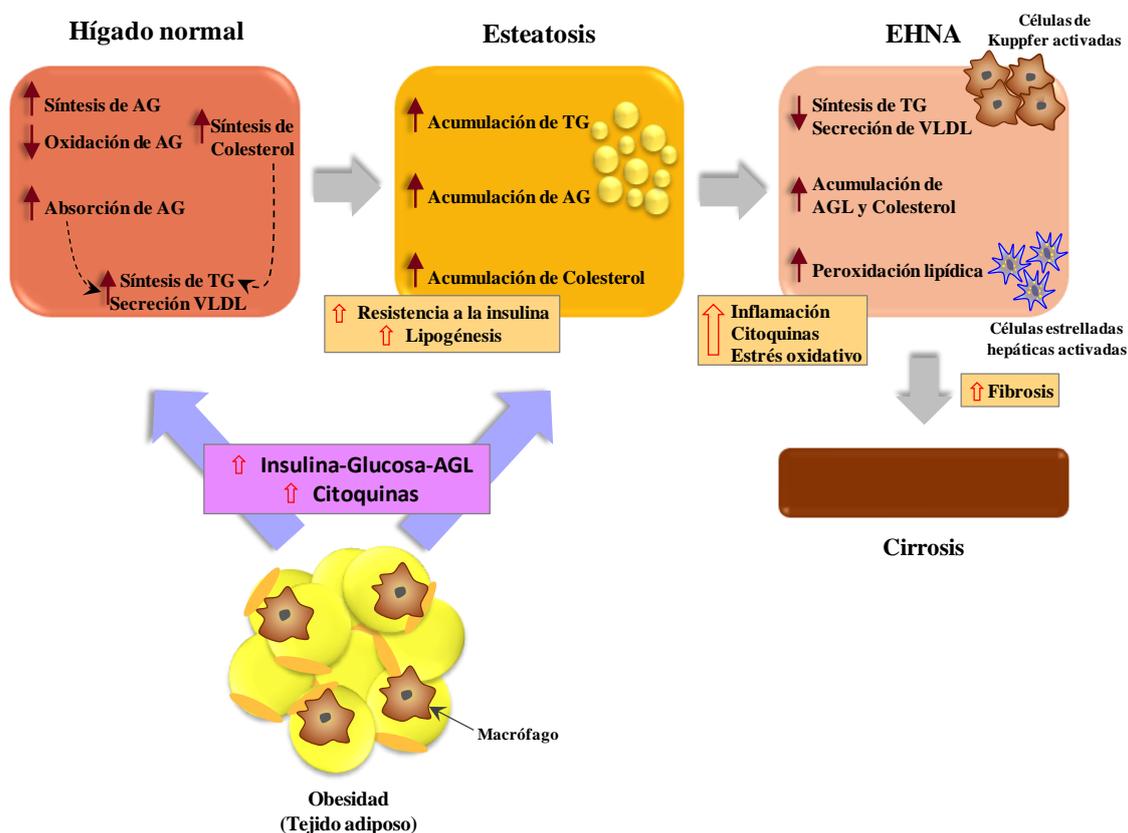


Figura 2.2. Esquema de la patogénesis de la EHGNA. AG: ácidos grasos, TG: triglicéridos, AGL: ácidos grasos libres. Fuente: Fon Tacer y Rozman (2011); Kitade *et al.* (2017).

Además, los carotenoides en la dieta aparte de ser una parte importante del sistema de defensa antioxidante también son precursores de vitamina A que puede ayudar a rejuvenecer la forma de las células estrelladas hepáticas, previniendo la progresión de la fibrosis a carcinoma hepatocelular (Senoo *et al.*, 2010). En un estudio longitudinal retrospectivo, con 3336 chinos adultos de edad media, se ha observado que en los niveles más elevados de carotenoides en suero están asociados a la mejora de los indicadores de EHGNA mediada por una reducción de la proteína transportadora de retinol tipo 4 (*RBP4*), triglicéridos, HOMA-IR e índice de masa corporal (Xiao *et al.*, 2019). Teniendo en consideración que los principales carotenoides de la dieta tienen un efecto positivo para prevenir o tratar la EHGNA, sus posibles efectos sobre la salud hepática, de forma individualizada, se describen a continuación.

2.2.2. β -caroteno

Este carotenoide tiene una función importante como precursor de la vitamina A y tiene un impacto directo en la lucha contra los ROS, protegiendo al organismo contra el estrés oxidativo (Burri, 2002; Sarni *et al.*, 2005). Investigaciones recientes han demostrado los posibles efectos preventivos y protectores del β -caroteno sobre la esteatosis hepática, la fibrosis, el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis (Yilmaz *et al.*, 2015). Además, este potente antioxidante sirve como una prohormona que, a través del metabolismo se convierte en ácido retinoico, que funciona como un ligando, regulando la expresión de los genes involucrados en los procesos metabólicos (Seif El-Din *et al.*, 2015).

Los estudios experimentales han demostrado el potente efecto hepatoprotector del β -caroteno realizado en modelos animales, líneas celulares y seres humanos. Baybutt y Molteni (1999) encontraron que la suplementación dietética de β -caroteno posee un efecto protector sobre el daño hepático, demostrando que las ratas con esteatosis inducida por

monocrotalina, disminuyeron la acumulación de grasa y las hemorragias en el hígado. Patel y Sail (2006), indicaron que el β -caroteno protege los antioxidantes fisiológicos contra la carcinogénesis inducida por la aflatoxina-B1 en ratas albinas. Otro estudio con ratas demostró que la suplementación con β -caroteno aumenta los niveles de vitamina C, glutatión y enzimas relacionadas con glutatión, funcionando como eliminadores de radicales libres y, consecuentemente reduciendo la toxicidad de la aflatoxina-B1 (Kheir Eldin *et al.*, 2008). En otro estudio se observó que la suplementación con (9Z)- β -caroteno (isómero de β -caroteno) disminuyó las concentraciones de colesterol en plasma y la aterogénesis, inhibiendo la acumulación de grasa y la inflamación en el hígado de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Esto podría deberse a la regulación transcripcional de citoquinas inflamatorias, como la molécula de adhesión de células vasculares (*VCAM-1*), interleucina 1 α (*IL-1 α*), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (*MCP-1*), interferón- γ (*INF- γ*) (Harari, 2008). Ozturk *et al.* (2009) observaron que la ingesta dietética de albaricoque, cuyo carotenoide principal es el β -caroteno, redujo los riesgos de esteatosis hepática y el daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl_4) en ratas Wistar. Los marcadores de estrés oxidativo como malondialdehído (MDA), niveles totales de glutatión (GSH), catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y actividades de GSH peroxidasa (GSH-Px) se alteraron significativamente por CCl_4 . Sin embargo, el daño hepático y la esteatosis impuesta por la alta concentración de ROS se mejoraron con la ingesta de albaricoques ricos en β -caroteno. En otra investigación, se muestra que el tomate Campari, que contiene más β -caroteno y licopeno que el tomate normal, mejora la obesidad inducida por la dieta, la dislipidemia y la hepatoesteatosis a través de la regulación génica relacionada con la lipogénesis en el modelo de pez cebra, disminuyendo a nivel transcripcional la expresión del factor 1 de transcripción de unión al elemento regulador del esterol (*SREBF1*) y aumentar la expresión del gen del factor de clase O de

caja de horquilla (*FOXO1*) (Tainaka *et al.*, 2011). Otros alimentos ricos en β -caroteno, como las bayas de goji (*Lycium barbarum*), también han mejorado la fibrosis hepática, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en un modelo de ratas con esteatosis celular inducida por una dieta alta en grasa. Estos efectos beneficiosos se debieron a la modulación del factor de transcripción NF- κ B, la vía MAPK y el proceso autofágico (Xiao *et al.*, 2013).

En cuanto a estudios llevados a cabo con humanos, Villaça Chaves *et al.* (2008) encontraron que la EHGNA tiene una relación inversa con el estado nutricional de la vitamina A en individuos con obesidad de clase III, observando niveles bajos de retinol y β -caroteno en suero en pacientes con EHGNA, lo que conlleva una asociación significativa entre la resistencia a la insulina con los niveles de retinol y β -caroteno. Liu *et al.* (2010) encontraron que en un sistema de cultivo celular, el β -caroteno podría disminuir la hepatoestosis inducida por el virus de la hepatitis C (VHC) mediante la inhibición de la replicación del ARN. A través de su actividad de provitamina A y su función en la inhibición de especies reactivas de oxígeno, se ha confirmado que el β -caroteno tiene un efecto positivo en la progresión del virus de la hepatitis (VHB y VHC) evitando el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Yadav *et al.*, 2002). Un estudio de casos y controles exploró las asociaciones entre la ingesta dietética de vitamina A y carotenos (β -caroteno), y el riesgo de cáncer primario de hígado (CPH). Para ello, utilizaron un cuestionario de frecuencia alimentaria con el fin de evaluar la ingesta dietética habitual y mediante un análisis de regresión logística, los investigadores observaron que un mayor consumo en la dieta de retinol, carotenos y vitamina A (1000 μ g RE/día) obtenida de fuentes alimenticias se asocia con un menor riesgo de CPH. Los investigadores encontraron también que una ingesta de 2,300 μ g de RE/ día de vitamina A total en la dieta fue la que obtuvo el riesgo más bajo de CPH (Lan *et al.*, 2016). Además, un estudio reciente en el que incluyó 62 pacientes con EHGNA y 24 sujetos control demostró que los

niveles séricos de β -caroteno y la proporción de β -caroteno a retinol (SC/SR) en pacientes con EHGNA (esteatosis hepática, inflamación y fibrosis) fueron significativamente más bajos que en los controles. De acuerdo con esto, los investigadores indican que tanto el β -caroteno como el SC/SR disminuyen gradualmente con la progresión de la enfermedad; desde el hígado normal, esteatosis hepática, hasta el límite de la esteatohepatitis. Estos resultados mostraron que una menor concentración de β -caroteno circulante y una relación SC/SR están asociados con la gravedad histológica de la EHGNA (Wang *et al.*, 2019).

2.2.3. Licopeno

El principal efecto protector del licopeno se debe a su efecto antioxidante a través de la inactivación de los ROS y la extinción de los radicales libres (Britton, 1995). Más allá de su capacidad antioxidante, hay muchos otros mecanismos potenciales no antioxidantes por los cuales el licopeno puede proteger contra enfermedades crónicas, incluida la regulación de la expresión de génica, uniones tipo hendidura (gap junctions), capacidad antiproliferativa, modulación inmunológica y hormonal, entre otras (Heber y Lu, 2002; Stahl *et al.*, 2006; Rao y Rao, 2007). Es por ello, que el licopeno es uno de los carotenoides más estudiados en la prevención y tratamiento de la EHGNA (Yilmaz *et al.*, 2015).

Se ha confirmado que este antioxidante tiene un potencial efecto hepatoprotector en la hepatitis inducida por D-galactosamina/lipopolisacárido (D-GaIN/LPS) en ratas, afectando el metabolismo de las lipoproteínas, restaurando los niveles alterados de enzimas metabolizadoras de lípidos y estabilizando la disposición de los niveles de lipoproteínas (Shivashangari *et al.*, 2006; Sheriff y Devaki, 2012). Un estudio realizado por Wang *et al.* (2010) investigaron el efecto protector de la ingesta de licopeno y extracto de tomate en la hepatocarcinogénesis promovida por la EHNA en un estudio *in vivo*. En este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley, a las cuales se les aplicó una sola

inyección de dietilnitrosamina (DEN) dando origen a hepatocarcinoma. Tras la ingesta de licopeno y del extracto se observó una inhibición de la hepatocarcinogénesis en las ratas, debido a la reducción del estrés oxidativo. Además, también se encontró una disminución significativa en el citocromo P450 2E1, los focos inflamatorios y la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias (*TNF- α* , *IL-1 β* e *IL-12*). Una investigación realizada por Ahn *et al.* (2012) indicaron que el licopeno modula la expresión de micro ARN-21 (*miR-21*) en ratones con esteatosis inducida por una dieta alta en grasa. Como un regulador de la expresión génica a nivel postranscripcional, el *miR-21* se sobreexpresó tras la ingesta de licopeno, inhibiendo la expresión de la proteína de unión de ácidos grasos 7 (*FABP7*), bloqueando la acumulación de lípidos intracelulares. Diferentes autores, han indicado que el licopeno previene la esteatohepatitis no alcohólica en ratas y ratones, la cual fue inducida por una dieta alta en grasa, observando una reducción del estrés oxidativo en las células (Bahcecioglu *et al.*, 2010; Bernal *et al.*, 2013; Ip y Wang, 2013). Por ello, la incorporación de este carotenoide en una dieta equilibrada podría considerarse un factor preventivo frente a la EHGNA (Jiang *et al.*, 2016; Piña-Zentella *et al.*, 2016). Kujawska *et al.* (2014) señalaron que la ingesta con pasta de tomate en ratas antes de la administración de N-nitrosodietilamina (NDEA) fue eficaz en la recuperación de las enzimas SOD, catalasa y glutatión reductasa en un 32–97%, indicando el papel protector contra el estrés oxidativo. Además, demostró que el daño en el ADN inducido por NDEA en los leucocitos disminuyó en un 10% en ratas tratadas con pasta de tomate. Se ha sugerido que la suplementación del licopeno en la dieta previene la incidencia de carcinogénesis inducida por la dieta alta en grasa en ratones, suprimiendo las señales oncogénicas, incluido el ARNm de metionina, la proteína β -catenina y la activación del complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR). Todo esto sugiere que el licopeno en la dieta y sus metabolitos, se pueden utilizar en la prevención del cáncer de hígado y la reducción del riesgo de cáncer

en pacientes con EHGNA (Ip *et al.*, 2014; Navarro-González *et al.*, 2018). Martín-Pozuelo *et al.* (2015) estudiaron el efecto de la ingesta del zumo de tomate en la expresión génica en ratas con esteatosis hepática inducida, observando que la suplementación con zumo de tomate llevó a una acumulación de *all-trans* y *cis*-licopeno, así como sus metabolitos en el hígado de animales alimentados con dieta normal + licopeno y dieta alta en grasa + licopeno, con niveles más altos en la dieta grasa (63.07% frente a 44.45%) debido al papel de la grasa en el proceso de absorción de este carotenoide. Además, se demostró que las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y zumo de tomate en comparación con las ratas que ingirieron solo dieta alta en grasa y agua aumentaron significativamente las lipoproteínas de alta densidad (HDL), disminuyendo así mismo el estrés oxidativo gracias a la reducción de los isoprostanos en la orina. En cuanto al análisis de la expresión génica, se observó la sobreexpresión de varios genes relacionados con el transporte de ácidos grasos, hidrólisis lipídica, y β -oxidación de ácidos grasos mitocondrial y peroxisomal, indicando una modulación positiva del metabolismo lipídico.

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el licopeno reduce la producción de ROS en las células SK-Hep-1 al inhibir la dicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) a través de la señalización de proteína quinasa C (PKC). También se ha indicado que el licopeno inhibe el daño oxidativo al reducir la carbonilación de proteínas, para mejorar la hepatotoxicidad, actuando como antioxidante, reduciendo el glutatión disulfuro (GSSG) y regulando los niveles de glutatión total (tGSH) y catalasa (CAT), promoviendo la regulación a la baja de la metaloproteínasa de la matriz extracelular 2 (*MMP-2*) y reduciendo las áreas de necrosis, mejorando el aspecto general de la lesión en ratones C57BL/6 (Bandeira *et al.*, 2017a). En un estudio reciente, se demostró que el licopeno ejerce actividades antiinflamatorias contra la lesión hepática por paracetamol (APAP) en ratones C57BL/6 al mejorar el estado redox (Bandeira *et al.*, 2017b). Yefsah-Idres *et al.*

(2016) demostraron que las ratas con una dieta alta en contenido de metionina presentaban características histológicas anormales acompañadas de un aumento de los niveles de homocisteína sérica, alanina aminotrasferasa (ALT) y aspartato aminotrasferasa (AST), además de malondialdehído (MDA) hepático y disminución de las actividades de cistationina- β -sintasa (CBS) y S-adenosil-homocisteína hidrolasa, indicando que la suplementación con licopeno revirtió la hiperhomocisteinemia (relacionada con el estrés oxidativo), proporcionando evidencia adicional de los efectos hepatoprotectores del licopeno. El licopeno también mostró efectos beneficiosos contra el carcinoma hepatocelular mediante la modulación de la proliferación celular, la glucólisis y la ultraestructura de las células hepáticas (Gupta *et al.*, 2016). Xu *et al.* (2017) confirmaron que el licopeno alivia la lesión hepática inducida por aflatoxina B1 (AFB1) al mejorar la oxidación hepática y el potencial de desintoxicación con la activación de Nrf2. En otro modelo de EHGNA e hipercolesterolemia inducida por una dieta alta en grasa, los investigadores demostraron que el consumo de zumo de tomate tuvo diferentes efectos dependiendo de la dieta. En el grupo de ratas que tomaba zumo de tomate (con y sin esteatosis), los genes implicados en la β -oxidación estaban regulados positivamente, y se observó la regulación positiva del receptor de trombospondina (*CD36*) y la regulación negativa de apolipoproteína B (*APOB*) y lipoproteína lipasa (*LPL*). La acumulación de licopeno en las ratas con esteatosis reguló positivamente el receptor X fernesioide (*FXR*) y el factor nuclear 4 alfa de hepatocito (*HNF4A*), que se han sugerido como factores preventivos en relación con la esteatosis (Elvira-Torales 2018). Además de la modulación a nivel transcripcional, la ingesta de zumo de tomate en ratas con esteatosis inducida por dieta grasa estimuló la biosíntesis del glutatión y los aminoácidos de la vía de transulfuración, aumentando los niveles de metabolitos relacionados con la respuesta antioxidante (Bernal *et al.*, 2013; Elvira-Torales 2018).

2.2.4. Luteína

La propiedad de este antioxidante se basa también en la captación de los radicales libres, especialmente el oxígeno singlete, protegiendo del daño oxidativo (Landrum y Bone, 2001) aunque también se ha descrito un efecto actividad de antiviral contra la hepatitis B, ya que inhibe la transcripción de este virus (Pang *et al.*, 2010). Kim *et al.* (2012) observaron que la luteína (0.1 g/100 g durante 12 semanas) disminuye la inflamación y el estrés oxidativo en el hígado y en los ojos de los cobayos alimentados con una dieta hipercolesterolémica. Este carotenoide podría prevenir las condiciones degenerativas del hígado al disminuir la acumulación del colesterol libre, atenuar la peroxidación de lípidos (disminución de MDA) y la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α). Además, en este estudio también se observó que los cobayos alimentados con luteína también tenían una menor actividad de unión al ADN de NF- κ B. Estos efectos antioxidantes sugieren efectos protectores contra la EHGNA. También se ha descrito un efecto protector anticarcinógeno tras la inducción de la N-nitrosodietilamina en ratas con carcinoma hepatocelular, observando que la administración de luteína inhibía la carcinogénesis, probablemente por la combinación de su actividad antioxidante y la activación de enzimas del citocromo P450, así como de otras enzimas desintoxicantes como la glutatión S-transferasa y la UDP-glucoronil transferasa (Sindhu *et al.*, 2010). Otro estudio sugiere que la suplementación con luteína podría proteger contra la acumulación de lípidos hepáticos y la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa. Además, este estudio también investigó los efectos de la luteína en la expresión del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR) debido a que desempeña un papel importante en el metabolismo de lípidos, encontrando que la dieta alta en grasa inhibía significativamente la expresión del PPAR- α , que se restauraba con la suplementación de luteína (Qiu *et al.*, 2015). Murillo *et al.* (2016b) usaron una

nanoemulsión de luteína (3.5 mg/día) en la dieta hipercolesterolémica durante seis semanas en cobayos, observando un aumento de las concentraciones de este carotenoide en plasma e hígado, además de una disminución puntual en la esteatosis hepática (24% más baja según lo evaluado histológicamente), colesterol total hepático y actividad de ALT plasmática. Además, en este estudio también se encontró una disminución del 55% de la LDL en los grupos suplementados con luteína en comparación con los grupos controles. Estos resultados sugieren los efectos protectores de esta nanoemulsión sobre la esteatosis hepática.

2.2.5. β -criptoxantina

De acuerdo con su actividad antioxidante, las concentraciones de β -criptoxantina en plasma se relacionan inversamente con los índices de daño del ADN oxidativo y la peroxidación lipídica (Haeghele *et al.*, 2000). Además, en estudios *in vivo* e *in vitro*, se observó que la β -criptoxantina tiene efectos antiinflamatorios, modulando la respuesta inmune de los macrófagos (Katsuura *et al.*, 2009). Takayanagi *et al.* (2011) demostraron que la administración oral de este carotenoide reprimió la secreción de citoquinas proinflamatorias y mejoró el metabolismo de lípidos y el consumo de energía. Kobori *et al.* (2014) demostraron que la β -criptoxantina mejora la EHNA inducida por la dieta al reprimir la expresión de genes inflamatorios en ratones. Ellos observaron que este carotenoide suprimió la expresión de genes inducibles por LPS y por TNF- α en la EHNA. También se redujeron los niveles elevados de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), marcador de estrés oxidativo. Por lo tanto, la β -criptoxantina reprime la inflamación y la fibrosis resultante, probablemente reprimiendo el aumento y la activación de los macrófagos/células de Kupffer, leucocitos y células T. En un modelo con ratones (modelo lipotóxico) se observó que la β -criptoxantina revirtió la esteatosis, la

inflamación y la progresión de la fibrosis en la EHNA, revirtiendo la resistencia a la insulina y previniendo la esteatohepatitis mediante la disminución de la activación de los macrófagos o células de Kupffer (Ni *et al.*, 2015). Otro estudio demostró que la suplementación con β -criptoxantina en pacientes con EHGNA inhibe la progresión de esta enfermedad. Sugiriendo que la ingesta de β -criptoxantina es muy efectiva para elevar las actividades antioxidantes y antiinflamatorias en pacientes con EHGNA (Matsuura *et al.*, 2016).

2.2.6. Otros carotenoides

Otros carotenoides, como el α -caroteno y la zeaxantina también muestran efectos beneficiosos contra la lesión hepática crónica. Una investigación realizada por Murakoshi *et al.* (1992), encontraron que el α -caroteno tiene un efecto inhibitorio sobre la carcinogénesis hepática espontánea en ratones macho, disminuyendo significativamente el número medio de hepatomas. La zeaxantina mostró efectos protectores contra la EHNA, disminuyendo el estrés oxidativo y la fibrosis hepática, lo que sugiere que el mecanismo de acción de la zeaxantina está relacionado con su capacidad antioxidante (Chamberlain *et al.*, 2009). Estudios epidemiológicos han demostrado que la zeaxantina se asocia de manera inversa en la prevalencia de la EHGNA en poblaciones chinas de mediana y avanzada edad (Cao *et al.*, 2015).

Un resumen de los estudios que examinan el papel de estos carotenoides en enfermedades crónicas del hígado se describe en la **Tabla 2.3**.

Tabla 2.3. Resumen de los estudios en los que los carotenoides tuvieron un efecto beneficioso sobre las enfermedades crónicas del hígado en líneas celulares, modelos humanos y animales.

Agente	Modelo	Resultados principales	Referencia
β -caroteno	Rata: carcinogénesis inducida por AFB ₁	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Enzimas antioxidantes (GSH-Px, catalasa, GST) y vitamina C ↓ Riesgo de toxicidad por AFB₁ 	Patel y Sail (2006)
Alga <i>Dunaliella bardawil</i> (rica en (9Z)- β -caroteno)	Ratón: alimentados con dieta alta en grasa, ratón knockout receptor de LDL	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Colesterol en plasma y aterogénesis (VLDL y LDL) ↓ Acumulación de grasa e inflamación hepática ↓ Niveles de genes inflamatorios hepáticos (<i>VCAM-1</i>, <i>IL-1α</i>, <i>MCP-1</i>, <i>INF-γ</i>) 	Harari <i>et al.</i> (2008)
Albaricoque (rico en β -caroteno)	Rata: esteatosis hepática y daño inducido por CCL ₄	<ul style="list-style-type: none"> ↓ MDA hepático ↑ Niveles de GSH total, catalasa, SOD y GSH-Px ↓ Estrés oxidativo ↓ Hepatoesteatosis y daño en hígado 	Ozturk <i>et al.</i> (2009)
Tomate “Campari” (rico en β -caroteno y licopeno)	Pez cebra: Obesidad inducida por la dieta	<ul style="list-style-type: none"> ↓ <i>SREBF1</i> en el ARNm ↑ <i>FOXO1</i> en la expresión de genes ↓ Obesidad inducida por la dieta, dislipidemia y hepatoesteatosis 	Tainaka <i>et al.</i> (2011)
Polisacáridos de <i>Lycium barbarum</i> (ricos en β -caroteno)	Rata: EHNA inducida por una dieta alta en grasa	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Modulación del NF-κB y la vía MAPK ↓ Acumulación de grasa hepática, respuesta inflamatoria hepática, fibrosis y estrés oxidativo ↑ Propiedades hepatoprotectoras 	Xiao <i>et al.</i> (2013)
Carotenos dietéticos y vitamina A	Humano: pacientes con cáncer primario de hígado	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Riesgo de padecer cáncer primario de hígado 	Lan <i>et al.</i> (2016)

Agente	Modelo	Resultados principales	Referencia
Licopeno	Rata: EHNA inducida por dieta alta en grasa	↓ Niveles de proteína CYP2E1, MDA (plasma e hígado) y TNF- α ↑ Nivel de GSH hepático ↓ Esteatosis e inflamación	Bahcecioglu <i>et al.</i> (2010)
Zumo de tomate	Rata: hipercolesterolémica y EHGNA inducidas por la dieta	↓ Niveles de TG en plasma e isoprostanos en orina ↑ Acumulación de licopeno en el hígado ↑ Alivio del agotamiento de aminoácidos ↑ Recuperación del balance redox en el hígado ↑ Niveles de L-carnitina ↑ Efecto protector de la EHGNA	Bernal <i>et al.</i> (2013)
Zumo de tomate	Rata: EHGNA inducida por una dieta alta en grasa	↓ Isoprostanos en orina, TG y LDL plasmáticos ↑ Actividad de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal. ↓ Esteatosis	Martín-Pozuelo <i>et al.</i> (2015)
Licopeno	Células SK-Hep-1: PKC vía mediada por la producción de ROS. Ratón: Hepatotoxicidad inducida por sobredosis de APAP	↓ Producción de ROS, NADPH oxidasa y <i>MMP-2</i> , GSSG ↑ GSH y CAT	Bandeira <i>et al.</i> (2017a)
Licopeno	Rata: EHGNA inducida por una dieta alta en grasa	↓ ALT, AST, TG, CT, MDA, LDL y AGL ↓ <i>CYP2E1</i> y <i>TNF-α</i> ↑ GSH, SOD y HDL ↑ Efecto protector sobre la EHGNA	Jiang <i>et al.</i> (2016)
Licopeno	Rata: EHGNA inducida por una dieta alta en grasa	↓ Peso del hígado, LDL y CT hepático ↑ GSH-Px, SOD y CAT en el hígado	Piña-Zentella <i>et al.</i> (2016)

Agente	Modelo	Resultados principales	Referencia
Lycopeno	Ratón: lesión hepática inducida por AFB1	↓ Acumulación de aductos de AFB1-ADN en el hígado ↑ Activación de señalización de Nrf2 ↑ Potencial antioxidante y desintoxicación hepática	Xu <i>et al.</i> (2017)
Zumo de tomate	Rata: hipercolesterolémica y EHGNA inducidas por la dieta	↑ Regulación del <i>CD36</i> , <i>FXR</i> y <i>HNF4A</i> ↓ Regulación de <i>APOB</i> y <i>LPL</i> ↑ Síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol ↓ Niveles de metabolitos relacionados con la respuesta antioxidante	Elvira-Torales <i>et al.</i> (2018)
Luteína	Cobayo: esteatosis hepática inducida por una dieta hipercolesterolémica	↓ Colesterol libre hepático ↓ MDA y TNF- α hepáticos ↓ Unión al ADN hepático de NF- κ B	Kim <i>et al.</i> (2012)
Luteína	Rata: Carcinoma hepatocelular inducido por N-nitrosodietilamina (NDEA)	↓ ALT, AST, fosfatasa alcalina en plasma y tejido hepático ↑ GSH ↓ GGT ↑ UDP-glucoronil transferasa y glutatión S-transferasa	Sindhu <i>et al.</i> (2013)
Luteína	Rata: EHGNA inducida por una dieta alta en grasa	↓ CT y TG hepáticos ↑ HDL en suero ↓ ALT en suero ↑ Sensibilidad a la insulina hepática ↑ Catabolismo de AG hepáticos	Qiu <i>et al.</i> (2015)
Luteína	Cobayo: esteatosis hepática inducida por una dieta hipercolesterolémica	↓ Esteatosis hepática (evaluado histológicamente) ↓ Colesterol total hepático ↓ Actividad ALT y LDL plasmáticos	Murillo <i>et al.</i> (2016b)

Agente	Modelo	Resultados principales	Referencia
β -criptoxantina	Ratón: Modelo obeso	↓ Peso corporal y tejido adiposo abdominal ↓ TG y CT sérico ↓ Citoquinas inflamatorias ↑ Metabolismo de lípidos y consumo de energía	Takayanagi (2011)
β -criptoxantina	Ratón: EHNA inducida por una dieta rica en colesterol y alta en grasa	↓ TBARS hepático ↑ Suprime la expresión de los genes inducibles <i>LPS</i> y <i>TNF-α</i> ↓ Respuesta inflamatoria (suprime la activación de macrófagos, células T helper y citotóxicas)	Kobori <i>et al.</i> (2014)
β -criptoxantina	Ratón: esteatosis hepática y EHNA inducida por la dieta alta en grasa y colesterol	↓ Contenido total de macrófagos hepáticos y de células T	Ni <i>et al.</i> (2015)
β -criptoxantina	Humano: Pacientes con EHGNA (EHNA y HGNA)	↓ GGT, LDL e IL-6 séricas ↑ SOD e IL-10 séricas ↑ Actividades antioxidantes y antiinflamatorias	Matsuura <i>et al.</i> (2016)
α -caroteno	Ratón: carcinogénesis hepática espontánea	↓ Hepatomas	Murakoshi <i>et al.</i> (1992)
Zeaxantina	Gerbil de Mongolia: EHNA inducida por una dieta deficiente en metionina y colina	↓ Fibrosis hepática ↓ Hidroperóxidos de lípidos hepáticos	Chamberlain <i>et al.</i> (2009)

REFERENCIAS

- Ahn J, Lee H, Jung CH, Ha T. Lycopene inhibits hepatic steatosis via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(11):1665–1674.
- Bahcecioğlu IH, Kuzu N, Metin K, Ozercan IH, Ustündag B, Sahin K, Kucuk O. Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. *Vet Med Int*. 2010; 2010: 262179.
- Baldrick FR, Woodside JV, Elborn JS, Young IS, McKinley MC. Biomarkers of fruit and vegetable intake in human intervention studies: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011; 51(9): 795–815.
- Bandeira ACB, da Silva RC, Rossoni JV Júnior, Figueiredo VP, Talvani A, Cangussú SD, *et al*. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. *Bioorg Med Chem*. 2017b; 25(3): 1057–1065.
- Bandeira ACB, da Silva TP, de Araujo GR, Araujo CM, da Silva RC, Lima WG, *et al*. Lycopene inhibits reactive oxygen species production in SK-Hep-1 cells and attenuates acetaminophen-induced liver injury in C57BL/6 mice. *Chem Biol Interact*. 2017a; 263: 7–17.
- Baybutt RC, Molteni A. Dietary beta-carotene protects lung and liver parenchyma of rats treated with monocrotaline. *Toxicology*. 1999; 137(2): 69–80.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M, Periago MJ. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(11): 1870–1881.
- Bernhardt S, Schlich E. Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *J Food Eng*. 2006; 77: 327–333.
- Bohn T, Desmarchelier C, Dragsted LO, Nielsen CS, Stahl W, Rühl R, *et al*. Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61(6).
- Bohn T, McDougall GJ, Alegría A, Alming M, Arrigoni E, Aura AM, *et al*. Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites--a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Mol Nutr Food Res*. 2015; 59(7): 1307–1323.
- Bohn T. Bioavailability of non-provitamin A carotenoids. *Curr Nutr Food Sci*. 2008; 4: 240–258.
- Boon CS, McClements DJ, Weiss J, Decker EA. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010; 50(6): 515–532.
- Brevik A, Andersen LF, Karlsen A, Trygg KU, Blomhoff R, Drevon CA. Six carotenoids in plasma used to assess recommended intake of fruits and vegetables in a controlled feeding study. *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58(8): 1166–1173.
- Britton G, Khachik F. Carotenoids in Food. In: Britton G, Pfander H, Liaaen-Jensen S, editors. Carotenoids: Nutrition and Health, vol 5. Switzerland: Birkhäuser Verlag, Basel; 2009. p. 45–66.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 1995; 9(15): 1551–1558.
- Burri BJ, La Frano MR, Zhu C. Absorption, metabolism, and functions of β -cryptoxanthin. *Nutr Rev*. 2016; 74(2): 69–82.
- Burri BJ. Lycopene and human health. In: Meskin MS, Bidlack WR, Davies AJ, Omaye ST, editors. Phytochemicals in nutrition and health. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002. p. 157–172.

- Cabré Gelada E, Peña Quintana L, Virgili Casas N. Nutrición en las enfermedades hepatobiliares. In: Gil A, editor. Tratado de Nutrición: Nutrición y enfermedad. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2017. p. 865–906.
- Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(5): E774.
- Cao Y, Wang C, Liu J, Liu ZM, Ling WH, Chen YM. Greater serum carotenoid levels associated with lower prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in Chinese adults. *Sci Rep.* 2015; 5: 12951.
- Carlsen MH, Karlsen A, Lillegaard IT, Gran JM, et al. Relative validity of fruit and vegetable intake estimated from an FFQ, using carotenoid and flavonoid biomarkers and the method of triads. *Br J Nutr.* 2011; 105(10): 1530–1538.
- Chamberlain SM, Hall JD, Patel J, Lee JR, Marcus DM, Sridhar S, et al. Protective effects of the carotenoid zeaxanthin in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2009; 54(7): 1460–1464.
- Chen H, Tappel A. Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation in rat liver homogenate. *Lipids.* 1996; 31(1): 47–50.
- Colle IJ, Lemmens L, Knockaert G, Van Loey A, Hendrickx M. Carotene Degradation and Isomerization during Thermal Processing: A Review on the Kinetic Aspects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56(11): 1844–1855.
- Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology.* 2012; 142(4): 711–725.
- Desmarchelier C, Borel P. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends Food Sci Technol.* 2017; 69(B): 270–280.
- Dias MG, Olmedilla-Alonso B, Hornero-Méndez D, Mercadante AZ, Osorio C, Vargas-Murga L, et al. Comprehensive database of carotenoid contents in Ibero-American foods. A valuable tool in the context of functional foods and the establishment of recommended intakes of bioactives. *J Agric Food Chem.* 2018; 66(20): 5055–5107.
- Donhowe EG, Kong F. Beta-carotene: digestion, microencapsulation, and in vitro bioavailability. *Food Bioprocess Technol.* 2014; 7(2): 338–354.
- Eggersdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys.* 2018; 652: 18–26.
- Elia M, Stratton RJ. Geographical inequalities in nutrient status and risk of malnutrition among English people aged 65 y and older. *Nutrition.* 2005; 21(11–12): 1100–1106.
- Elvira-Torales LI, Navarro-González I, González-Barrio R, Martín-Pozuelo G, Doménech G, Seva J, et al. Tomato juice supplementation influences the gene expression related to steatosis in rats. *Nutrients.* 2018; 10(9): 1215.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology.* 2010; 51(2): 679–689.
- Fernandez-Garcia 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.
- Ferramosca A, Di Giacomo M, Zara V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(23): 4146–4157.
- Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients.* 2014; 6(2): 466–488.

- Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids*. 2011; 2011: 783976.
- Gammone MA, Riccioni G, D'Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr Res*. 2015; 59: 26762.
- Giuffrida D, Torre G, Dugo P, Dugo G. Determination of the carotenoid profile in peach fruits, juice and jam. *Fruits*. 2012; 68: 39–44.
- Goltz SR, Campbell WW, Chitchumroonchokchai C, Failla ML, Ferruzzi MG. Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2012; 56(6): 866–877.
- González-Barrio R, Periago MJ, Luna-Recio C, Garcia-Alonso FJ, Navarro-González I. Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. *Food Chem*. 2018; 252:373–380.
- Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, *et al*. Beta-carotene is an important vitamin A source for humans. *J Nutr*. 2010; 140(12) :2268S–2285S.
- Gupta P, Bhatia N, Bansal MP, Koul A. Lycopene modulates cellular proliferation, glycolysis and hepatic ultrastructure during hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2016; 8(29): 1222–1233.
- Gyamfi D, Patel V. Liver metabolism: Biochemical and molecular regulations. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Watson RR, editors. *Nutrition, diet therapy, and the liver*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2017. p. 3–15.
- Haegele AD, Gillette C, O'Neill C, Wolfe P, Heimendinger J, Sedlacek S, Thompson HJ. Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9(4): 421–425.
- Harari A, Harats D, Marko D, Cohen H, Barshack I, Kamari Y, *et al*. A 9-cis beta-carotene-enriched diet inhibits atherogenesis and fatty liver formation in LDL receptor knockout mice. *J Nutr*. 2008; 138(10): 1923–1930.
- Heath E, Seren S, Sahin K, Kucuk O. The role of tomato lycopene in the treatment of prostate cancer. In: Rao AV, editor, *Tomatoes, lycopene and human health: Preventing chronic diseases*. Scotland: Caledonian Science Press; 2006. p. 127–140.
- Heber D, Lu QY. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(10):920–923.
- Hoffmann J, Linseisen J, Riedl J, Wolfram G. Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans. *Eur J Nutr*. 1999; 38(6): 278–285.
- Huang YM, Dou HL, Huang FF, Xu XR, Zou ZY, Lin XM. Effect of supplemental lutein and zeaxanthin on serum, macular pigmentation, and visual performance in patients with early age-related macular degeneration. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 564738.
- Ip BC, Liu C, Ausman LM, von Lintig J, Wang XD. Lycopene attenuated hepatic tumorigenesis via differential mechanisms depending on carotenoid cleavage enzyme in mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014; 7(12): 1219–1227.
- Ip BC, Wang XD. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: implications for lycopene intervention. *Nutrients*. 2013; 6(1): 124–162.
- Jansen MC, Van Kappel AL, Ocké MC, Van 't Veer P, Boshuizen HC, Riboli E, Bueno-de-Mesquita HB. Plasma carotenoid levels in Dutch men and women, and the relation with vegetable and fruit consumption. *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58(10): 1386–1395.
- Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty

liver disease in rat. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10180–10188.

Johnson EJ. The role of carotenoids in human health. *Nutr Clin Care.* 2002; 5(2): 56–65.

Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(1): 27–30.

Karadeniz G, Acikgoz S, Tekin IO, Tascýlar O, Gun BD, Cömert M. Oxidized low-density-lipoprotein accumulation is associated with liver fibrosis in experimental cholestasis. *Clinics (Sao Paulo).* 2008; 63(4): 531–540.

Katsuura S, Imamura T, Bando N, Yamanishi R. Beta-carotene and beta-cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(11): 1396–1405.

Khachik F, Sprangler CJ, Smith JC, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem.* 1997; 69(10): 1873–1881.

Kheir Eldin AA, Motawi TMK, Sadik NAH. Effect of some natural antioxidants on aflatoxin B1-induced hepatic toxicity. *EXCLI Journal.* 2008; 7: 119–131.

Kim JE, Clark RM, Park Y, Lee J, Fernandez ML. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *Nutr Res Pract.* 2012; 6(2): 113–119.

Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients.* 2017; 9(4): E387.

Kobori M, Ni Y, Takahashi Y, Watanabe N, Sugiura M, Ogawa K, *et al.* β -Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by

suppressing inflammatory gene expression in mice. *PLoS One.* 2014 ;9: e98294.

Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005; 26(6): 459–516.

Kujawska M, Ewertowska M, Adamska T, Sadowski C, Ignatowicz E, Jodynis-Liebert J. Antioxidant effect of lycopene-enriched tomato paste on N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress in rats. *J Physiol Biochem.* 2014; 70(4): 981–990.

Lakshminarayana R, Raju M, Keshava Prakash MN, Baskaran V. Phospholipid, oleic acid micelles and dietary olive oil influence the lutein absorption and activity of antioxidant enzymes in rats. *Lipids.* 2009; 44(9): 799–806.

Lan QY, Zhang YJ, Liao GC, Zhou RF, Zhou ZG, Chen YM, Zhu HL. The association between dietary vitamin A and carotenes and the risk of primary liver cancer: A case–control study. *Nutrients.* 2016; 8(10): E624.

Landrum JT, Bone RA. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 385(1): 28–40.

Latief U, Ahmad R. Role of dietary carotenoids in different etiologies of chronic liver diseases. In: Valero Díaz A, García-Gimeno RM, editors. *Descriptive food science.* London, United Kingdom: IntechOpen; 2018. p. 93–112.

Lemmens L, Colle I, Van Buggenhout S, Palmero P, Van Loey A, Hendrickx M. Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2014; 38(2): 125–135.

Liu Q, Bengmark S, Qu S. Nutrigenomics therapy of hepatitis C virus induced-hepatosteatosis. *BMC Gastroenterol.* 2010; 10:49.

Liu W, Baker SS, Baker RD, Zhu L. Antioxidant mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Drug Targets*. 2015; 16(12): 1301–1314.

Lucarini M, Lanzi S, D'Evoli L, Aguzzi A, Lombardi-Boccia G. Intake of vitamin A and carotenoids from the Italian population--results of an Italian total diet study. *Int J Vitam Nutr Res*. 2006; 76(3): 103–109.

Maiani G, Periago Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, *et al*. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res*. 2009; 53(2): S194–S218.

Martín-Pozuelo G, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J, Hidalgo N, *et al*. The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur J Nutr*. 2015; 54(6): 933–944.

Marze S. Bioaccessibility of lipophilic micro-constituents from a lipid emulsion. *Food Funct*. 2015; 6(10): 3218–3227.

Matsuura B, Miyake T, Yamamoto S, Furukawa S, Hiasa Y. Usefulness of Beta-cryptoxanthin for nonalcoholic fatty liver diseases. *J Food Nutr Disord*. 2016; 5: 3.

Mencin AA, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011; 14(2): 151–157.

Mercadante AZ. Carotenoids in foods: Sources and stability during processing and storage. In: Socaciu C, editor. *Food colorants: chemical and functional properties*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008. p. 213.

Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(11): 1290–1324.

Murakoshi M, Nishino H, Satomi Y, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, *et al*. Potent preventive action of α -carotene against carcinogenesis: Spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by α -carotene than by β -carotene. *Cancer Res*. 1992; 52(23): 6583–6587.

Murillo AG, Aguilar D, Norris GH, DiMarco DM, Missimer A, Hu S, *et al*. Compared with powdered lutein, a lutein nanoemulsion increases plasma and liver lutein, protects against hepatic steatosis, and affects lipoprotein metabolism in guinea pigs. *J Nutr*. 2016b; 146(10): 1961–1969.

Murillo AG, DiMarco DM, Fernandez ML. The potential of non-provitamin A carotenoids for the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Biology*. 2016a; 5(4): 42.

Navarro-González I, García-Alonso J, Periago MJ. Bioactive compounds of tomato: Cancer chemopreventive effects and influence on the transcriptome in hepatocytes. *J Funct Foods*. 2018; 42: 271–280.

Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, Nagata N, Kobori M, Sugiura M, *et al*. Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid, β -cryptoxanthin. *Endocrinology*. 2015; 156(3): 987–999.

Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJ, Blanco I, Gil-Martinez E, *et al*. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutr*. 2001; 85(2): 227–238.

O'Neill ME, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I, *et al*. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br J Nutr*. 2001; 85(4): 499–507.

Ornelas-Paz JJ, Yahia EM, Gadea-Béjar AA, Pérez-Martínez JD, *et al*. Biodisponibilidad y

- actividad biológica de carotenoides y vitamina A. In: Álvarez-Parilla E, González-Aguilar A, De la Rosa LA, Ayala-Zavala JF, editors. *Antioxidantes en alimentos y salud*. México, D.F.: AM-editores; 2012. p. 293–327.
- Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, *et al.* Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2007; 132(1): 282–293.
- Ozturk F, Gul M, Ates B, Ozturk IC, Cetin A, Vardi N, *et al.* Protective effect of apricot (*Prunus armeniaca* L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *Br J Nutr*. 2009; 102(12): 1767–1775.
- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci*. 2011; 76(1): R6–R15.
- Pang R, Tao JY, Zhang SL, Zhao L, Yue X, Wang YF, *et al.* In vitro antiviral activity of lutein against hepatitis B virus. *Phytother Res*. 2010; 24(11): 1627–1630.
- Patel V, Sail S. β -carotene protects the physiological antioxidants against aflatoxin-B1 induced carcinogenesis in albino rats. *Pak J Biol Sci*. 2006; 9: 1104–1111.
- Periago MJ, Bravo S, García-Alonso FJ, Rincón F. Detection of key factors affecting lycopene in vitro accessibility. *J Agric Food Chem*. 2013; 61(16): 3859–67.
- Perry A, Rasmussen H, Johnson EJ. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *J Food Compos Anal*. 2009; 22(1): 9–15.
- Piña-Zentella RM, Rosado JL, Gallegos-Corona MA, Madrigal-Pérez LA, García OP, Ramos-Gomez M. Lycopene improves diet-mediated recuperation in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Food*. 2016; 19(6): 607–614.
- Priyadarshani AMB. A review on factors influencing bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017; 57(8): 1710–1717.
- 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.
- Ranard KM, Jeon S, Mohn ES, Griffiths JC, Johnson EJ, Erdman JW Jr. Dietary guidance for lutein: consideration for intake recommendations is scientifically supported. *Eur J Nutr*. 2017; 56(Suppl 3): 37–42.
- Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*. 2007; 55(3): 207–216.
- Reboul E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: Focus on transport proteins. *Nutrients*. 2013; 5(9): 3563–3581.
- Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75(3): 588–602.
- Riboli E, Péquignot G, Repetto F, Axerio M, Raymond L, Boffetta P, *et al.* A comparative study of smoking, drinking and dietary habits in population samples in France, Italy, Spain and Switzerland. I. Study design and dietary habits. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1988; 36(3): 1511–1565.
- Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfan, J. Updated brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoids composition. *J Food Compos Anal*. 2008; 21(6): 445–463.
- Rodriguez-Concepcion M, Avalos J, Bonet ML, Boronat A, Gomez-Gomez L, Hornero-Mendez D, *et*

al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog Lipid Res.* 2018; 70: 62–93.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1): 59–69.

Roodenburg AJ, Leenen R, Hof KH, Weststrate JA, Tijburg LB. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(5): 1187–1193.

Rühl R. Non-pro-vitamin A and pro-vitamin A carotenoids in atopy development. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 161: 99–115.

Ruiz-Sola MÁ, Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book.* 2012; 10: e0158.

Saini RK, Nile SH, Park SW. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Res Int.* 2015; 76(3): 735–750.

Sánchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granada F, Martín A. Mediterranean vegetable soup consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes, prostaglandin E2 and monocyte chemotactic protein-1 in healthy humans. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(3): 183–189.

Sarni RO, Suano de Souza FI, Ramalho RA, Schoeps Dde O, Kochi C, Catherino P, et al. Serum retinol and total carotene concentrations in obese pre-school children. *Med Sci Monit.* 2005; 11(11): CR510–CR514.

Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clin Liver Dis.* 2016; 20(2): 205–214.

Seif El-Din SH, El-Lakkany NM, El-Naggar AA, Hammam OA, Abd El-Latif HA, Ain-Shoka AA, Ebeid FA. Effects of rosuvastatin and/or β -carotene on non-alcoholic fatty liver in rats. *Res Pharm Sci.* 2015; 10(4): 275–287.

Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell Biol Int.* 2010; 34(12): 1247–1272.

Sheriff SA, Devaki T. Lycopene stabilizes lipoprotein levels during D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatitis in experimental rats. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2(12): 975–980.

Shete V, Quadro L. Mammalian metabolism of β -carotene: gaps in knowledge. *Nutrients.* 2013; 5(12): 4849–4868.

Shiota G, Tsuchiya H. Pathophysiology of NASH: Insulin resistance, free fatty acids and oxidative stress. *J Clin Biochem Nutr.* 2006; 38: 127–132.

Shivashangari KS, Ravikumar V, Vinodhkumar R, Sheriff SA, Devaki T. Hepatoprotective potential of lycopene on D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatitis in rats. *Pharmacologyonline.* 2006; 2: 151–170.

Sindhu ER, Firdous AP, Preethi KC, Kuttan R. Carotenoid lutein protects rats from paracetamol-, carbon tetrachloride- and ethanol-induced hepatic damage. *J Pharm Pharmacol.* 2013; 62(8): 1054–1060.

Singhal S, Baker SS, Baker RD, Zhu L. Role of paraoxonase 1 as an antioxidant in nonalcoholic steatohepatitis. In: Patel VB, Rajendram R, Preedy VR, editors. *The liver.* London: Academic Press; 2018, p. 15–20.

Šivel M, Kráčmar S, Fišera M, Klejdus B, Kubáň V. Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food

supplements. *Czech J Food Sci.* 2014; 32(6): 521–525.

Soukoulis C, Bohn T. A comprehensive overview on the micro- and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018; 58(1): 1–36.

Stahl W, Heinrich U, Aust O, Tronnier H, Sies H. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; 5(2): 238–242.

Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1740(2): 101–107.

Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med.* 2003; 24(6): 345–351.

Stice CP, Xia H, Wang XD. Tomato lycopene prevention of alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma development. *Chronic Dis Transl Med.* 2018; 4(4): 211–224.

Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Zang L, Oka T, Nishimura Y, *et al.* Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutr Metab (Lond).* 2011; 8: 88.

Takayanagi K. Prevention of adiposity by the oral administration of β -cryptoxanthin. *Front Neurol.* 2011; 2: 67.

Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010; 52(5): 1836–1846.

van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr.* 2000; 130(3): 503–506.

Victoria-Campos CI, Ornelas-Paz J de J, Yahia EM, Failla ML. Effect of the interaction of heat-processing style and fat type on the micellarization of

lipid-soluble pigments from green and red pungent peppers (*Capsicum annuum*). *J Agric Food Chem.* 2013; 61(15): 3642–3653.

Villaça Chaves G, Pereira SE, Saboya CJ, Ramalho A. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with the nutritional status of vitamin A in individuals with class III obesity. *Obes Surg.* 2008; 18(4): 378–385.

von Elbe JH, Schwartz SJ. Colorantes. In: Fennema OR, editor. *Química de los alimentos*. Zaragoza, Spain: ACRIBIA; 2000. p. 773–850.

Wang L, Ding C, Zeng F, Zhu H. Low Levels of Serum β -Carotene and β -Carotene/Retinol Ratio Are Associated with Histological Severity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Ann Nutr Metab.* 2019; 74: 156–164.

Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer.* 2010; 126(8): 1788–1796.

Werman MJ, Ben-Amotz A, Mokady S. Availability and antiperoxidative effects of beta-carotene from *Dunaliella bardawil* in alcohol-drinking rats. *J Nutr Biochem.* 1999; 10(8): 449–454.

Whittaker P, Wamer WG, Chanderbhan RF, Dunkel VC. Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene on hepatic lipid peroxidation and blood lipids in rats with dietary iron overload. *Nutr Cancer.* 1996; 25(2): 119–128.

Woodside JV, McGrath AJ, Lyner N, McKinley MC. Carotenoids and health in older people. *Maturitas.* 2015; 80(1): 63–68.

Xiao J, Liong EC, Ching YP, Chang RCC, Fung ML, Xu AM, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury. *Nutr Diabetes.* 2013; 3(7): e81.

Xiao ML, Chen GD, Zeng FF, Qiu R, Shi WQ, Lin JS, *et al.* Higher serum carotenoids associated with improvement of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a prospective study. *Eur J Nutr.* 2019; 58(2): 721–730.

Xu F, Yu K, Yu H, Wang P, Song M, Xiu C, Li Y, Lycopene relieves AFB1-induced liver injury through enhancing hepatic antioxidation and detoxification potential with Nrf2 activation. *J Funct Foods.* 2017; 39: 215–224.

Yadav D, Hertan HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni CS. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(10): 2634–2639.

Yahia EM, Ornelas-Paz JJ. Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. In: de la Rosa LA, Álvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA, editors. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability. Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010. p. 177–222.

Yefsah-Idres A, Benazzoug Y, Otman A, Latour A, Middendorp S, Janel N. Hepatoprotective effects of lycopene on liver enzymes involved in methionine and xenobiotic metabolism in hyperhomocysteinemic rats. *Food Funct.* 2016; 7(6): 2862–2869.

Yeum KJ, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 483–504.

Yilmaz B, Sahin K, Bilen H, Bahcecioglu IH, Bilir B, Ashraf S, *et al.* Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015; 4(3):161–171.

Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15(1): 11–20.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto del consumo de carotenoides dietéticos, procedentes de tomate y espinacas, como antioxidantes hepáticos frente a la EHGNA, mediante un estudio *in vivo* con ratas con esteatosis inducida a través de una dieta grasa, evaluando los posibles mecanismos de acción a nivel metabólico, molecular y genético sobre la prevención y tratamiento de la enfermedad.

Para la consecución del objetivo principal, los objetivos específicos que nos planteamos fueron los siguientes:

1. Evaluar el efecto de la suplementación de la dieta con zumo de tomate sobre el contenido de lípidos plasmáticos, biomarcadores de estrés oxidativo, metabolitos hepáticos y la expresión de genes relacionados con la EHGNA inducida por una dieta grasa, con el objetivo de poder elucidar los mecanismos protectores del licopeno para esta enfermedad (*Artículo 1*).
2. Evaluar el efecto de la suplementación dietética de espinacas, como fuente de carotenoides, sobre el contenido de lípidos plasmáticos; biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo; lípidos, ácidos grasos y metabolitos hepáticos; y sobre la expresión de genes relacionados con la EHGNA inducida por una dieta grasa, con el fin de comprender los posibles mecanismos de acción de los carotenoides en el control de la EHGNA (*Artículo 2*).
3. Evaluar el efecto del consumo de espinacas sobre determinados grupos bacterianos de la microbiota intestinal y su relación con la producción de AGCC

y catabolitos fenólicos microbianos, en ratas con EHGNA inducida por la dieta, y explorar las relaciones con los cambios en la glucosa y el perfil de lípidos plasmáticos, con el fin de elucidar el papel de la ingesta de espinacas en el tratamiento de la EHGNA y en el manejo de las características del síndrome metabólico (*Artículo 3*).

4. Evaluar el efecto sinérgico de la suplementación de la mezcla de espinacas y tomate, y de los carotenoides presentes en estos alimentos, sobre diferentes biomarcadores relacionados con la EHGNA, con el fin de determinar el efecto de los carotenoides en el tratamiento dietético de la enfermedad (*resultados enviados para posible publicación*).

4. *DISEÑO EXPERIMENTAL*

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la consecución de los objetivos, la presente Tesis Doctoral se diseñó en cuatro experiencias, que consistieron en 3 estudios *in vivo* con ratas macho Sprague-Dawley de edad adulta, los cuales se llevaron a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, tras someterlo a su aprobación por el correspondiente Comité de Ética de Experimentación Animal.

4.1. ÉTICA BIOMÉDICA

El protocolo experimental que implicó la manipulación de animales (ratas macho Sprague-Dawley) fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia y por la Dirección General de Ganadería y Pesca de la C.A.R.M. (No. A1320140701, aprobado el 23 de julio de 2014).

4.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA Y DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Basado en un estudio preliminar, el tamaño de la muestra (n) se estimó comparando dos proporciones, utilizando la siguiente fórmula (Campbell *et al.*, 1995):

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})} + z_{1-\beta} \sqrt{P_A(1-P_A) + P_B(1-P_B)} \right]^2}{\delta^2}$$

donde $z_{1-\alpha/2}$ es el valor z_α correspondiente al riesgo deseado, $z_{1-\beta}$ es el valor z_β correspondiente al poder estadístico, P_A es el valor de la proporción en el grupo control, P_B es el valor de la proporción en el grupo de tratamiento, \bar{p} es el promedio de las dos proporciones de P_A y P_B , y δ^2 es la $P_A - P_B$.

El tamaño de la muestra obtenido se ajustó para una pérdida del 10%. Se estimó utilizando la siguiente fórmula (García-García *et al.*, 2013):

$$\text{Muestra ajustada a las pérdidas} = n \left(\frac{1}{1 - R} \right)$$

donde n es el número de sujetos sin pérdidas y R es la proporción esperada de pérdidas.

4.3. ESTUDIOS CON ANIMALES

Los estudios con animales se llevaron a cabo en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia. Los detalles específicos de cada uno de los ensayos, en cuanto al número de animales, condiciones del estudio, dietas administradas, tiempo de intervención, manejo de los animales, sacrificio y recogida de muestras biológicas se detallan a continuación en las siguientes secciones de la presente Tesis Doctoral, aunque de manera esquemática se recogen en los tres estudios en la Figura 4.1. El material y métodos empleado en cada estudio, y los resultados y discusión derivados de los mismos, se exponen a modo de apartados (ver estudios 5.1–5.4).

En general, se utilizó una dieta estándar de mantenimiento de roedores para los grupos con dieta normal y una dieta aterogénica, con alto contenido en grasa y colesterol, para provocar la esteatosis. Se realizaron distintas dietas experimentales, que incluían la combinación de las dos dietas mencionadas anteriormente, con alimentos ricos en carotenoides dietéticos, utilizando el tomate con fuente de licopeno y las espinacas como fuente de β -carotenos, luteína, y zeaxantina.

Las diferentes dietas experimentales utilizadas en cada estudio están descritas en los siguientes apartados de la Tesis Doctoral, aunque, en esta sección se muestra la composición de la dieta estándar de mantenimiento y la dieta aterogénica con alto

contenido en grasa y colesterol (**Tabla 4.1**) que se utilizaron como dietas base durante los estudios realizados.

Los análisis de las dietas y muestras biológicas recogidas en los diferentes estudios, se realizaron en los laboratorios del grupo de investigación de Nutrición y Bromatología, situado en el complejo PLEIADES-VITALIS de la Universidad de Murcia. Otros análisis se llevaron a cabo en el “Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach (FEM)” en San Michele all'Adige (Trento, Italia) y en el Departamento de Ciencias Biológicas del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (México).

Tabla 4.1. Composición de las dietas utilizadas en los estudios experimentales.

Composición (por 100 g)	Dieta Estándar^a	Dieta Aterogénica^b
Valor energético (kcal)	290	450
Proteínas (g)	14.3	17.3
Grasas (g)	4.0	21.2
Carbohidratos (g)	48	46.9
Fibra (g)	18	5.0
Colesterol (mg)	-	1.25

^aTeklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet. ^bAtherogenic Rodent Diet TD.02028 (Harlan Laboratories, Inc, Indiana, EE. UU.).

REFERENCIAS

Campbell MJ, Julious SA, Altman DG. Estimating sample sizes for binary, ordered categorical, and continuous outcomes in two group comparisons. *BMJ*. 1995; 311(7013): 1145–1148.

García-García JA, Rending-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en

investigación en educación médica. *Inv Ed Med*. 2013; 2(8): 175–231.

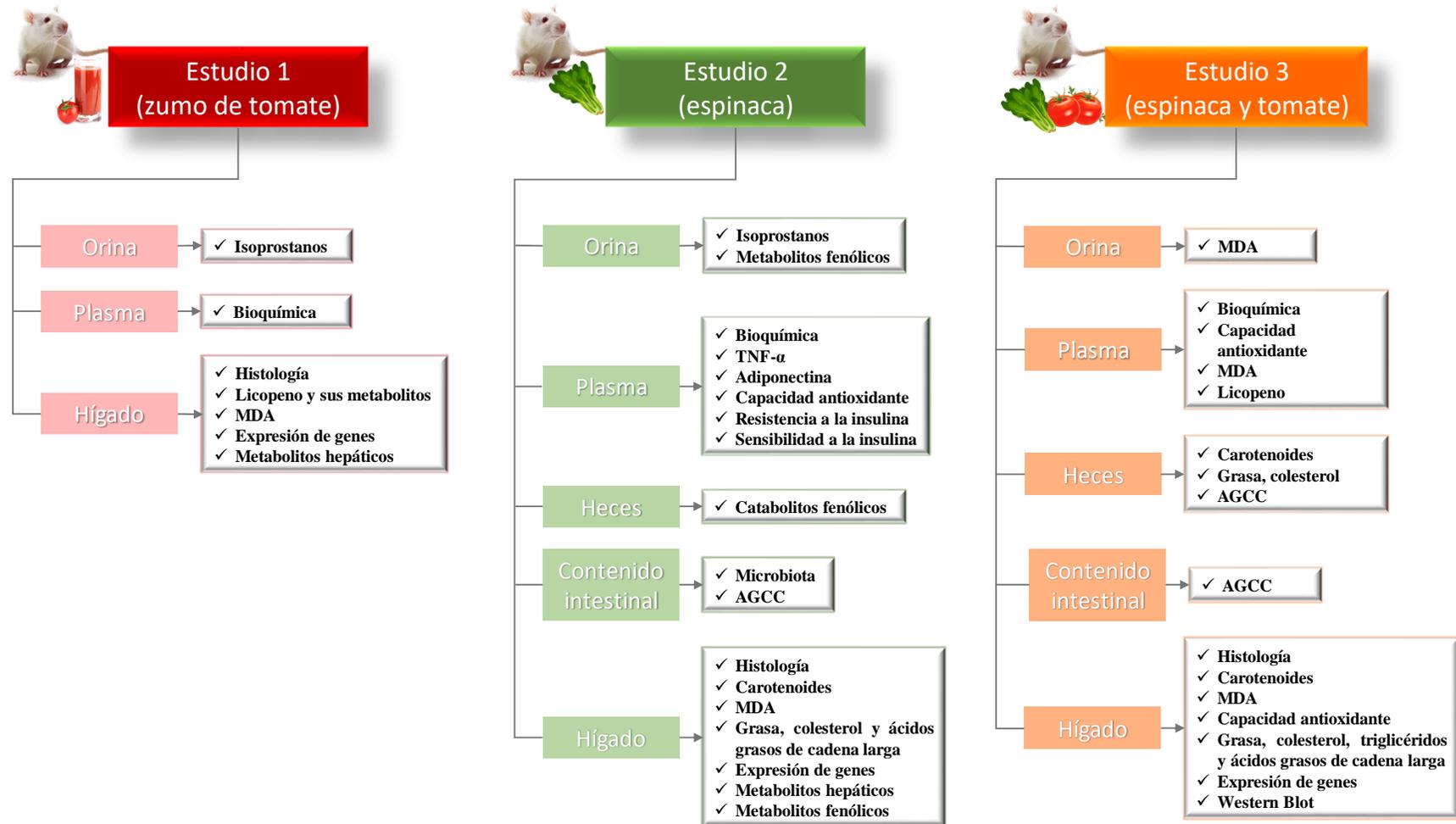


Figura 4.1. Diagrama de los parámetros analizados en las muestras biológicas de los diferentes estudios *in vivo*.

5. ESTUDIOS

5.1. (ESTUDIO 1)

La suplementación de la dieta con zumo de tomate modula la expresión de genes relacionados con la esteatosis en ratas

5.1.1. Introducción

La EHGNA afecta tanto a los países desarrollados como a los países en desarrollo y se prevé que alcance proporciones pandémicas (Zelber-Sagi *et al.*, 2017). Debido al aumento de la incidencia de obesidad en todo el mundo, la EHGNA se ha convertido en un importante problema de salud pública con una alta prevalencia y fuerte vínculo con importantes factores de riesgo cardiometabólico, así como por su posible progresión a una enfermedad hepática grave (Anstee *et al.*, 2013). La EHGNA es un grupo de enfermedades hepáticas que van desde la esteatosis hepática hasta la esteatohepatitis no alcohólica, y puede progresar a fibrosis, cirrosis, insuficiencia hepática, carcinoma hepatocelular o muerte (Murillo *et al.*, 2016). Es la manifestación hepática de los complejos trastornos metabólicos asociados con la obesidad. La EHGNA se caracteriza por una deposición excesiva de grasa en el hígado (esteatosis) y se desarrolla cuando la disponibilidad de ácidos grasos hepáticos del plasma y la síntesis de novo juntas exceden la eliminación de ácidos grasos hepáticos por oxidación y exportación de triglicéridos. La esteatosis hepática es, por lo tanto, el resultado bioquímico de un desequilibrio entre las vías complejas del metabolismo de los lípidos y se asocia con una serie de cambios adversos en el metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y las lipoproteínas en todos los tejidos del cuerpo (Fabbrini y Magkos, 2015).

La dieta mediterránea se ha propuesto como una alternativa adecuada para la reducción y el mantenimiento del peso corporal y para reducir la esteatosis, la inflamación del hígado y la fibrosis. Por este motivo, se ha recomendado para el tratamiento de la EHGNA en la guía de práctica clínica de las asociaciones europeas para el estudio del hígado, la diabetes y la obesidad (EASL-EASD-EASO) (EASL *et al.*, 2016). La dieta mediterránea combina productos marinos y granos ricos en grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, con frutas y verduras ricas en antioxidantes, como los polifenoles y

carotenoides, que tienen un efecto beneficioso en la prevención de la EHGNA, como se ha demostrado en diferentes modelos animales (Bernal *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2016; Suárez *et al.*, 2017; Zelber-Sagi *et al.*, 2017). Curiosamente, para los carotenoides no provitamina A, y particularmente para el licopeno (del tomate) (Yilmaz *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2016), existen evidencias sobre el efecto beneficioso para la prevención de la esteatosis y la inflamación en modelos murinos, a través de diferentes mecanismos, incluida la actividad de eliminación de especies reactivas de oxígeno. En un estudio previo llevado a cabo en el grupo de investigación, informamos que el consumo de zumo de tomate mejora el metabolismo de los lípidos en ratas con esteatosis inducida por una dieta grasa, actuando como un regulador del metabolismo de los lípidos al facilitar la β -oxidación mitocondrial (Martín-Pozuelo *et al.*, 2014; Fabbrini y Magkos, 2015). Por otra parte, el licopeno tiene efectos antiinflamatorios y antiproliferativos, que también actúan contra la EHGNA (Murillo *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016; Navarro-González *et al.*, 2018). La ingesta de zumo de tomate por parte de ratas con esteatosis inducida por una dieta hipercolesterolémica y rica en grasa, permitió la recuperación parcial de los niveles de aminoácidos en el hígado, particularmente los de L-carnitina, lo que podría indicar una mejor capacidad para mantener la actividad mitocondrial, relacionada con la β -oxidación, y para proteger al hígado graso contra la inflamación y la fibrosis (Bernal *et al.*, 2013). Estos cambios metabólicos fueron acompañados por una sobreexpresión de genes implicados en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, contribuyendo a una oxidación más eficiente de los ácidos grasos de cadena larga (Martín-Pozuelo *et al.*, 2014). Estos efectos pueden deberse a la interacción directa de las moléculas de carotenoides o sus metabolitos con los factores de transcripción nuclear (PPAR; RXR, RAR, LXR), y/o modificación indirecta de la actividad transcripcional a través de cambios en el estado redox celular (Sharoni *et al.*, 2012). En particular, los PPAR desempeñan un papel

importante en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de las lipoproteínas, y en la respuesta inflamatoria y vascular (Wang, 2010). Otros autores han propuesto que el licopeno puede ejercer este efecto a través de la modulación de micro-ARN. Estos son pequeños ARN no codificantes que participan en la regulación postranscripcional de los genes diana, la regulación de la síntesis de lípidos, la oxidación de ácidos grasos, el metabolismo del colesterol y la formación y secreción de lipoproteínas (O'Brien *et al.*, 2018).

Debido a que el zumo de tomate es una fuente natural de licopeno, su uso, además de proporcionar este carotenoide a la dieta, proporciona múltiples compuestos bioactivos con una amplia gama de actividades biológicas, interaccionando y dando lugar a actividades complementarias, aditivas o sinérgicas, que son mucho más interesantes desde un punto de vista nutricional que la suplementación de un solo nutriente o componente bioactivo. En este sentido, la ingesta de zumo de tomate puede mejorar parcialmente las alteraciones metabólicas inducidas por alto contenido de grasa, como aumentar la abundancia de *Lactobacillus* y disminuir la proporción de la ratio acetato: propionato en el colon, lo que sugiere una mejora potencial de los aspectos metabólicos de la EHGNA, principalmente debido a la presencia de otros nutrientes como son los carbohidratos no digeribles (García-Alonso *et al.*, 2017).

Estos hallazgos pueden conducir a nuevos objetivos para la selección de compuestos bioactivos y nutrientes contra la EHGNA. Sin embargo, es necesario dilucidar los mecanismos de acción del licopeno, tanto en la regulación del metabolismo como de la expresión de los genes, para lograr una mejor comprensión del papel del licopeno en el metabolismo hepático. Por ello, el objetivo del presente estudio fue identificar el efecto del zumo de tomate en la modulación de la expresión de genes y en

la formación de metabolitos en hepatocitos de ratas con esteatosis inducida por la dieta, con la finalidad de entender los mecanismos que actúan en el control de EHGNA.

5.1.2. Materiales y Métodos

5.1.2.1. *Zumo de tomate*

El zumo de tomate se obtuvo de un productor local y el contenido total de compuestos bioactivos se analizó de acuerdo con los métodos publicados anteriormente (Periago *et al.*, 2009; García-Alonso *et al.*, 2009). La composición nutricional de este zumo fue: proteína 0.8%, grasa 0.1%, azúcares naturales 4.7%, fibra dietética 0.8% y licopeno 12 mg/100 mL.

5.1.2.2. *Animales y diseño experimental*

El experimento se llevó a cabo con 24 ratas Sprague-Dawley macho de 8 semanas de edad en Charles River Laboratories España S. A. Las ratas se recibieron en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, y se mantuvieron bajo temperatura (22 °C) y humedad del aire (55%) controladas, y en condiciones de ciclo de luz-oscuridad de 12 h durante 2 semanas antes de comenzar el experimento. Durante este periodo, tuvieron acceso libre a la dieta y al agua del grifo y se dividieron aleatoriamente en dos grupos ($n = 12$), uno de los cuales se alimentó con una dieta estándar de laboratorio (Grupo N, Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, 4.0% de grasa Harland Laboratories, Indianapolis, IN, EE. UU.) y el otro con una dieta hipercolesterolémica y alta en grasas (Grupo H, Atherogenic Rodent Diet TD-02028, con 21.2% de grasa, 1.25% de colesterol y 0.5% de ácido cólico, Harland Laboratories, Indianapolis, IN, EE. UU.). Transcurrido el periodo de adaptación, los animales de los grupos N y H se dividieron aleatoriamente en otros dos grupos, dando cuatro grupos experimentales ($n = 6$), de

acuerdo con la dieta (N y H) y la bebida (zumo de tomate, como fuente natural de licopeno o agua): NA (dieta normal y agua), NL (dieta normal y zumo de tomate), HA (dieta hipercolesterolémica y agua) y HL (dieta hipercolesterolémica y zumo de tomate) (**Figura 5.1.1**). Después de un periodo de intervención de 5 semanas, en las que los animales tuvieron acceso *ad libitum* a la comida y bebida, las ratas se sometieron a eutanasia y se obtuvieron muestras de sangre y de hígado, que se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis.

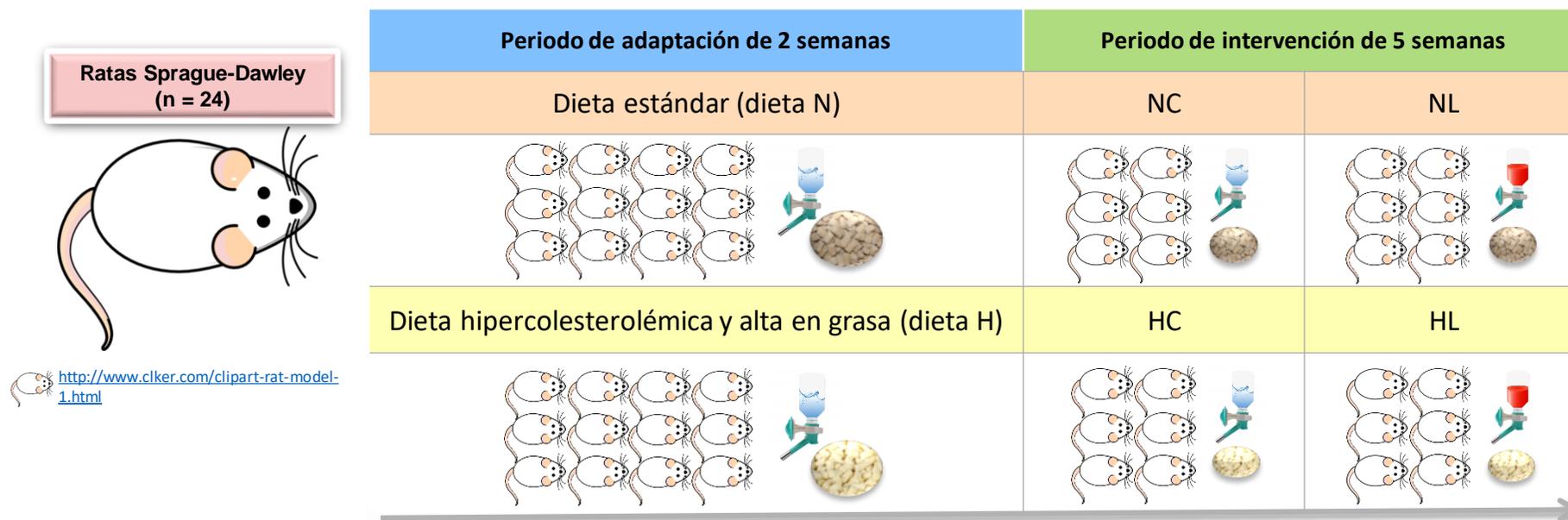


Figura 5.1.1. Diseño experimental del estudio.

5.1.2.3. Examen histopatológico

Las muestras se prepararon en bloques de parafina y las secciones transversales (4 µm de espesor) se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) para examinarlas con un microscopio óptico. La esteatosis se evaluó según lo descrito por Brunt *et al.* (1999).

5.1.2.4. Parámetros bioquímicos del plasma

Los niveles de glucosa, proteína total, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos totales (TG) y las actividades de las enzimas alanina y aspartato aminotransferasa (ALT y AST) fueron analizados utilizando un analizador automático (AU 600 Olympus Life, Hamburgo, Alemania). El colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se estimó según la fórmula Friedewald *et al.* (1972).

5.1.2.5. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo

El contenido de 15-F_{2t}-isoprostano urinario (8-*epi*-PGF_{2α}) se determinó con un kit de ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (OxiSelect™ 8-*epi*-PGF_{2α} Elisa Kit, Cell Biolabs, San Diego, CA, EE. UU.); se normalizó mediante la medición de la concentración de creatinina (Helger *et al.*, 1974). La peroxidación lipídica se analizó como el nivel de malondialdehído (MDA) en el hígado, medido con el método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) descrito por Mateos *et al.* (2005). La concentración de proteína hepática se determinó mediante el método de Lowry, modificado por Bensadoun y Weinstein (1976).

5.1.2.6. *Análisis del licopeno mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)*

El análisis del licopeno y sus metabolitos se adaptó de Seybold *et al.* (2004). Las muestras de hígado se descongelaron y 0.5 g se extrajeron tres veces con metanol/tetrahidrofurano (1/1, v/v) que contenía 0.1% de butil hidroxitolueno. Los extractos se combinaron y se secaron al vacío a 37 °C. Los residuos se suspendieron en 2 mL de etanol, se centrifugaron a 20,817 g durante 10 min a temperatura ambiente, se filtraron y se analizaron por LC/MS utilizando un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple MSD Agilent (Waldbronn, Alemania), usando las condiciones descritas por Martín Pozuelo *et al.* (2014) para la determinación de (*E*)-licopeno, (*Z*)-licopeno y los 6, 8 y 12-apo-licopenal.

5.1.2.7. *Estudio de la expresión de genes involucrados en la enfermedad de hígado graso*

El ARN total se extrajo de la muestra de hígado almacenada en RNAlater utilizando un Mini Kit TNeasy® (Qiagen, Duesseldorf, Alemania). Utilizamos un array de PCR de 96 pocillos diseñada para la evaluación de genes de enfermedad del hígado graso (PARN-157ZD-24, Qiagen, SABiosciences, Frederick, MD, EE. UU.). Este array incluye genes para la señalización de la insulina, adipoquinas, respuesta inflamatoria, apoptosis y metabolismo de carbohidratos y lípidos en el hígado (Anexo 2). Los genes de las ratas en los diferentes grupos de tratamiento se analizaron utilizando el paquete de Software PCR RT² Profiler™. Los resultados de la transcripción génica se consideraron significativos si el cambio, con un nivel de confianza $p < 0.05$, fue ≥ 1.5 veces o ≤ -1.5 veces.

5.1.2.8. *Análisis de los metabolitos del hígado por HPLC-espectrometría de masas (MS)*

La extracción y el análisis de los metabolitos se llevaron a cabo según lo descrito por Bernal *et al.* (2013). El análisis se llevó a cabo con un HPLC (serie 1200; Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas simple de cuadrupolo Agilent 6120, con una fuente de ionización ortogonal por electrospray (ESI). El proceso de extracción y el análisis se realizó en un solo paso, ya que los procesos de congelación degradan la muestra y puede haber una alteración de los resultados (Oikawa *et al.*, 2011; Bernal *et al.*, 2013).

5.1.2.9. *Análisis estadístico*

Para realizar el análisis estadístico de los parámetros analíticos en los cuatro grupos experimentales, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) junto con una prueba *post hoc* de Tukey. Además, para los parámetros con valores iniciales y finales y en el análisis del contenido de licopeno, los valores se compararon utilizando una prueba de *t* de Student pareada. Para el análisis de los metabolitos del hígado, las concentraciones se normalizaron de acuerdo con el peso de los tejidos, y para el análisis estadístico se llevó a cabo un ANOVA de dos vías seguido de una prueba *t* de Student. La tasa de error por grupo se corrigió utilizando la tasa de descubrimientos falsos (FDR) de Benjamini-Hochberg (1995) con una proporción del 5% de descubrimiento falso. El nivel de significación fue $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con Minitab versión 17.0 y el programa estadístico de IBM para las ciencias sociales (SPSS) versión 19.0.

5.1.3. Resultados

5.1.3.1. *Aumento de peso, volumen de alimento consumido y excreta*

La **Tabla 5.1.1** muestra los pesos iniciales y finales de las ratas, el consumo de alimentos y bebidas, y el consumo y la absorción de licopeno por parte de los animales. No se observaron diferencias significativas en el peso final, y la ganancia de peso corporal fue de 25.6% y 20.1% para HA y HL, respectivamente, y de 15.4% y 14.7% para NA y NL, respectivamente, con valores superiores en los grupos H, como era de esperar por el mayor valor calórico de la dieta. Se observó un aumento significativo en la ingesta de alimentos en los grupos N con respecto a los grupos H; en consecuencia, se produjo el mismo patrón para las heces excretadas, debido a la reducción de la ingesta de alimentos de los grupos H como resultado del alto valor calórico de la dieta H. Con respecto a la ingesta de bebidas, los grupos L mostraron un mayor consumo (63.6 y 78.8 ml para NL y HL, respectivamente), por lo que los animales mostraron preferencia por el zumo de tomate, lo que resultó en una excreción de orina significativamente mayor. Para los valores medios de la ingesta de licopeno y la excreción de licopeno en las heces, no se observaron diferencias significativas, con una absorción aparente de 68.1% en ratas HL y 55.7% en ratas NL.

5.1.3.2. *Contenido de licopeno y sus isómeros en el hígado*

El contenido de licopeno, sus isómeros y sus metabolitos en el hígado se muestran en la **Tabla 5.1.2**. El contenido total de licopeno y su isómero *all-trans* fue significativamente mayor en el grupo HL, en comparación con NL. Para los isómeros *cis*, se registró una concentración promedio de 1.05 $\mu\text{g/g}$ en ambos grupos (obtenido la suma de 9-*cis* y 13-*cis* licopeno). Sin embargo, los metabolitos de apo-licopeno no se detectaron en ninguna muestra.

Tabla 5.1.1. Ingesta de alimento y bebida, excreción de heces y orina, ingesta de licopeno y absorción aparente de licopeno de animales de los cuatro grupos experimentales, en el periodo de intervención de 5 semanas¹.

Parámetros	NA	NL	HA	HL
Peso corporal inicial (g)	428 ± 75 ^a	432 ± 47 ^a	375 ± 18 ^b	406 ± 20 ^b
Peso corporal final (g)	494 ± 65	496 ± 70	471 ± 20	489 ± 25
Incremento de peso corporal (%)	15.4	14.7	25.6	20.1
Ingesta de comida (g/día)	20 ± 2.6 ^a	17.8 ± 1.8 ^b	13.1 ± 1.9 ^c	12.0 ± 4.6 ^c
Ingesta de comida (kcal/día)*	58	52	59	54
Ingesta de agua o zumo de tomate (mL/día)	25.8 ± 4.3 ^c	63.6 ± 13.3 ^a	44.3 ± 12.2 ^b	78.8 ± 12.6 ^a
Ingesta de bebida (kcal/día)**	0	16	0	20
Ingesta total (kcal/día)	58	68	59	74
Heces excretadas (g/día)	10.8 ± 1.2 ^a	10.3 ± 0.9 ^a	2.3 ± 1.4 ^b	3.9 ± 1.3 ^b
Orina excretada (mL/día)	12.2 ± 4.2 ^c	19.5 ± 8.5 ^{ab}	15.4 ± 3.1 ^{bc}	33.5 ± 13.7 ^a
Ingesta de licopeno (mg/día)	nd	3.7 ± 0.8	nd	4.6 ± 0.6
Licopeno excretado en heces (mg/día)	nd	1.57 ± 0.4	nd	1.48 ± 0.2
Absorción aparente de licopeno (%)	nd	55.7 ± 15.3	nd	68.1 ± 11.4

¹Los valores se dan como media ± SEM. ^{a-c} Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas para $p < 0.05$. * Datos estimados en función del consumo de alimento y su valor energético (dieta N: 290 kcal/100 g y dieta H: 450 kcal/100 g). ** Datos estimados en función de la ingesta de zumo de tomate y su valor energético (25 kcal/100 mL). NA (dieta normal y agua), NL (dieta normal y zumo de tomate), HA (dieta hipercolesterolémica y agua) y HL (dieta hipercolesterolémica y zumo de tomate). nd: no detectado

Tabla 5.1.2. Contenido hepático de los metabolitos del licopeno, el licopeno total y sus isómeros, y el peso del hígado en los cuatro grupos experimentales, al final del periodo de intervención de 5 semanas¹.

Parámetros	NA	NL	HA	HL
6-apo-licopenal	nd	Nd	nd	Nd
8-apo-licopenal	nd	Nd	nd	Nd
12-apo-licopenal	nd	Nd	nd	Nd
9- <i>cis</i> licopeno (µg/g)	nd	0.54 ± 0.10	nd	0.81 ± 0.15
13- <i>cis</i> licopeno (µg/g)	nd	0.51 ± 0.26*	nd	0.25 ± 0.12
All- <i>trans</i> -licopeno (µg/g)	nd	1.71 ± 0.30	nd	3.49 ± 1.79*
Licopeno total (µg/g)	nd	2.75 ± 0.33	nd	4.55 ± 0.80*
Peso del hígado (g)	11.91 ± 1 ^b	12.82 ± 1.31 ^b	22.74 ± 2.66 ^a	24.12 ± 2.72 ^a

¹Los valores se dan como media ± SEM. * Indica una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos NL y HL

según una prueba *t* pareada ($p < 0.05$). ^{a, b} Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

5.1.3.3. Examen histopatológico y parámetros bioquímicos

Debido a la dieta alta en grasa, los grupos de HA y HL desarrollaron esteatosis con la presencia de vacuolas en el interior de los hepatocitos. Sin embargo, se observaron diferencias en el grado de esteatosis, al presentar las ratas del grupo HL, que tomaron zumo de tomate, unas vacuolas lipídicas más pequeñas (**Figura 5.1.2. e, f**). En ambos grupos se detectó un infiltrado inflamatorio leve, compuesto de células mononucleares, debido al alto contenido de grasa (**Figura 5.1.2**). Asimismo, como consecuencia de la esteatosis los animales de los grupos HA y HL mostraron niveles elevados de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) (**Tabla 5.1.3**), aunque según León-Goñi *et al.*, (2011) estaban dentro del rango de los valores de referencia. También se observó en estos grupos un aumento significativo del peso del hígado (**Tabla 5.1.2**) con respecto a los observados en el grupo control. Por el contrario, los hígados de las ratas de los grupos N mostraron una arquitectura normal y no evidenciaban esteatosis.

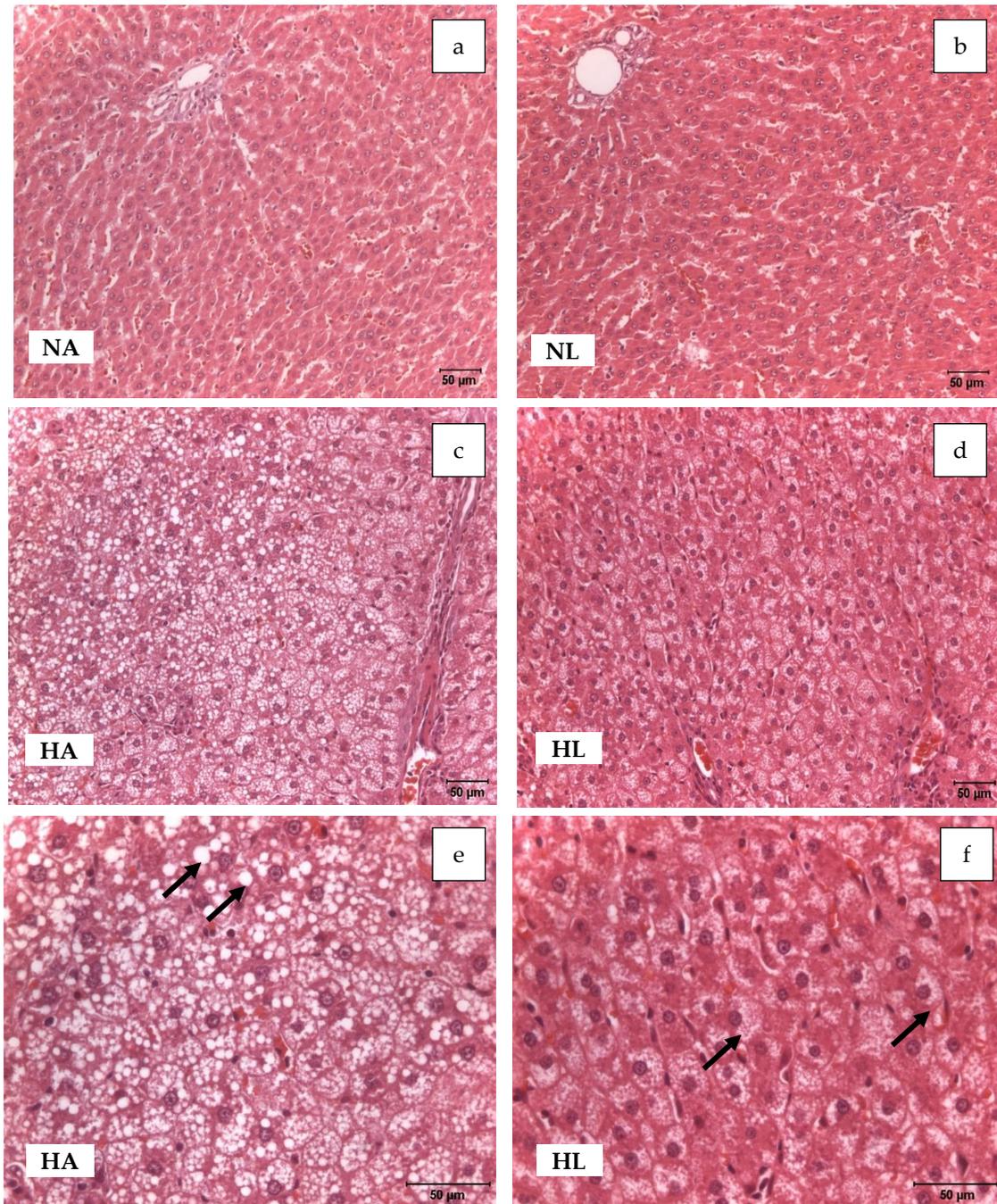


Figura 5.1.2. Estudio microscópico de luz de muestras de hígado de animales de los cuatro grupos experimentales (H-E x20; imágenes (a-d) y H-E x40; imágenes (e, f)). Las imágenes (a) y (b) muestran una estructura hepática normal. Las imágenes (c), (d), (e) y (f) muestran la degeneración vacuolar de los hepatocitos en los grupos HA y HL, debido a la acumulación de grasa. En HA, se pueden identificar grandes formaciones vacuolares en algunas áreas, mientras que en HL hay una distribución de pequeñas gotas de grasa.

La **Tabla 5.1.3** muestra los resultados para los parámetros bioquímicos del plasma. No se observaron diferencias entre los grupos en los valores iniciales, tomados al inicio del periodo de intervención (datos no mostrados). Por el contrario, los cambios más importantes se detectaron en los valores finales, al comparar los grupos H y N. Al final del estudio, se observó un incremento significativo de colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL y TGA en las ratas de los grupos HA y HL, debido a la dislipidemia inducida por la esteatosis. Sin embargo, el colesterol HDL se mantuvo sin cambios a lo largo del estudio.

Tabla 5.1.3. Parámetros bioquímicos finales en plasma, las actividades de las enzimas hepáticas y las concentraciones de isoprostanos urinarios se analizaron en los cuatro grupos experimentales después del periodo de intervención de 5 semanas (NA: dieta normal y agua, NL: dieta normal y zumo de tomate como bebida, HA: hipercolesterolémico y alta dieta rica en grasas y agua, LH: dieta hipercolesterolémica y alta en grasas y zumo de tomate).¹

Parámetros	NA	NL	HA	HL
Glucosa (mg/dL)	136 ± 23	142 ± 40	158 ± 29	154 ± 33
Colesterol total (mg/dL)	105 ± 24 ^{bc}	85 ± 20 ^c	140 ± 42 ^{ab}	164 ± 12 ^a
Colesterol LDL (mg/dL)	36 ± 9 ^b	39 ± 9 ^b	98 ± 28 ^a	89 ± 9 ^a
Colesterol HDL (mg/dL)	44 ± 9	33 ± 6	30 ± 4	34 ± 5
Colesterol VLDL (mg/dL)	13 ± 2 ^b	11 ± 3 ^b	20 ± 4 ^a	24 ± 5 ^a
Triglicéridos (mg/dL)	66 ± 17 ^b	63 ± 16 ^b	98 ± 15 ^a	110 ± 12 ^a
ALT (U/L)	39 ± 5 ^b	48 ± 15 ^b	80 ± 2 ^a	97 ± 29 ^a
AST (U/L)	65 ± 9 ^b	76 ± 14 ^b	124 ± 20 ^a	132 ± 24 ^a
Isoprostanos en orina (pg/mL)	940 ± 86 ^b	904 ± 55 ^b	1303 ± 359 ^a	1739 ± 200 ^a

¹Los Valores se dan como media ± SD. ^{a,b} Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

Con respecto a los biomarcadores del estrés oxidativo (**Tabla 5.1.3**), se observaron diferencias significativas entre los grupos H y N para las concentraciones finales de isoprostanos urinarios, como consecuencia de una mayor peroxidación lipídica asociada con el consumo de la dieta grasa. Para la MDA en el hígado se observó el mismo comportamiento, con niveles significativamente más altos en los grupos H; hasta 4 veces

más que en los grupos N (**Tabla 5.1.4**). Hay que destacar, que el consumo de zumo de tomate y la acumulación de licopeno en el organismo, no redujeron las concentraciones de los biomarcadores de oxidación.

Tabla 5.1.4. Concentración de malondialdehído (MDA) y relaciones redox en el hígado de las ratas de los cuatro grupos experimentales (NA: dieta normal y agua, NL: dieta normal y zumo de tomate como bebida, HA: hipercolesterolémica y dieta rica en grasas y agua, y LH: dieta hipercolesterolémica y alta en grasas y zumo de tomate).¹

Parámetros	NA	NL	HA	HL
MDA (nmol/mg de proteína)	0.028 ± 0.003 ^b	0.031 ± 0.003 ^b	0.10 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.02 ^a
GSH/GSSG	0.188 ± 0.028 ^b	0.252 ± 0.030 ^a	0.114 ± 0.022 ^c	0.136 ± 0.017 ^c
NAD/NADH	2.3 ± 0.44	2.09 ± 0.49	2.76 ± 0.62	2.93 ± 0.89

¹Los valores se dan como media ± SD. ^{a,b} Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

5.1.3.4. Expresión de genes en el hígado de rata

La **Tabla 5.1.5** muestra los genes expresados diferencialmente ($p < 0.05$) con valor de expresión o *fold change* mayor o menor de 1.5. Los genes con un valor de expresión significativo se relacionaron con la β -oxidación de los ácidos grasos y con el transporte y metabolismo del colesterol y otros lípidos. Para calcular la expresión relativa, se tomó como referencia el grupo de ratas NA y como resultado tanto la dieta como el consumo de zumo de tomate modificaron el transcriptoma hepático. Diez, quince y seis genes fueron modulados en los NL, HA y HL, respectivamente, en comparación con el grupo NA. En el grupo al que suministró zumo de tomate con la dieta normal (NL) se sobreexpresaron de forma significativa genes involucrados en la β -oxidación, transporte y síntesis de ácidos grasos y colesterol, como el acil-CoA oxidasa 1 (*ACOX1*), el receptor de trombospondina (*CD36*), el citocromo P450 7A1 (*CYP7A1*), el factor de transcripción de unión al elemento regulador de esterol 2 (*SREBF2*) y el esteroil-CoA desaturasa 1 (*SCD1*). Por el contrario, los genes que codifican la lipoproteína lipasa (*LPL*), la acil-CoA

sintetasa para ácidos grasos de cadena larga 5 (*ACSL5*), y la apolipoproteína B (*APOB*) fueron expresados a la baja. Es de destacar, que el receptor nuclear 1H2 (*NRIH2*) e interleucina 10 (*IL10*) también estuvieron sobreexpresados de forma significativa, en comparación con la de ratas NA.

En el grupo de HA, se observó una sobreexpresión significativa de los genes que codifican proteínas transportadoras de lípidos, como el de la carnitina palmitoiltransferasa 2 y 1A (*CPT2* y *CPT1A*), el de la proteína transportadora de casetes de unión a ATP, subfamilia A, miembro 1 (*ABCA1*) y subfamilia G, miembro 1 (*ABCG1*), mientras que el *CD36* fue expresado a la baja. Los genes relacionados con la formación de lipoproteínas, *APOB* y *LPL*, también se expresaron en exceso. Respecto a genes involucrados en el metabolismo de diferentes lípidos, *ACSL5*, 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductasa (*HMGCR*) y diacilglicerol O-aciltransferasa 2 (*DGAT2*), así como *CYP7A1* (implicados en la síntesis de ácidos biliares), mostraron una sobreexpresión significativa, al igual que el gen que codifica el receptor de leptina (*LEPR*). Estas alteraciones en la expresión génica estuvieron asociadas con la ingesta de la dieta alta en grasa, aunque el consumo de zumo de tomate tuvo un impacto significativo en la expresión génica, porque en ratas HL se observó una regulación positiva significativa para los genes *CD36*, proteína 5 de unión a ácidos grasos, epidérmica (*FABP5*), pirofosfatasa inorgánica 1 (*PPAI*) y factor nuclear de hepatocitos 4 α (*HNF4A*), mientras que *LPL* y *APOB* mostraron represión. Además, para HL, solo *NRIH4* y *HNF4A* se sobreexpresaron de manera significativa, en comparación con HA.

Tabla 5.1.5. Símbolo del gen, nombre del gen y “*Fold change*” de los genes que mostraron un valor de expresión superior o inferior mayor a 1.5 ($p < 0.05$) en los hígados de rata¹.

Símbolo	Nombre del Gen	NL-NA	HA-NA	HL-NA	HL-HA
<i>β-oxidación de ácidos grasos</i>					
<i>Cpt2</i>	Carnitine palmitoyltransferase 2	-	4.51	-	-
<i>Cpt1a</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	-	2.52	-	-
<i>Acox1</i>	Acyl-coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	1.90	-	-	-
<i>Transporte y metabolismo del colesterol</i>					
<i>Abca1</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1	-	2.39	-	-
<i>Hmgcr</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	-	1.52	-	-
<i>Cd36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	5.84	-3.28	4.23	-
<i>Pparg</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	-	1.64	-	-
<i>Abcg1</i>	ATP-binding cassette, subfamily G, member 1	-	2.43	-	-
<i>Cyp7a1</i>	Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	1.52	1.51	-	-
<i>Lepr</i>	Leptin receptor	-	2.43	-	-
<i>Nr1h2</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	1.66	-1.68	-	-
<i>Nr1h4</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	-	-	-	1.80
<i>Srebf2</i>	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	2.27	-	-	-
<i>ApoB</i>	Apolipoprotein B	-6.43	6.80	-4.66	-
<i>Transporte y metabolismo de otros lípidos</i>					
<i>Scd1</i>	Stearoyl-coenzyme A desaturase 1	2.09	-	-	-
<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	-4.05	6.22	-3.33	-
<i>Acs15</i>	Acyl-coa synthetase long-chain family member 5	-1.64	1.90	-	-
<i>Dgat2</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	-	1.51	-	-
<i>Ppal</i>	Pyrophosphatase (inorganic) 1	-	-2.20	3.57	-
<i>Fabp5</i>	Fatty acid binding protein 5, epidermal	-	-	2.99	-
<i>Hnf4a</i>	Hepatocyte nuclear factor 4, alpha	-	-	1.76	1.79
<i>Il10</i>	Interleukin 10	2.83	-	-	-

¹El valor de expresión o *fold change* para cada gen en los grupos HA, HL y NL se calculó tomando como referencia un valor de 1 para el grupo NA. Para la comparación de HA vs. HL, se asignó como referencia el valor de 1 al grupo HA.

5.1.3.5. Niveles intracelulares de metabolitos hepáticos

Aunque no determinamos las proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente, sí analizamos los metabolitos involucrados en varias funciones metabólicas. La influencia de la dieta y la ingesta de zumo de tomate en estos aminoácidos se muestra en la **Figura 5.1.3.**

La dieta alta en grasa indujo mayores cambios metabólicos; sin embargo, el consumo de zumo de tomate produjo cambios en el perfil antioxidante. Para la mayoría de los metabolitos analizados, su concentración en el hígado se redujo con la dieta grasa, excepto para glicina (Gly), prolina (Pro), taurina (Taurine), fenilalanina (Phe) y homocisteína (Homo-Cys); no obstante, la arginina (Arg) no detectada en los grupos N tuvo un valor medio de 34.9 nmol/g en HA y 15.9 nmol/g en HL. También se detectaron cambios importantes en las concentraciones hepáticas de metionina (Met), histidina (His) y ácido glutámico (Glu), que aumentaron en ratas HL.

Además, la **Figura 5.1.4** muestra los cambios en las concentraciones de intermedios redox y nucleótidos producidos por la dieta y el consumo de zumo de tomate. Los efectos fueron similares para el glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG), así como para (nicotinamida adenina dinucleótido) NAD, (nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida) NADH y (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) NADP, con valores más bajos en los grupos H que en los grupos N. En consecuencia, el ratio redox GSH/GSSG y NAD/NADH se vieron afectadas por la dieta grasa y la esteatosis, pero se observó una mejoría después de la ingesta de zumo de tomate y la acumulación de licopeno en el hígado de ratas NL (**Tabla 5.1.4**).

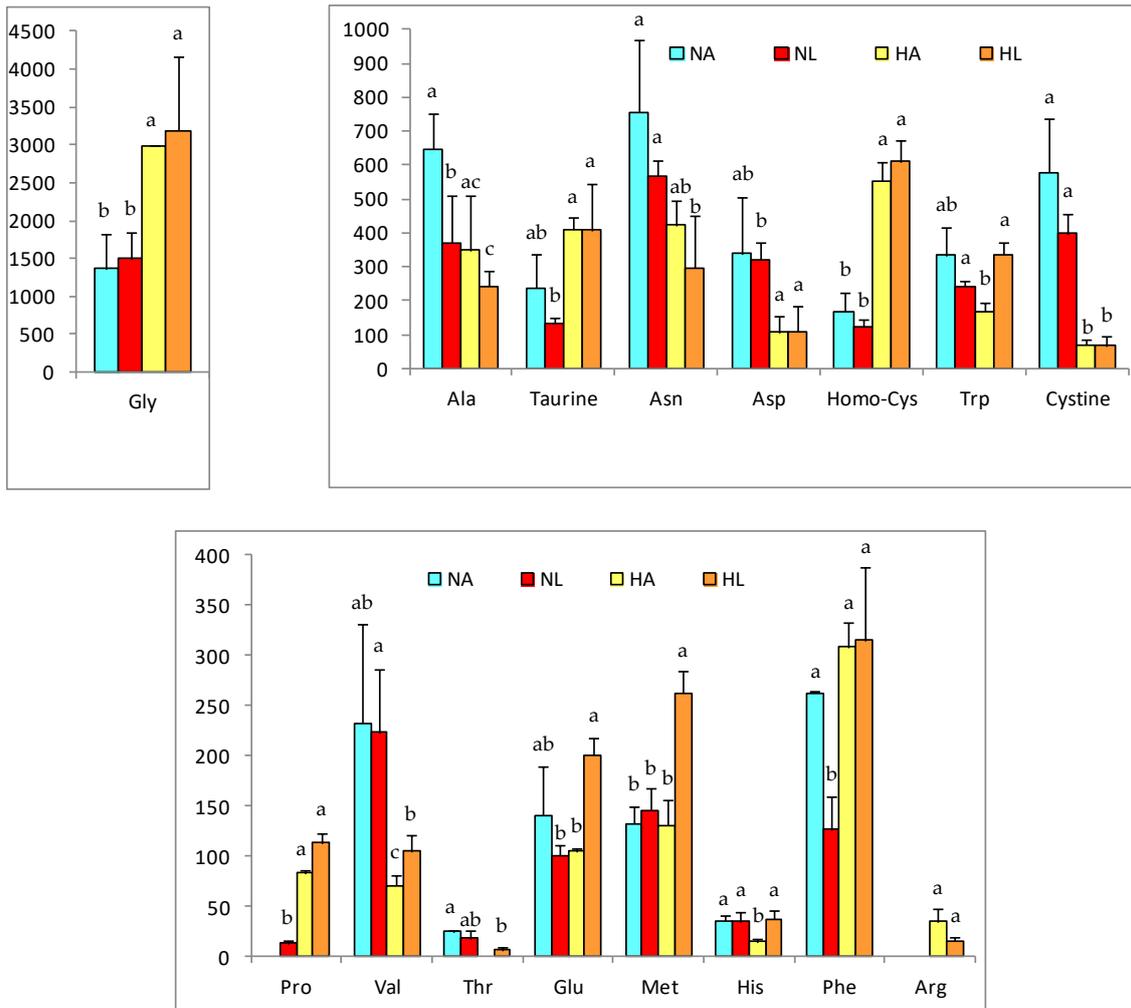


Figura 5.1.3. Concentraciones de aminoácidos relevantes en el hígado de ratas de los cuatro grupos experimentales (NA: dieta normal y agua, NL: dieta normal y zumo de tomate como bebida, HA: dieta hipercolesterolémica y alta en grasa y agua, HL: dieta hipercolesterolémica y alta en grasa y zumo de tomate). Los valores de concentración se dan en nmol/g, como media \pm SEM. ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

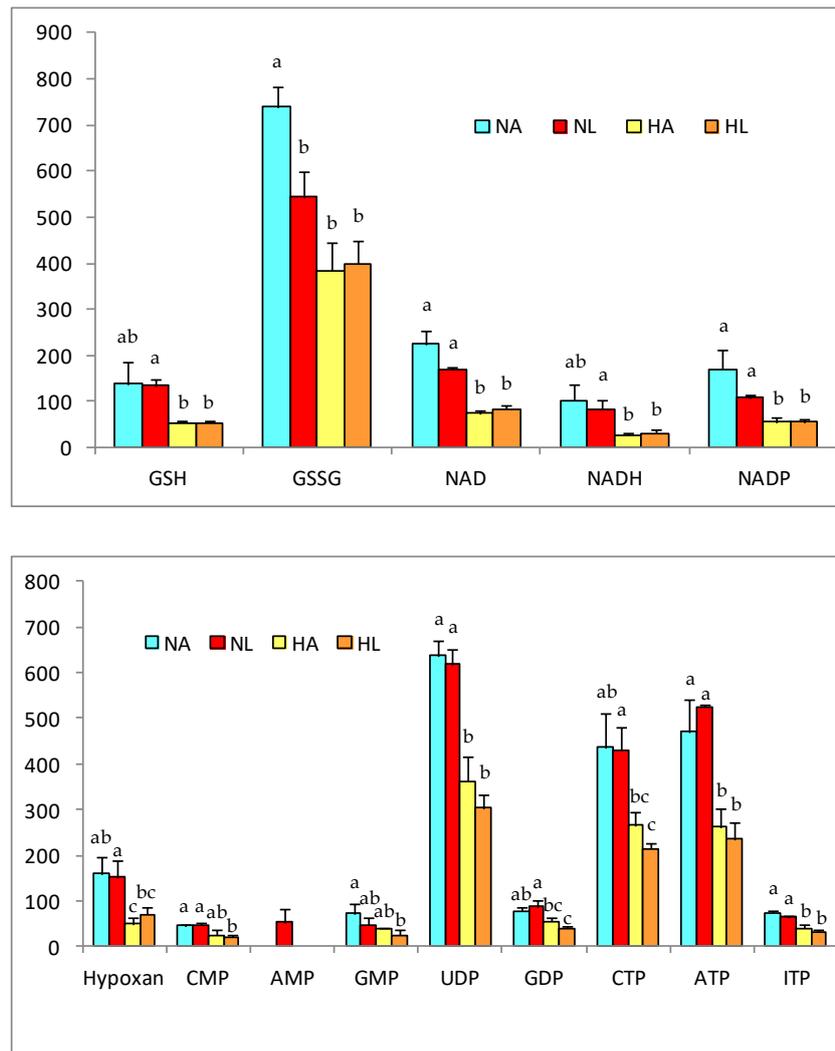


Figura 5.1.4. (a) Antioxidantes y **(b)** nucleótidos en el hígado de ratas de los cuatro grupos experimentales (NA: dieta normal y agua, NL: dieta normal y zumo de tomate como bebida, HA: dieta hipercolesterolémica y alta en grasa y agua, HL: dieta hipercolesterolémica y alta en grasa y zumo de tomate). La altura de la barra indica el valor medio para cada grupo y la barra de error indica la desviación estándar. ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). GSH: L-glutación; GSSG: forma oxidada de L-glutación; NAD: nicotinamida adenina dinucleótido; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; CMP: monofosfato de citidina; AMP: monofosfato de adenosina; GMP: monofosfato de guanosina; UDP: difosfato de uridina; GDO: difosfato de guanosina; CTP: trifosfato de citidina; ATP: trifosfato de adenosina; ITP: trifosfato de inosina.

5.1.4. Discusión

5.1.4.1. Señales de esteatosis

En los países desarrollados, la EHGNA está aumentando debido a la incidencia de la obesidad, y actualmente es más prevalente que la enfermedad hepática inducida por el

alcohol. Varios estudios han informado sobre el efecto beneficioso de los carotenoides en la dieta, especialmente el licopeno, para la prevención y el tratamiento de la esteatosis (Bernal *et al.*, 2013; Martín-Pozuelo *et al.*, 2014; Murillo *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016).

En el presente estudio, la dieta experimental con alto contenido en grasa y colesterol se utilizó como modelo para inducir la esteatosis y la obesidad (Moreira *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2009) La EHGNA se confirmó mediante el análisis histológico del hígado y la dislipidemia plasmática.

Basados en estudios previos (Bernal *et al.*, 2013; Martín-Pozuelo *et al.*, 2014), seleccionamos el zumo de tomate como una fuente natural de licopeno, para identificar el efecto de este carotenoide sobre la progresión de la esteatosis y sobre la expresión de genes relacionados con rutas metabólicas de con esta patología. El licopeno fue digerido y su absorción fue facilitada por el consumo de la dieta alta en grasa, ya que la grasa facilita el transporte de los carotenoides al incorporarlos a las micelas y permitiendo su absorción por los enterocitos (Maiani *et al.*, 2009; Bravo *et al.*, 2013). En consecuencia, se detectó licopeno (principalmente *all-trans* y *9-cis*-licopeno) en el hígado de los animales de los grupos NL y HL. No se detectó apo-licopeno, probablemente debido a la preferencia por los isómeros *cis* de la enzima carotenoide monooxigenasa, que se reprime cuando la β -oxidación no funciona correctamente, como ocurre durante la esteatosis (Wang, 2012).

Con respecto a los parámetros bioquímicos, la esteatosis causó dislipidemia en animales alimentados con la dieta grasa (grupos HA y HL), mientras que el consumo de zumo de tomate disminuyó los niveles de colesterol total en ratas NL. El efecto hipolipemiente del licopeno, que se encuentra en ratas sanas, se ha reportado en otros estudios en animales y humanos (Mordente *et al.*, 2011), pero no se observó en animales

con esteatosis. Sin embargo, en el grupo HL los niveles finales de colesterol aumentaron, en comparación con los valores iniciales, posiblemente debido a su formación a partir de VLDL, lo que indica la transferencia de lípidos desde el hígado a los tejidos periféricos, estimulados por el licopeno (Choi y Ginsberg, 2011). Aunque los animales de los grupos H tenían hepatocitos con vacuolas de grasa, el examen histológico mostró que en el grupo HA las vacuolas lipídicas eran más grandes que las del grupo HL. Esto sugiere que el licopeno podría tener un efecto preventivo en la EHGNA, reduciendo la acumulación de grasa en los hepatocitos y facilitando su transporte a otros tejidos.

Otra característica de la esteatosis es el estrés oxidativo asociado con el aumento de la peroxidación lipídica. El mayor estrés oxidativo fue confirmado por los niveles más altos de MDA hepática en los grupos H, en relación con los grupos N, lo que indica una peroxidación de los lípidos en paralelo con el deterioro hepático avanzado (Musso *et al.*, 2009; Sookoian *et al.*, 2010). Además, el análisis de los isoprostanos urinarios confirmó el estado de estrés oxidativo en los animales con esteatosis inducida. Para evaluar el estado oxidativo, también tomamos en cuenta los niveles hepáticos de GSH y GSSG, que fueron significativamente más bajos en el grupo H, así como la relación GSH/GSSG, que también indicó un gran estrés oxidativo. Aunque el consumo de zumo de tomate no produjo una disminución significativa en los biomarcadores de oxidación, en ratas del grupo NL hubo una ligera disminución en GSSG y, por lo tanto, una mejora significativa en la relación GSH/GSSG. Este hallazgo concuerda con investigaciones anteriores en las que informamos que el licopeno favorece la formación de glutatión, que restaura el equilibrio redox intracelular (Bernal *et al.*, 2013).

Además de valorar los posibles mecanismos de acción del licopeno como la prevención de la acumulación de lípidos en el hígado y la reducción de estrés oxidativo, al actuar como un antioxidante dietético, evaluamos su posible efecto como un modulador

de la expresión génica, utilizando un array específico para el hígado graso. En la literatura científica, la EHGNA se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos; en particular, la síntesis de ácidos grasos y la esterificación de triglicéridos, modificando su oxidación en mitocondrias y peroxisomas y el almacenamiento de lípidos dentro de los hepatocitos (Kohjima *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011; Auguet *et al.*, 2014). En un estudio anterior, llevado a cabo en el grupo de investigación se observó que el consumo de zumo de tomate y la acumulación de licopeno en el hígado, modulaba la expresión de genes relacionados con la β -oxidación de ácidos grasos (Martín-Pozuelo *et al.*, 2014). En el presente trabajo, siguiendo un modelo experimental similar, aunque con un aporte menor de licopeno, hemos investigado los efectos del licopeno sobre los genes involucrados en la EHGNA.

5.1.4.2. Cambios en la expresión génica relacionados con el hígado graso

Los cambios en la expresión génica del grupo HA se relacionaron con la esteatosis (**Figura 5.1.5a**) (Kohjima *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011; Auguet *et al.*, 2014), por lo que se observó una modulación de genes involucrados en llevar el colesterol al hígado, junto con su posterior excreción en forma de ácidos biliares (*CYP7A1*) o su almacenamiento en vacuolas (*ABCA1* y *ABCG1*), lo que coincide con la aparición de las lesiones histológicas descritas en los hígados de rata (Yvan-Charvet *et al.*, 2010). Además, la sobreexpresión de los genes *ACSL5* y *DGAT2* nos indicaría una mayor síntesis de triglicéridos (Mashek *et al.*, 2006; Zammit, 2013), que se excreta posteriormente desde el hígado como VLDL, liberando ácidos grasos hacia los tejidos para su consumo y obtención de energía (Choi y Ginsberg, 2011). Este proceso metabólico se asociaría con la sobreexpresión observada para los genes *APOB* y *LPL* (Murdoch y Breckenridge, 1995; Mason, 1998). Aunque, la secreción de VLDL proporciona un mecanismo para la reducción de los TG

intrahepáticos; la tasa de secreción en sujetos con EHGNA no es capaz de compensar adecuadamente la mayor tasa de acumulación de TG, por lo que se mantiene la esteatosis (Fabbrini *et al.*, 2010), debido al alto contenido de grasa en la dieta. Además, la sobreexpresión de los transportadores *CPT1A* y *CPT2* nos indicaría un aumento en la β -oxidación mitocondrial, en respuesta a la mayor acumulación de grasa en el hígado (Van der Leij *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que la llegada de grasa al hígado es abundante, los hepatocitos responden previniendo la entrada de más lípidos, por la regulación transcripcional negativa del gen *CD36*, que codifica la proteína de membrana transportadora de lípidos, por lo que se inhibiría el paso de grasa a través de la membrana plasmática (Mason, 1998).

Otro proceso regulatorio, estaría descrito por la sobreexpresión del gen *LEPR* en el tejido adiposo, que estimula la saciedad para bloquear la ingesta de alimentos (Lu *et al.*, 2015). En contraste, la estimulación de la síntesis de colesterol en animales del grupo HA es consistente con los informes que relacionan la expresión de *HMGCR* con la gravedad del daño hepático causado por la esteatosis, asociando esto con una mayor maduración de SREBP-2 y disminución de la fosforilación de la HMGCR, lo que conlleva a un aumento de la síntesis de colesterol (Min *et al.*, 2012). Finalmente, la sobreexpresión de *PPAI*, tal como se encuentra en ratas HA, se debe a su relación con diversas reacciones metabólicas, se ha relacionado con trastornos en el metabolismo de los lípidos derivados de la EHGNA (Martín-Pozuelo *et al.*, 2014).

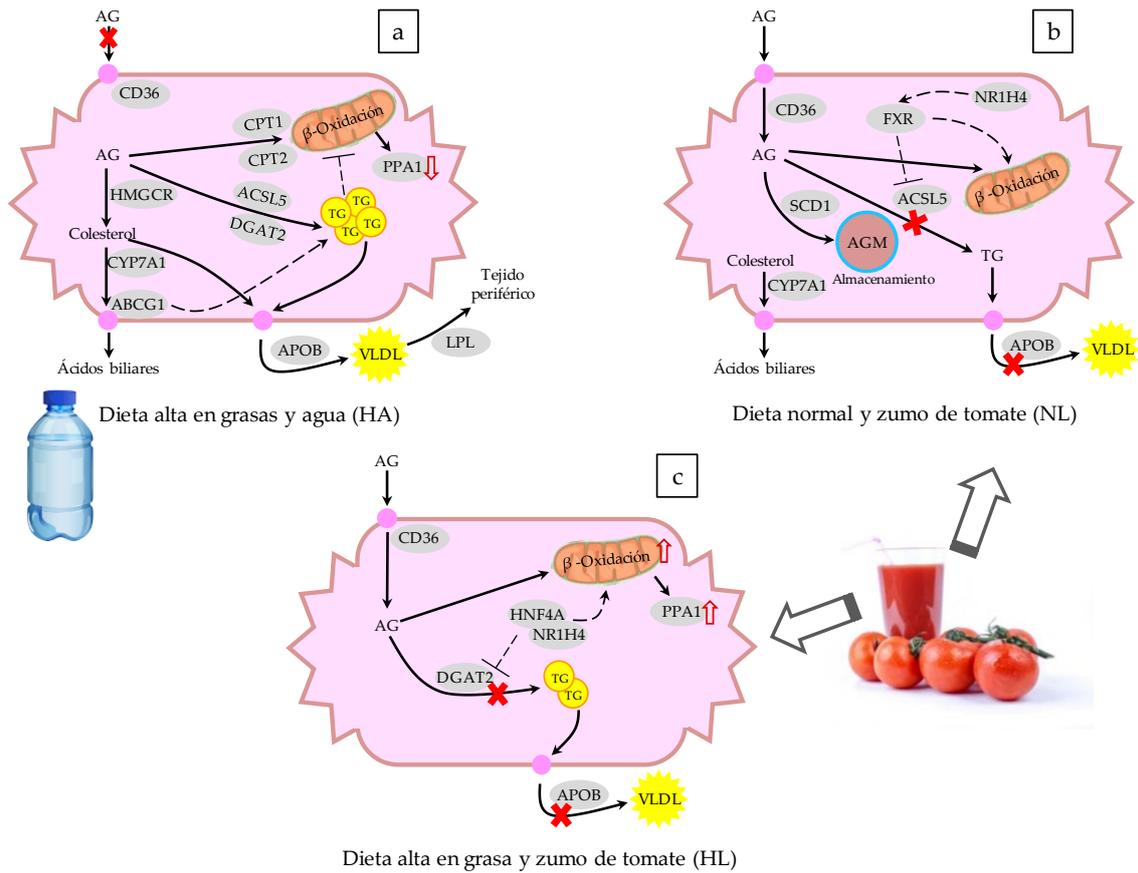


Figura 5.1.5. Representación esquemática de los cambios en la expresión de los genes implicados en la enfermedad del hígado graso después de administrar (a) una dieta hipercolesterolémica y alta en grasa y agua, (b) una dieta normal y zumo de tomate, y (c) una dieta hipercolesterolémica y alta en grasa y zumo de tomate a un modelo murino. AG: ácidos grasos, TG: triglicéridos, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, AGM: ácidos grasos monoinsaturados. Las flechas continuas indican el flujo de metabolitos, las flechas discontinuas representan la regulación hacia arriba o hacia abajo, y los genes se representan como óvalos grises. Los genes están listados en la **Tabla 5.1.4**.

Cabe destacar que la ingesta de zumo de tomate influyó en la entrada de lípidos en los hepatocitos a través de la sobreexpresión de *CD36* en ratas tanto NL como HL, al contrario de lo que se observó en ratas HA (**Figura 5.1.5b, c**). Moussa *et al.* (2011) informaron que *CD36* funciona como un transportador trans-membrana de carotenoides, principalmente licopeno y luteína, lo que explica su actividad cuando el licopeno está presente. Además, la liberación de triglicéridos se redujo mediante la supresión de *APOB* y *LPL* (Mason, 1998), lo que llevó a la acumulación de lípidos en los hepatocitos, pero

también se evitó la liberación de licopeno acumulado en ratas HL, favorecida por la actividad de *FABP5*, que se ha informado que es un transportador de estructuras lipídicas de cadena larga, como el licopeno y otros carotenoides (Armstrong *et al.*, 2014). El ARNm del receptor X del hígado (LXR), codificado por *NR1H2*, se sobreexpresó en ratas NL. El LXR tiene un efecto homeostático a nivel transcripcional, que estimula la síntesis de lípidos a través de SREBF2 (Tainaka *et al.*, 2011) y la excreción de ácidos biliares, mediante la activación de *CYP7A1*, logrando así un equilibrio en el contenido de colesterol hepático. La acumulación de lípidos producida por los transportadores de membrana y la falta de síntesis de lipoproteínas favorecen la expresión de *ACOX1*, lo que lleva a la oxidación de los lípidos en los peroxisomas y, por lo tanto, a la recuperación del equilibrio de los lípidos hepáticos. Otra modificación del metabolismo de los lípidos es la desaturación de los ácidos grasos, debido al efecto de *SCD1*, para dar ácidos grasos insaturados, disminuyendo así su toxicidad y evitando su almacenamiento. Además, la síntesis de triglicéridos se suprime por una disminución en la actividad de *ACSL5*, evitando así la acumulación de triglicéridos, ya que la ruta de las lipoproteínas también se inhibe (Tainaka *et al.*, 2011). La ingesta de zumo de tomate por animales sanos moduló el metabolismo de los lípidos y redujo la inflamación, debido a la sobreexpresión de *IL10*, el gen que codifica esta citoquina antiinflamatoria. Este efecto podría estar relacionado con la mayor proporción de GSH/GSSG encontrada en este grupo, ya que el estrés oxidativo está implicado en la inflamación y diferentes trastornos metabólicos. Aunque el consumo de zumo de tomate no tuvo un gran efecto sobre el metabolismo de los lípidos de las ratas del grupo HL, la regulación positiva de una *PPAI* sugiere una alta tasa de oxidación mitocondrial de ácidos grasos, debido al flujo metabólico de estos compuestos hacia los hepatocitos.

En la comparación de ratas HL y HA, el ARNm de los factores de transcripción *NR1H4* y *HNF4A* se sobreexpresó en el primero. El gen *NR1H4* codifica el receptor farnesoide X (FXR), y su activación puede haber estado involucrada en la reducción de la esteatosis hepática y la hiperlipidemia, mediante la supresión de la lipogénesis de novo y la promoción de la oxidación y eliminación de triglicéridos. Además, el FXR desempeña un papel crucial y beneficioso en el metabolismo de la glucosa y en la regulación de la homeostasis de los ácidos biliares, y los agonistas del FXR son prometedores para el tratamiento de la EHGNA, la dislipidemia y la diabetes tipo 2 (Xu *et al.*, 2014). Estudios recientes han demostrado que el licopeno y sus metabolitos resultantes de la escisión por las enzimas beta-caroteno-oxigenasa (BCO1 y BCO2) podrían interactuar con el receptor de ácido retinoico (RAR). En el hígado y el intestino, el FXR se expresa en niveles altos y forma un heterodímero con RAR. Los apolicopépidos resultantes de los productos de escisión del licopeno del zumo de tomate podrían estar presentes en el hígado en concentraciones bajas y podrían actuar como ligandos del RAR (Aydemir *et al.*, 2016; Narayanasamy *et al.*, 2017). Cuando RAR heterodimeriza con otros receptores, como el FXR, está involucrado en la regulación de las vías del receptor asociado, como los ácidos biliares, los lípidos y el metabolismo de la glucosa. La sobreexpresión de FXR después de la ingesta de zumo de tomate en animales con esteatosis puede ser beneficiosa en la prevención y el tratamiento de la EHGNA, ya que desempeña un papel crucial en la mediación de múltiples genes asociados con el metabolismo de los lípidos y la glucosa y la respuesta de la inflamación (Xu *et al.*, 2014). El gen *HNF4A* codifica el factor nuclear 4 α del hepatocito, y se sabe que modula los elementos reguladores en los promotores y potenciadores de los genes implicados en el metabolismo del colesterol, los ácidos grasos y la glucosa (Chen *et al.*, 2014; Babeu *et al.*, 2014). Este gen estaba regulado al alza en ratas HL, en comparación

con ratas NA y HA. En trabajos anteriores, la expresión del ARNm de *HNF4A* se redujo significativamente en muestras de EHNA humanas, lo que sugiere una contribución de *HNF4A* a EHGNA a través de la regulación de la expresión de los genes implicados en la progresión de EHGNA al carcinoma hepatocelular (Baciu *et al.*, 2017). Aquí, la ingesta de zumo de tomate condujo a una regulación positiva de los genes *NR1H4* y *HNF4A*, lo que proporciona un efecto protector contra EHGNA. Ip *et al.* (2015) informaron que el licopeno y sus apo-derivados pueden proporcionar protección contra la esteatosis hepática al reducir la abundancia de colesterol y triglicéridos en el hígado, pero los niveles plasmáticos permanecen sin cambios. Mencionaron que estos efectos se deben principalmente a la activación del gen sirtuina 1 (*SIRT1*), que influye en la inhibición de la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de ácidos grasos, y promueve la β -oxidación y la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos. Martín-Pozuelo *et al.* (2014) observaron que la ingesta de zumo de tomate modulaba la expresión de las enzimas involucradas en el transporte y la oxidación de los ácidos grasos. De manera similar, observamos una regulación positiva de los genes que codifican la proteína hidrolítica (*LPL*) y las proteínas transportadoras de grasa (*CD36*, *FABP5*), lo que demuestra que, para los ácidos grasos, tanto sus transportadores como su metabolismo oxidativo están activos, tras la suplementación dietética con zumo de tomate.

5.1.4.3. Cambios en los metabolitos hepáticos

Teniendo en cuenta los resultados del estudio metabolómico, el efecto de la dieta alta en grasa sobre el metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos merece una atención especial. El contenido de la mayoría de estos compuestos disminuyó, lo que confirma los resultados obtenidos en estudios previos con dietas ricas en grasas (Bernal *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). El aminoácido arginina fue una de las excepciones al

comportamiento mencionado anteriormente, su concentración aumentó en el hígado cuando se suministró la dieta alta en grasa y su contenido en HA fue mayor que en las ratas HL. Esto podría deberse al efecto regulador de la arginina sobre el metabolismo de los lípidos, ya que modula la expresión y la función de las enzimas relacionadas con la lipólisis y la lipogénesis (Jobgen *et al.*, 2009). Tan *et al.* (2012) informaron que la arginina estimula la lipólisis en los adipocitos, promoviendo la oxidación de los ácidos grasos de cadena media y larga e inhibiendo la lipogénesis en animales obesos. Además, parece modular la expresión de genes relacionados con la oxidación de los lípidos, como *CPT1*, el coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (*PGC*)-*1 α* y el malonil-CoA descarboxilasa (*MCD*) en el hígado, y también reprimir la expresión del factor de necrosis tumoral (*FAS*) y *SCD1*. Jobgen *et al.* (2009) mostraron que cuando la arginina está presente en concentraciones relativamente altas, aumenta la oxidación de la glucosa y de los ácidos oleico y palmítico, y estimula la formación de triglicéridos; a pesar de esto, la arginina estimula la incorporación de ácidos grasos monoinsaturados, en lugar de saturados. Por otro lado, los aminoácidos intermedios del proceso redox aumentaron con el contenido de grasa de la dieta, entre ellos la metionina y la homo-cisteína. La concentración de homo-cisteína aumentó significativamente en animales con esteatosis, lo que probablemente causó plegamiento incorrecto de las proteínas y estrés en el retículo endoplásmico (Ai *et al.*, 2017). Este cambio podría haber estado acompañado por una disminución en el contenido de cisteína, principalmente debido a la regulación a la baja de la cistationina β -sintasa y la cistationina γ -liasa, las enzimas responsables de la descomposición de la homocisteína a la cisteína, como lo describen Bravo y colaboradores. (Bravo *et al.*, 2011). Estos son parte de la ruta metabólica de la metionina, que está relacionada con la vía de transulfuración que también está vinculada a la biosíntesis del glutatión (Bravo *et al.*, 2011). Lo anterior sugiere que

la limitación de la síntesis de glutatión se debe a un desequilibrio en la homeostasis hepática, produciendo una acumulación de precursores de glutatión (Bravo *et al.*, 2011; Bernal *et al.*, 2013). Sin embargo, el consumo de zumo de tomate llevó a un aumento en los niveles de metionina, lo que sugiere que la acumulación de licopeno en el hígado podría modular el metabolismo redox al aumentar el nivel de este aminoácido para elevar la concentración de glutatión. Xie *et al.* (2010) indicaron que el estrés oxidativo disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes, incluidas la glutatión peroxidasa y la glutatión-S-transferasa, y que este efecto se agrava cuando se desarrolla la EHGNA. Además, la relación GSH/GSSG mostró diferencias significativas en la respuesta a la dieta H, similar a los hallazgos de García-Cañaveras *et al.* (García-Cañaveras *et al.*, 2011), quien mencionó una disminución en esta relación cuando se presentó esteatosis, como resultado de la lipoperoxidación. Sin embargo, en el grupo NL, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la proporción redox debido a la actividad antioxidante del zumo de tomate, principalmente licopeno, que actúa para prevenir la peroxidación de lípidos. Este efecto se ha informado (Leal *et al.*, 1999; Jamshidzadeh *et al.*, 2008) después de la administración de licopeno puro y extracto de tomate, respectivamente, que actúan como antioxidantes en el hígado contra la citotoxicidad de los fármacos. La relación NAD/NADH no se vio afectada por cambios en la dieta o la ingesta de zumo de tomate; sin embargo, los valores hepáticos de NAD fueron más altos con la dieta estándar (N) que con la dieta grasa (H). Estos resultados difieren de los reportados por Kim *et al.* (2011), quienes observaron una reducción en la relación NAD/NADH en ratones obesos debido a una disminución en la β -oxidación relacionada con la acumulación de lípidos. Sin embargo, en este estudio, a pesar del hecho de que se encontró una acumulación de lípidos en el hígado, no se observó una disminución en la actividad oxidativa de los lípidos, lo que habría resultado en un equilibrio adecuado en el metabolismo energético.

REFERENCIAS

- Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2009; 24(8): 1463-1471.
- Ai Y, Sun Z, Peng C, Liu L, Xiao X, Li J. Homocysteine Induces Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in High Methionine Diet-Fed Mice. *Nutrients.* 2017; 9(4): E346.
- Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 10(6): 330-344.
- Armstrong EH, Goswami D, Griffin PR, Noy N, Ortlund EA. Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (FABP5-PPAR β/δ) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(21): 14941–14954.
- Auguet T, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martínez S, Porras JA, Aragonès G, *et al.* Altered Fatty Acid Metabolism-Related Gene Expression in Liver from Morbidly Obese Women with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(12): 22173–22187.
- Aydemir G, Kasiri Y, Bartók EM, Birta E, Fröhlich K, Böhm V, *et al.* Lycopene supplementation restores vitamin A deficiency in mice and possesses thereby partial pro-vitamin A activity transmitted via RAR signaling. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016; 60(11): 2413–2420.
- Babeu JP, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(1): 22–30.
- Baciu C, Pasini E, Angeli M, Schwenger K, Afrin J, Humar A, *et al.* Systematic integrative analysis of gene expression identifies HNF4A as the central gene in pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE.* 2017; 12(12): e0189223.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 1995; 57(1): 289–300.
- Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 1976; 70(1): 241–250.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Cánovas M, Periago MJ. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24(11): 1870–1881.
- Bravo E, Palleschi S, Aspichueta P, Buqué 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.
- 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(9): 2467–2474.
- Chen KT, Pernelle K, Tsai YH, Wu YH, Hsieh JY, Liao KH, *et al.* Liver X receptor α (LXR α /NR1H3) regulates differentiation of hepatocyte-like cells via reciprocal regulation of HNF4 α . *J. Hepatol.* 2014; 61(6): 1276–1286.
- Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 2011; 22(9): 353–363.
- European Association for the Study of the Liver,

European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2016; 64 (6), 1388–1402.

Fabbrini E, Magkos F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. *Nutrients* 2015; 7(6): 4995–5019.

Fabbrini, E.; Sullivan, S.; Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51(2): 679–689.

Friedewald, W.T.; Levy, R.I.; Fredrickson, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18(6): 499–502.

García-Alonso FJ, Bravo S, Casas J, Pérez-Conesa D, Jacob K, Periago MJ. Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57(15): 6815–6822.

García-Alonso FJ, González-Barrio R, Hidalgo N, Navarro-González I, Masuero D, Soini, E, *et al.* A study of the prebiotic-like effects of tomato juice consumption in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Food Funct.* 2017; 8(10): 3542–3552.

García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A. A Comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J. Proteome Res.* 2011; 10(10): 4825–4834.

Goossens N, Jornayvaz FR. Translational Aspects of Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017; 9(10): E1077.

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(7): 344–349.

Ip BC, Liu C, Lichtenstein AH, von Lintig J, Wang XD. Lycopene and apo-10'-lycopenoic acid have differential mechanisms of protection against hepatic steatosis in β -carotene-9',10'-oxygenase knockout male mice. *J. Nutr.* 2015; 145(2): 268–276.

Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Mohammadi-Bardbori A, Niknahad H. Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46(12): 3612–3615.

Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10180–10188.

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(1): 187–198.

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(2): 722–731.

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(3): 351–358.

Leal M, Shimada A, Ruíz F, González de Mejía E. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicol. Lett.* 1999; 109(1–2): 1–10.

León-Goñi A.C, 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. Electron. Vet.* 2011; 12(11): 1–10.

Lu RH, Zhou Y, Yuan XC, Liang XF, Fang L, Bai XL, *et al.* Effects of glucose, insulin and triiodothyroxine on leptin and leptin receptor expression and the effects of leptin on activities of enzymes related to glucose metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) hepatocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 2015; 41(4): 981–989.

Maiani G, Periago-Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, *et al.* Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53(2): S194–S218.

Martín-Pozuelo G, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J Hidalgo N, *et al.* The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur. J. Nutr.* 2014; 54(6): 933–944.

Mashek DG, McKenzie MA, Van Horn CG, Coleman RA. Rat long chain acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in McArdle-RH7777 cells. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(2): 945–950.

Mason TM. The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1998; 35(6): 461–487.

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(1): 76–82.

Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, *et al.* Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is

associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2012; 15(5): 665–674.

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(8): 1146–1163.

Moreira EAM, Fagundes RLM, Wilhelm D, Neves D, Sell F, Bellisle F, Kupek E. Effects of diet energy level and tomato powder consumption on antioxidant status in rats. *Clin. Nutr.* 2005; 24(6): 1038–1046.

Moussa M, Gouranton E, Gleize B, Yazidi CE, Niot I, Besnard P, *et al.* CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55(4): 578–584.

Murdoch SJ, Breckenridge WC. Influence of lipoprotein lipase and hepatic lipase on the transformation of VLDL and HDL during lipolysis of VLDL. *Atherosclerosis* 1995; 118(2): 193–212.

Murillo AG, DiMarco DM, Fernandez ML. The potential of non-provitamin A carotenoids for the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Biology.* 2016; 5(4): E42.

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): 1–26.

Narayanasamy S, Sun J, Pavlovicz RE, Eroglu A, Rush CE, Sunkel BD, *et al.* Synthesis of apo-13- and apo-15-lycopenoids, cleavage products of lycopene that are retinoic acid antagonists. *J. Lipid Res.* 2017; 58(5): 1021–1029.

Navarro-González I, García-Alonso J, Periago MJ. Bioactive compounds of tomato: Cancer chemopreventive effects and influence on the transcriptome in hepatocytes. *J. Funct. Foods* 2018; 42: 271–280.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview

of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 402.

Oikawa A, Otsuka T, Jikumaru Y, Yamaguchi S, Matsuda F, Nakabayashi R, *et al.* Effects of freeze-drying of samples on metabolite levels in metabolome analyses. *J. Sep. Sci.* 2011; 34(24): 3561–3657.

Periago MJ, García-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(8): 694–708.

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(23): 7005–7010.

Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K, Khanin M, Salman H, Veprik A, Danilenko M, Levy J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012; 56(2): 259–269.

Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Rosselli MS, Gianotti TF, Mallardi P *et al.* Circulating levels and hepatic expression of molecular mediators of atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2010; 209(2): 585–591.

Suárez M, Boqué N, del Bas JM, Mayneris-Perxachs J, Arola L, Caimari A. Mediterranean diet and multi-ingredient-based interventions for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 2017; 9(10): E1052.

Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Zang L, Oka T, Nishimura Y, *et al.* Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutr. Metab.* 2011; 8: 88.

Tan B, Li X, Yin Y, Wu Z, Liu C, Tekwe CD, Wu G. Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Front. Biosci.* 2012; 17: 2237–2246.

Van der Leij FR, Bloks VW, Grefhorst A, Hoekstra J, Gerding A, Kooi K, *et al.* Gene expression profiling in livers of mice after acute inhibition of β -oxidation. *Genomics* 2007; 90(6): 680–689.]

Wang XD. Lycopene metabolism and its biological significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 96(5): 1214S–1222S.

Wang YX. PPARs: Diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res.* 2010; 20(2): 124–137.

Xie Z, Li H, Wang K, Lin J, Wang Q, Zhao G, *et al.* Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metabolism.* 2010; 59(4): 554–560.

Xu C, Wang G, Hao Y, Zhi J, Zhang L, Chang C. Correlation analysis between gene expression profile of rat liver tissues and high-fat emulsion-induced nonalcoholic fatty liver. *Dig. Dis. Sci.* 2011; 56(8): 2299–2308.

Xu JY, Li ZP, Zhang L, Ji G. Recent insights into farnesoid X receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(37): 13493–13500.

Yilmaz B, Sahin K, Bilen H, Bahcecioglu IH, Bilir B, Ashraf S, *et al.* Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2015; 4(3): 161–171.

Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1 and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30(2): 139–143.

Zammit VA. Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia. *Biochem. J.* 2013; 451(1): 1–12.

Zelber-Sagi S, Salomone F, Mlynarsky L. The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for non-alcoholic fatty liver disease: Evidence and

plausible mechanisms. *Liver Int.* 2017; 37(7): 936–949.

5.2. (ESTUDIO 2)

Efecto preventivo de las espinacas en la enfermedad del hígado graso no alcohólico inducida por una dieta alta en grasa en ratas

5.2.1. Introducción

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la enfermedad hepática que se extiende ampliamente en todo el mundo debido a factores genéticos, dietéticos y del estilo de vida (Bellantani *et al.*, 2010). Day y James (1998) sugirieron un desarrollo de EHGNA en dos etapas: en primer lugar, una acumulación de triglicéridos y ácidos grasos libres en los hepatocitos, y, en segundo lugar, la peroxidación lipídica, la disfunción mitocondrial y la inflamación del hígado. Estos procesos dan como resultado un aumento en la síntesis de ácidos grasos y una disminución en la β -oxidación y en la exportación de triglicéridos desde el hígado como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Charatcharoenwitthya y Lindor, 2010).

Para los vegetales de hojas verdes, como la espinaca, se han encontrado varias propiedades funcionales con respecto a sus nutrientes y compuestos bioactivos, como la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa, antiobesidad, hipoglucemiante e hipolipidémica (Roberts y Moreau, 2016). Entre las verduras de hoja comúnmente consumidas, la espinaca puede considerarse una fuente de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos y los carotenoides. En relación con los compuestos fenólicos, la ingesta diaria estadounidense está alrededor de 450 mg de GAE (Chun *et al.*, 2005), y las espinacas solo aportan aproximadamente 0.8 mg de equivalentes de ácido gálico/día/persona, debido a la baja ingesta diaria (2.5 g de espinacas/día) (Roberts y Moreau, 2016). Sin embargo, la espinaca es considerada una de las fuentes vegetales más ricas de carotenoides, que contribuye a la ingesta de luteína, zeaxantina y caroteno. Los carotenoides pueden contribuir positivamente a la salud hepática (Vitaglione *et al.*, 2010; Murillo *et al.*, 2016a), y su consumo se ha asociado con una disminución de la acumulación de grasa en el hígado en pacientes con EHGNA (Yilmaz *et al.*, 2015), siendo eficaz en la prevención y el tratamiento de esta patología hepática (Murillo *et al.*, 2016a).

Sin embargo, los mecanismos por los que actúan los carotenoides como compuestos preventivos de las enfermedades hepáticas, aún no se han dilucidado y se deben realizar más investigaciones. En estudios con animales, se ha observado que el licopeno reduce la acumulación de grasa y la inflamación del hígado a través de la activación de la respuesta antioxidante y antiinflamatoria, aumento del transporte de colesterol y ácidos grasos, mejora de la β -oxidación y regulación de la traducción del ARNm (Bernal *et al.*, 2013; Martín-Pozuelo *et al.*, 2015). La luteína (el carotenoide más abundante en las espinacas) redujo los niveles de colesterol, malondialdehído (MDA) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el hígado de cobayas cuando se administró en dietas hipercolesterolémicas (Kim *et al.*, 2012), pero este efecto depende de la forma en que se administre la luteína (Murillo *et al.*, 2016b). La suplementación de la dieta con astaxantina podría reducir la expresión del receptor activado por el proliferador de peroxisomas- γ (*PPARG*) y los genes de transcripción inducible 3 (*CHOP-10*) por daño en el ADN, lo que disminuye el transporte de lípidos hepáticos y la síntesis de ácidos grasos y evita el desarrollo de esteatosis hepática (Her *et al.*, 2013). La administración de β -criptoxantina redujo significativamente la esteatosis en ratones al disminuir el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria al inhibir la expresión de genes relacionados (Kobori *et al.*, 2014).

Debido a que la espinaca es una fuente natural de carotenoides, su utilización en una intervención dietética con fines terapéuticos o preventivos proporciona múltiples nutrientes con una amplia gama de actividades biológicas, creando actividades complementarias, aditivas o sinérgicas que faltan cuando la suplementación involucra únicamente un solo compuesto a modo de nutracéutico o complemento alimenticio. Además, dado que el tratamiento de la EHGNA en una etapa temprana se hace mediante el tratamiento dietético, el propósito de este trabajo fue evaluar si la suplementación de

la dieta con espinaca, como fuente dietética de carotenoides, tiene un efecto para mejorar el estatus de biomarcadores de esteatosis de ratas Sprague-Dawley, alimentadas con una dieta alta en grasa. Para lograr este objetivo general, hemos evaluado los cambios en los parámetros plasmáticos, los marcadores de inflamación y el estrés oxidativo, el contenido de lípidos hepáticos y los perfiles transcriptómicos y metabolómicos de ratas después de la suplementación de su alimento con polvo de espinaca.

5.2.2. Materiales y Métodos

5.2.2.1. *Espinacas y preparación de las dietas*

La espinaca (*Spinacia oleracea*) se obtuvo de un supermercado local como producto de cuarta gama (Florette SAS, Milagro, Navarra, España). Las espinacas se hirvieron en agua durante 10 minutos para eliminar el ácido oxálico, el agua se descartó y después la espinaca cocida se liofilizó y se trituró hasta obtener un polvo de espinacas. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso. El contenido total de carotenoides en el polvo de espinaca se determinó por HPLC y fue de 1750 µg/g, mostrando las siguientes cantidades de los compuestos individuales: 228 µg de neoxantina/g, 292 µg de violaxantina/g, 944 µg de luteína/g, 46 µg de α-caroteno/g, y 225 µg de β-caroteno/g. Las dietas enriquecidas con espinacas se prepararon mezclando los gránulos pulverizados de la dieta estándar (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet TD-2014; Harland Laboratories, Indianapolis, IN, EE. UU.) o la dieta rica en grasas (Atherogenic Rodent Diet TD-02028; Harland Laboratories) con polvo de espinaca liofilizado al 2.5% y 5%. Se añadió agua a cada una de las mezclas hasta que se formó una masa que no era pegajosa. Los pellets se prepararon inmediatamente usando una bolsa de pastelería y se secaron en un secador de bandejas a 60°C durante 21 h. Los pellets secos con espinaca se

envasaron en bolsas de polietileno y se almacenaron en el refrigerador hasta que se usaron.

5.2.2.2. *Animales y diseño experimental*

Cuarenta y cuatro ratas Sprague-Dawley adultas macho (8 semanas de edad) se agruparon en dos grupos ($n = 22$) según su dieta: dieta estándar (dieta N) o una dieta alta en grasa (dieta H). Estas dietas fueron administradas por dos semanas, como periodo de adaptación. Después de este tiempo, los animales fueron clasificados en seis grupos experimentales. Dos grupos de control ($n = 6$ ratas/grupo), uno para la dieta estándar (NC) y otro para la dieta alta en grasa (HC), y cuatro grupos experimentales ($n = 8$ ratas/grupo): N5 (dieta estándar + 5% de espinacas), N2.5 (dieta estándar + 2.5% de espinacas), H5 (dieta alta en grasa+ 5% de espinacas) y H2.5 (dieta alta en grasa+ 2.5% de espinacas). El periodo experimental fue de 5 semanas y el diseño del estudio se muestra en la **Figura 5.2.1**. Durante el tiempo de intervención, el peso corporal fue registrado semanalmente, mientras que el consumo de alimento, las excreciones urinarias y fecales se registraron al inicial y final del periodo experimental, utilizando jaulas metabólicas para la recolección de datos. Al final de las 5 semanas, las ratas fueron sacrificadas y se recogieron las diferentes muestras biológicas: sangre, heces, orina e hígado. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta que se llevaron a cabo los procesos analíticos.

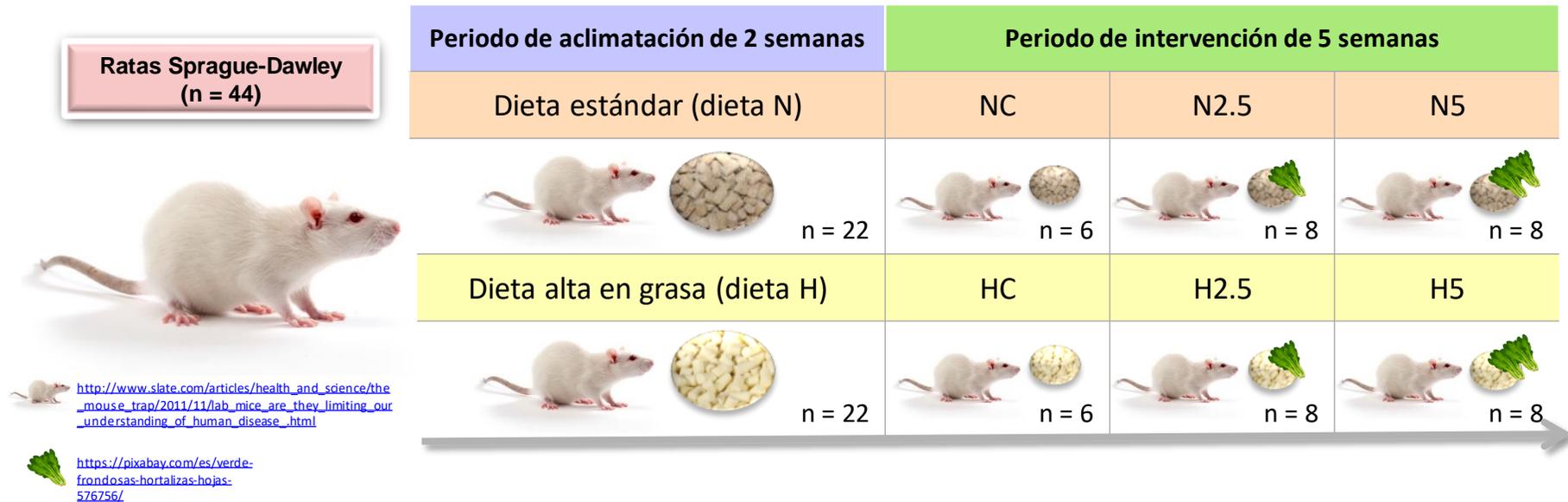


Figura 5.2.1. Diseño experimental del estudio.

5.2.2.3. *Examen histopatológico*

Los exámenes histológicos se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia. Se tomaron muestras del hígado de cada animal y cada muestra se dividió en dos partes. Uno se fijó en formalina y en parafina, y se obtuvieron secciones de 4 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. La otra muestra fue introducida en 2-metilbutano y congelada con nitrógeno líquido, almacenándola a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se cortaron secciones congeladas de 5 μm de espesor con un criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se tiñeron con Sudán III, como técnica para confirmar la presencia de lípidos. Las secciones del hígado se examinaron (sin conocimiento de su grupo experimental) y se les dio una puntuación estimada para la gravedad de la hepatitis intersticial: 0 = sin lesiones microscópicas; 1 = hepatitis intersticial leve; 2 = hepatitis intersticial multifocal moderada; 3 = hepatitis intersticial multifocal severa. El grado de esteatosis se evaluó como sigue: 0 = sin degeneración vacuolar; 1 = menos del 25% de los hepatocitos afectados; 2 = 25–50% de los hepatocitos afectados; 3 = 50–75% de los hepatocitos afectados; 4 = más del 75% de los hepatocitos afectados.

5.2.2.4. *Parámetros bioquímicos del plasma*

La glucosa, proteína total, insulina, colesterol total, fracciones de colesterol HDL, LDL y VLDL, TG, y la actividad de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) se analizaron en muestras de plasma, utilizando un analizador automático (AU 600 Olympus Life, Hamburgo, Alemania) en el Hospital Veterinario de la universidad de Murcia.

5.2.2.5. *Determinación de biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo*

Los niveles del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y adiponectina en plasma se determinaron utilizando un kit comercial ELISA (Single Analyte ELISArray™ kits para Rata; QIAGEN, SA Biosciences, Frederick, MD, EE. UU.). La capacidad antioxidante del plasma, expresada como mmol de equivalentes de Trolox (TE)/L, se determinó mediante la técnica ORAC, utilizando un lector de microplacas multimodal (Synergy HT BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) (Prior *et al.*, 2003). La excreción urinaria de 15-F_{2t}-isoprostano (8-*epi*-PGF_{2 α}) se determinó con un kit de ELISA (OxySelect™-*epi*-PGF_{2 α} Elisa Kit, Cell Biolabs), utilizando la concentración de creatinina para normalizar los resultados (Helger *et al.*, 1974). Estos parámetros se midieron al inicio y al final del periodo de intervención.

5.2.2.6. *Análisis de carotenoides en la alimentación y el hígado*

El análisis de los carotenoides se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (Martín-Pozuelo *et al.*, 2015). Los carotenoides se extrajeron dos veces con tetrahidrofurano/metanol (1/1, v/v) que contenía 0.1% de butilhidroxitolueno. Los extractos combinados se llevaron a sequedad en un evaporador automático y los residuos se suspendieron en 5 mL de (TBME/MeOH). Los carotenoides se analizaron por HPLC (Agilent 1200, Waldbronn, Alemania), con una columna C30 (250 \times 4,6 mm, 5 μ m id) (Trentec, Gerlingen, Alemania) a 17 °C, utilizando TBME (A) y MeOH (B) como fase móvil con un caudal de 1 mL/min. El gradiente utilizado comenzó con 2% de A en B, alcanzando 35% de A a los 35 minutos, 60% de A a los 45 minutos y 60% de A a los 56 minutos, antes de regresar a las condiciones iniciales durante 4 minutos antes de la siguiente inyección. La detección de los carotenoides se

llevó a cabo utilizando un sistema detector de diodos (DAD) a 450 nm. Las curvas estándar se prepararon utilizando estándares de referencia para la cuantificación.

5.2.2.7. *Análisis de fibra dietética total y compuestos fenólicos totales en piensos*

La fibra dietética total (FDT) se determinó de acuerdo con el procedimiento AOAC (985.29) (1990) descrito por Prosky et al. (Prosky *et al.*, 1985). Se determinaron los compuestos fenólicos totales (CFT), utilizando el reactivo de fenol de Folin Ciocalteu, según Hirawan *et al.* (2011).

5.2.2.8. *Análisis de lípidos en el hígado.*

Los contenidos de grasa total, ácidos grasos y colesterol se determinaron en los hígados de rata. La grasa total se analizó mediante el método Soxhlet, adaptado a muestras hepáticas (Hijona *et al.*, 2010), utilizando éter etílico como disolvente. Los ácidos grasos y el colesterol se analizaron utilizando el kit de extracción de lípidos de Sigma Aldrich (MAK174, St. Louis, MO, EE. UU.) y el kit de extracción de colesterol (MAK175), respectivamente, siguiendo el método de extracción de Folch et al. (Folch *et al.*, 1957) y los procedimientos descritos por el fabricante. La cuantificación de ácidos grasos y de colesterol se realizó con un GC (Agilent GC 7890A, Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID), según el procedimiento descrito por Martin-Pozuelo *et al.* (2015).

5.2.2.9. *Estudio de la expresión de genes implicados en la enfermedad del hígado graso*

Se utilizaron muestras de hígado para el análisis de la expresión génica, siguiendo el procedimiento descrito previamente por Martin-Pozuelo *et al.* (2015). Los análisis de

PCR en tiempo real se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando un array de PCR de 96 pocillos para la evaluación de los genes de la enfermedad del hígado graso (PARN-157ZD-24, Qiagen, SABiosciences, Frederick, MD, EE. UU.). La expresión génica relativa se calculó de acuerdo con el método Ct comparativo. La expresión génica solo se investigó en ratas de los grupos de control (NC y HC) y en aquellas que habían ingerido altos niveles de espinacas (N5 y H5).

5.2.2.10. *Análisis de metabolitos hepáticos por HPLC-MS*

La extracción de metabolitos se basó en el trabajo descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (Bernal *et al.*, 2013). Después de la extracción, las muestras se inyectaron en un instrumento HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, California, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas simple de cuadrupolo Agilent 6120 con una fuente de ionización ortogonal por ESI. Para evitar la posible degradación de los metabolitos, las muestras se prepararon poco antes del análisis cromatográfico. El análisis de los metabolitos solo se realizó con el hígado de los animales pertenecientes a los grupos de control (NC y HC) y los grupos con alto consumo de espinacas (N5 y H5).

5.2.2.11. *Análisis estadístico*

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar de los resultados obtenidos. En todos los casos, se probó la normalidad e igualdad de varianzas. Se aplicó un ANOVA de una vía con medidas repetidas, con una prueba post-hoc para determinar las diferencias entre los promedios de todas las determinaciones analíticas: la prueba de Tukey o la prueba de Games-Howell según el caso. Para los datos de ingesta de alimentos y bebidas, aumento

de peso y excrementos, y colesterol y ácidos grasos en el hígado, se realizó la prueba *t* de Student de dos muestras para comparar los grupos N y H. Además, para cada parámetro bioquímico y biomarcador de inflamación o estrés oxidativo analizado, se realizó una prueba *t* de Student pareada para comparar los valores al principio y al final del experimento. El nivel de significancia fue $p < 0.05$. Para el análisis de los metabolitos del hígado, las concentraciones se normalizaron de acuerdo con el peso de los tejidos y se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post-hoc de HSD (diferencia honestamente significativa) de Tukey; su tasa de error por familia se corrigió utilizando la tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini-Hochberg con una proporción del 5% de descubrimiento falso (Benjamini y Hochberg, 1995). Además, se aplicó un análisis de componente principal. El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico de IBM para las ciencias sociales (SPSS) versión 24.0. La importancia de la expresión génica relativa, tomando NC como grupo de control, se determinó con Partek®Genomics Suite 6.6., Considerando que los genes con expresión diferencial son aquellos que satisfacen los siguientes criterios: un fold change > 2 o < -2 y $p < 0.05$.

5.2.3. Resultados

5.2.3.1. *Composición del alimento, ganancia de peso y volumen de alimento consumido*

La **Tabla 5.2.1** muestra la composición próxima, los valores de energía, los fenólicos totales y los carotenoides de las seis dietas experimentales: NC (dieta estándar), N2.5 (dieta estándar + 2.5% de espinaca), N5 (dieta estándar + 5% de espinaca), HC (dieta alta en grasa), H2.5 (dieta alta en grasa + 2.5% de espinacas) y H5 (dieta alta en grasa + 5% de espinaca), que se administraron a las ratas durante cinco semanas.

La alimentación de los grupos H proporcionó un mayor contenido de proteínas y grasas, lo que dio como resultado un valor energético medio de alrededor de 450 kcal/100 g. Además, esta dieta mostró una menor proporción de TDF y CFT que las dietas N, debido al mayor contenido de los productos agrícolas refinados empleados en la fabricación de la dieta grasa. En general, la incorporación de espinacas en ambas dietas no condujo a diferencias significativas en la composición de las dietas, solo con respecto a la ingesta de carotenoides. La administración de un 5% de espinacas en el alimento proporcionó un contenido medio de 9.1 μg de carotenoides totales/g de alimento, mientras que la suplementación con un 2.5% de espinacas proporcionó 3.1 μg de carotenoides/g de alimento. Según el perfil de carotenoides de la espinaca, la luteína y el α -caroteno fueron los carotenoides predominantes en la alimentación, seguidos de β -caroteno, mientras que la neoxantina y la violaxantina no se detectaron en la alimentación (datos no mostrados).

Tabla 5.2.1. Composición proximal, valores energéticos y compuestos fenólicos totales en las dietas experimentales¹.

Parámetros	NC	N2.5	N5	HC	H2.5	H5
Proteínas (g/100 g)	14.5	15.0	15.5	17.3	17.7	18.1
Grasas (g/100 g)	4.0	4.0	4.0	21.2	20.8	20.4
Fibra dietética total (TDF) (g/100 g)	21.2	21.3	22.6	6.9	7.4	8.0
Carbohidratos (g/100 g)	55.6	55.0	53.2	51.1	50.6	49.9
Almidones (g/100 g)	34.4	33.7	30.5	44.2	43.1	41.9
Cenizas (g/100 g)	4.7	4.7	4.7	3.5	3.5	3.6
Valor energético (kcal/100 g)	316.3	316.0	310.8	464.4	460.1	455.4
Calorías de proteínas (%)	18.3	19.0	19.9	14.9	15.4	15.9
Calorías de grasas (%)	11.4	11.4	11.7	41.1	40.6	40.3
Calorías de carbohidratos (%)	70.3	69.6	68.4	44.0	44.0	43.8
Fenólicos totales (CFT) (mg GAE/100 g)	188.4	192.2	196.1	20.4	21.2	22.4

¹Los valores se expresan como media.

La **Tabla 5.2.2** muestra el consumo de alimentos y agua, los cambios en el peso corporal y hepático, la excreción de heces y orina y la ingesta diaria de carotenoides durante el periodo de intervención. Los pesos corporales medios iniciales no mostraron diferencias significativas entre los seis grupos experimentales. En contraste, al final del periodo experimental, el peso corporal aumenta y el peso del hígado difiere significativamente entre los animales alimentados con las dietas N y los alimentados con la dieta H, debido al mayor aporte calórico de esta última dieta. Además, el peso del hígado fue significativamente menor en H2.5 y H5 que en el grupo HC. Los valores de heces excretadas fueron significativamente más altos en los grupos N en comparación con los grupos H, lo que podría explicarse por la ingesta diaria de FDT. A pesar del mayor contenido de FDT en las dietas H2.5 y H5, no se observaron diferencias en la cantidad de heces excretadas con HC. De acuerdo con la proporción de espinacas y el contenido de carotenoides en la alimentación, el consumo de estos compuestos fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los grupos que recibieron 5% de espinacas (55.5 y 53.2 $\mu\text{g}/\text{día}$ para N5 y H5, respectivamente) que en los grupos N2.5 y H2.5 (**Tabla 5.2.2**). También se observaron diferencias en la ingesta diaria de CFT total entre la dieta N y H.

Tabla 5.2.2. Ingesta de alimentos y bebidas, excreción de heces y orina y consumo de carotenoides de los seis grupos experimentales en el periodo de intervención de 5 semanas¹.

Parámetros	NC	N2.5	N5	HC	H2.5	H5
Peso corporal inicial (g)	371.9 ± 33.9	380.4 ± 15.2	383.3 ± 19.9	377.8 ± 20.5	372.3 ± 28.2	387.6 ± 5.7
Peso corporal final (g)	459.4 ± 43.7	451.4 ± 22.5	442.0 ± 16.6	500.1 ± 37.3 ^b	475.1 ± 34.4 ^b	552.5 ± 29.9 ^a
Incremento de peso corporal (g)	87.55 ± 18.85*	71.02 ± 12.71*	68.21 ± 9.32*	122.28 ± 21.83 ^{ab}	102.85 ± 22.09 ^b	154.5 ± 29.2 ^a
Peso del hígado (g)	15.32 ± 2.16*	13.92 ± 1.80*	13.65 ± 1.90*	25.36 ± 3.06 ^a	21.44 ± 2.95 ^b	19.31 ± 1.37 ^b
Ingesta de comida (g/day)	8.98 ± 3.65	6.76 ± 2.27	7.21 ± 3.89	7.23 ± 2.09	7.84 ± 2.69	5.85 ± 1.91
Ingesta de agua (mL/day)	22.50 ± 7.21 ^b	33.52 ± 9.10 ^{ab}	36.46 ± 7.58 ^a	29.33 ± 7.77	25.42 ± 7.06	26.96 ± 10.15
Heces excretadas (g/day)	4.70 ± 1.46*	4.28 ± 2.23	5.32 ± 1.66*	2.82 ± 0.92	3.01 ± 0.85	2.54 ± 1.05
Orina excretada (mL/day)	12.67 ± 7.63	15.20 ± 7.51*	16.02 ± 6.68	7.64 ± 4.97	5.40 ± 3.17*	10.59 ± 4.62
Ingesta de carotenoides (µg/day)	-	20.63 ± 6.91 ^b	55.52 ± 35.41 ^a	-	23.92 ± 8.20 ^b	53.24 ± 17.33 ^a
Ingesta de FDT (g/day)	1.90 ± 0.77*	1.65 ± 0.35*	1.64 ± 0.18*	0.54 ± 0.12	0.46 ± 0.12	0.42 ± 0.09
Ingesta de CFT (mg GAE/day)	19.30 ± 4.87*	14.85 ± 3.13*	14.26 ± 1.56*	1.45 ± 0.42	1.41 ± 0.41	1.29 ± 0.42

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a,b} Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos alimentados con la dieta estándar (NC, N2.5, N5) o la dieta alta en grasa (HC, H2.5, H5), después de realizar un ANOVA de una vía. * Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), después de realizar una prueba t de dos muestras, entre los miembros de los pares NC-HC, N2.5-H2.5 y N5-H5.

5.2.3.2. Examen histopatológico y parámetros bioquímicos.

Teniendo en cuenta el examen anatómico y patológico (**Figura 5.2.2**), la presencia de esteatosis en ratas del Grupo H puede observarse en las imágenes macroscópicas y microscópicas. Macroscópicamente, el hígado estaba agrandado, amarillo y grasiento. Microscópicamente, los hepatocitos contenían vesículas pequeñas y grandes debido a la acumulación anormal de lípidos, particularmente triglicéridos. La acumulación de grasa se confirmó utilizando Sudán III, que tiñe los triglicéridos y otras gotas de lípidos intracelulares, proporcionando un color naranja. Según el número de vacuolas, la esteatosis se clasificó como de grado 3, con un 50–75% de los hepatocitos que muestran degeneración vacuolar. Sin embargo, después del consumo de espinacas (ratas H2.5 y H5), las vacuolas fueron ligeramente más pequeñas en comparación con las de los animales que habían recibido la dieta alta en grasa.

Además, se evaluó la filtración de células mononucleares y la degeneración y necrosis de los hepatocitos para determinar el nivel de inflamación. Solo se detectó un bajo grado de inflamación (grado 1), con menos del 20% del área afectada. La esteatosis fue confirmada por el análisis de las enzimas transaminasas plasmáticas ALT y AST, cuyas actividades mostraron un aumento al final del periodo experimental (**Tabla 5.2.3**). Por el contrario, en las imágenes se puede observar que las ratas alimentadas con dieta N mostraron un hígado histopatológico normal (**Figura 5.2.2**).

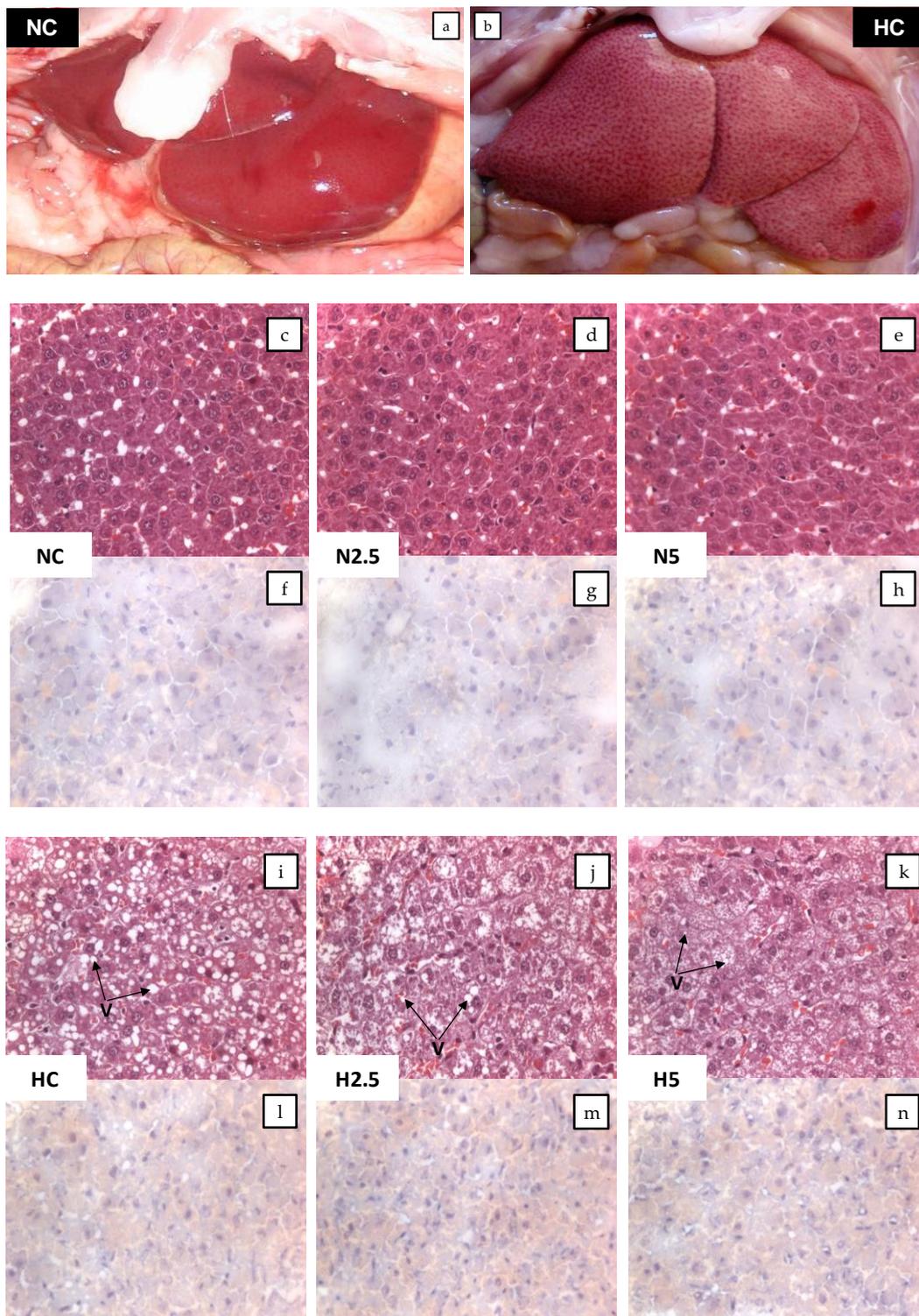


Figura 5.2.2. Fotografías macroscópicas y microscópicas de tejido hepático. Aspecto visual del hígado de rata durante la disección para obtener muestras de hígado (a y b). Imágenes microscópicas con H&E (c–e y i–k) y Sudan III (f–h y l–n) visualizadas por microscopía óptica (x40) para los grupos control y experimental. Las flechas muestran la degeneración vacuolar del hepatocito (V).

Tabla 5.2.3. Parámetros bioquímicos, y biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo en el plasma analizados en los seis grupos experimentales al final del periodo de intervención de 5 semanas¹.

Parámetros	NC	N2.5	N5	HC	H2.5	H5
Glucosa (mg/dL)	199.4 ± 42.7 *	147.1 ± 18	132.17 ± 4.38	274.1 ± 31.1 ^a	177.9 ± 3.89 ^b	153.6 ± 20.5 ^b
Proteínas (g/dL)	5.42 ± 0.33 *	5.79 ± 0.18	5.67 ± 0.55	6.32 ± 0.26	6.04 ± 0.43	6.25 ± 0.12
ALT final (U/L)	32.6 ± 5.09 *	28.95 ± 0.35 *	34.40 ± 4.16 *	47.95 ± 9.55	45.43 ± 9.83	44.30 ± 4.85
AST final (U/L)	75.07 ± 10.14 ^{b*}	88.28 ± 10.95 ^{b*}	106.1 ± 6.93 ^{a*}	151.10 ± 5.20	139.2 ± 43.7	142.7 ± 32.5
Adiponectina (pg/mL)	0.95 ± 0.38	0.62 ± 0.16	1.09 ± 0.84	0.55 ± 0.10	0.69 ± 0.13	0.54 ± 0.13
TNF-α (pg/mL)	15.6 ± 1.13	14.49 ± 1.29	14.09 ± 1.13	14.46 ± 1.55	14.68 ± 1.33	14.16 ± 1.62
ORAC (mmoles equiv trolox/L)	8.29 ± 1.62	9.06 ± 0.66	9.28 ± 1.17	9.79 ± 0.72	9.91 ± 1.48	9.81 ± 0.75
Isoprostanos en orina (ng/mg creatinina)	0.95 ± 0.17	1.01 ± 0.18	1.1 ± 0.14	1.13 ± 0.004	0.97 ± 0.26	0.96 ± 0.09

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a,b} Las letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de la dieta estándar (NC, N2.5, N5) o la dieta alta en grasa (HC, H2.5, H5), después de llevar a cabo un ANOVA de una vía. * Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), después de realizar una prueba *t* de dos muestras, entre los miembros de los pares NC-HC, N2.5-H2.5 y N5-H5. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; TNF: factor de necrosis tumoral; ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno.

Los parámetros bioquímicos del plasma (niveles de glucosa, proteínas y enzimas hepáticas), obtenidos al final del estudio, se muestran en la **Tabla 5.2.3**. La concentración de glucosa no mostró diferencias significativas entre los grupos N, pero sí entre los grupos H, que se redujo significativamente en ratas del grupo H5 (153.6 mg/dL), mientras que la concentración de proteína total se mantuvo sin cambios al final del estudio. Como se mencionó anteriormente, las ratas de los grupos H mostraron un nivel significativamente más alto de enzimas hepáticas que los animales de los grupos N, lo que indicó las alteraciones en la funcionalidad del hígado, asociadas con la EHGNA.

Con respecto a los niveles de lípidos en plasma, la **Figura 5.2.3** representa los cambios entre los valores iniciales y finales. No se observaron cambios significativos en el colesterol total, las LDL, HDL, VLDL o los TG en los grupos NC, N2.5 y N5 durante el periodo de intervención, aunque se detectaron cambios importantes entre los parámetros iniciales y finales para los grupos H, mostrando una disminución significativa en el colesterol total, LDL y VLDL y un aumento significativo en el TG plasmático (**Figura 5.2.3**). Esta tendencia estaría justificada por los cambios lipídicos asociados a la esteatosis, ya que el metabolismo de las lipoproteínas se ve alterado, aumentando significativamente el contenido de TG plasmático. Tras el consumo de espinacas solo se observó una reducción significativa en el colesterol total final (108 en HC, 91 en H2.5 y 75 en H5), y en triglicéridos (123 en HC, 102 en H2.5 y 103 en H5), mostrando un efecto hipocolesterolémico (datos no mostrados). Otros parámetros medidos fueron los biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo. Para la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) en plasma y para los isoprostanos urinarios, no hubo diferencias significativas entre los valores iniciales (datos no mostrados) y finales o entre las diferentes condiciones (dieta y suplementos de espinacas, **Tabla 5.2.3**). Los niveles

de adiponectina y TNF- α tampoco cambiaron; No se encontraron diferencias significativas según la dieta o el consumo de espinacas.

5.2.3.3. Contenido de carotenoides, grasas totales, ácidos grasos y colesterol en el hígado

La biodisponibilidad de los carotenoides se midió considerando su acumulación en el hígado. Para los grupos N5, H2.5 y H5, la acumulación total de carotenoides en el hígado fue de 0.20, 0.29 y 1.45 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. El carotenoide con la concentración más alta en el hígado fue el β -caroteno, mientras que la concentración más baja se observó para la luteína. En ratas N2.5, NC y HC, no se detectaron carotenoides (**Tabla 5.2.4**).

Tabla 5.2.4. Contenido de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) en el hígado de ratas de los cuatro grupos experimentales, al final del periodo de intervención de 5 semanas.¹

Carotenoides	N2.5	N5	H2.5	H5
Luteína	nd	nd	0.03 \pm 0.06	0.03 \pm 0.06
α -caroteno	nd	nd	0.04 \pm 0.03 ^b	0.15 \pm 0.10 ^a
β -caroteno	nd	0.20 \pm 0.09 ^b	0.22 \pm 0.08 ^b	1.28 \pm 0.47 ^a
Total	nd	0.20 \pm 0.09 ^b	0.29 \pm 0.12 ^b	1.45 \pm 0.51 ^a

¹Los datos se expresan como media \pm SEM. ^{a,b} Diferentes letras mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos alimentados con la dieta estándar (N2.5, N5) o la dieta alta en grasa (H2.5, H5), después de realizar un ANOVA de una vía. nd: no detectado.

La acumulación de grasa total en el hígado de los animales de los grupos H fue cinco veces mayor que en los grupos N (valores medios: 25.35% vs. 5.51%, datos no mostrados), y el consumo de espinaca no tuvo efecto en el contenido de grasa total del hígado. Sin embargo, el consumo de espinacas y la acumulación de carotenoides en el hígado parecen tener un efecto sobre la acumulación de colesterol, ya que hubo reducciones significativas en el colesterol hepático en los grupos H2.5 y H5, que

alcanzaron valores más saludables con respecto al control (HC) (**Tabla 5.2.5**). Además, se detectó una reducción significativa del colesterol en el hígado de los animales del grupo N5. El análisis de los ácidos grasos totales en el hígado mostró diferencias en las cantidades de ácidos grasos específicos entre los grupos N y H (**Tabla 5.2.5**). Se observó una mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) en animales alimentados con la dieta H en comparación con los alimentados con la dieta N, que mostraron una alta proporción de ácidos grasos saturados (AGS) y poliinsaturados (AGP).

La adición de espinacas modificó significativamente el perfil de ácidos grasos del hígado observando un perfil más beneficioso con relación a la distribución y contenido de los diferentes ácidos grasos. Así, la proporción de AGS disminuyó mientras que la proporción de AGP aumentó significativamente en ambos grupos. Además, en los grupos H2.5 y H5, aumentó la proporción de los AGM (**Figura 5.2.4**), la de los ácidos grasos de la serie n-3 (ácido linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA)) y la de los ácidos grasos series n-6 (ácido linoleico (LA), ácido eicosadienoico (EDA) y ácido araquidónico (AA)) aumentaron en animales alimentados con dieta H suplementada con espinacas (**Tabla 5.2.5**). También la proporción n-6/n-3 disminuyó significativamente (**Figura 5.2.4**) en los grupos H suplementado con espinacas.

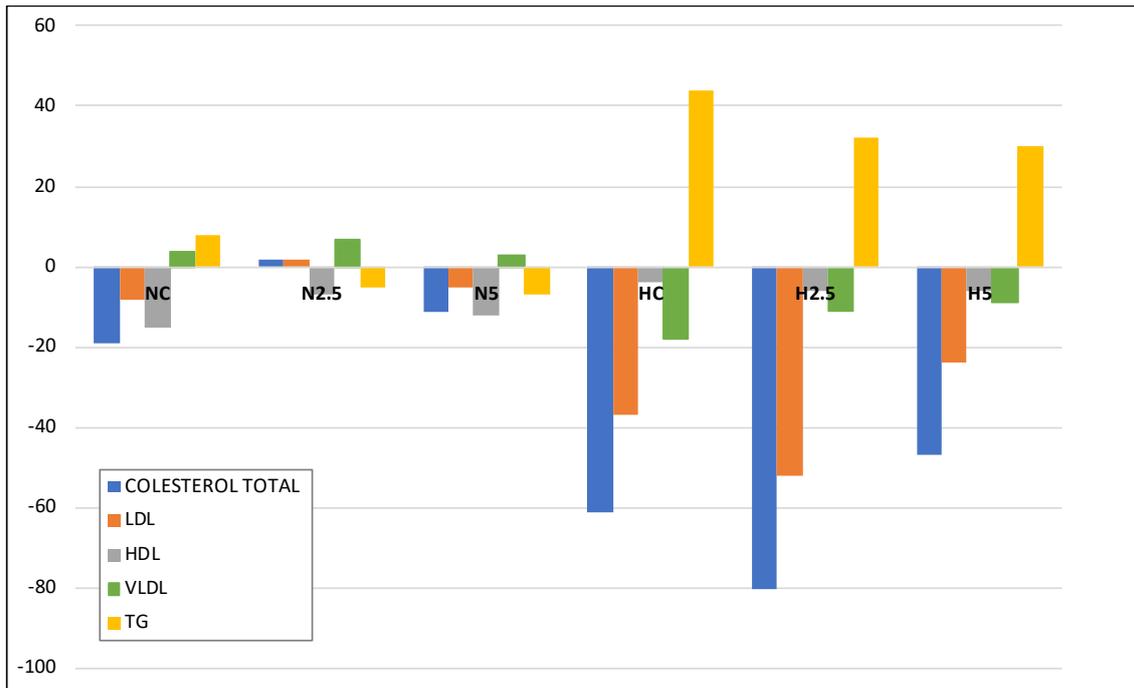


Figura 5.2.3. Cambios en los parámetros lipídicos medidos en plasma al principio y al final del periodo de intervención de 5 semanas para los seis grupos experimentales. LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; TG: triglicéridos.

Tabla 5.2.5. Grasa total (mg/100 g), contenido de colesterol (mg/g) y concentraciones de ácido graso (mg/g) en el hígado de ratas en los seis grupos experimentales al final del periodo de intervención de 5 semanas¹.

Parámetros	NC	N2.5	N5	HC	H2.5	H5
Grasa total	4.77 ± 1.33*	6.37 ± 0.90*	5.41 ± 2.32*	25.58 ± 4.98	25.09 ± 0.89	25.73 ± 0.62
Colesterol total	223.9 ± 46 ^{ab*}	275.0 ± 48 ^{a*}	192.5 ± 45 ^b	6048 ± 2801 ^{a*}	647.8 ± 229 ^{c*}	233.4 ± 50 ^b
Ácido caprílico (C8:0)	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.06	nd	0.27 ± 0.008 ^a	0.13 ± 0.02 ^{ab}	0.10 ± 0.06 ^b
Ácido cáprico (C10:0)	0.33 ± 0.07 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.03 ^b	0.35 ± 0.09 ^a	0.14 ± 0.07 ^b	0.11 ± 0.05 ^b
Ácido undecanoico (C11:0)	nd	nd	nd	0.32 ± 0.09 ^a	0.15 ± 0.06 ^b	nd
Ácido láurico (C12:0)	0.21 ± 0.06 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.03 ^b	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Ácido tridecanoico (C13:0)	0.14 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.007 ^b	0.14 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.03 ^b
Ácido Mirístico (C14:0)	0.66 ± 0.34 ^a	0.18 ± 0.03 ^b	0.13 ± 0.02 ^b	1.67 ± 0.08 ^a	1.28 ± 0.16 ^b	1.29 ± 0.27 ^b
Ácido pentadecanoico (C15:0)	0.21 ± 0.10 ^a	0.08 ± 0.008 ^b	0.08 ± 0.009 ^b	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.05	0.34 ± 0.01
Ácido palmítico (C16:0)	7.79 ± 0.41 ^a	7.83 ± 0.98 ^{ab}	6.78 ± 0.85 ^b	22.63 ± 2.98	20.46 ± 2.17	19.13 ± 1.46
Ácido margárico (C17:0)	0.39 ± 0.21 ^a	0.16 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.02 ^b	0.46 ± 0.006 ^a	0.36 ± 0.04 ^b	0.36 ± 0.03 ^b
Ácido esteárico (C18:0)	5.00 ± 0.42	4.42 ± 0.70	4.95 ± 0.81	8.08 ± 0.23 ^a	6.35 ± 0.88 ^b	6.73 ± 0.88 ^b
Ácido Araquídico (C20:0)	0.80 ± 0.13 ^a	0.10 ± 0.02 ^b	0.10 ± 0.03 ^b	0.40 ± 0.13 ^a	0.25 ± 0.16 ^{ab}	0.13 ± 0.02 ^b
Ácido miristoleico (C14:1)	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.08	0.12 ± 0.07
Ácido cis 10-pentadecenoico (C15:1)	0.16 ± 0.07 ^b	0.18 ± 0.06 ^b	0.35 ± 0.05 ^a	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.03
Ácido palmitoleico (C16:1)	0.70 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.19 ^b	0.51 ± 0.09 ^b	2.98 ± 0.64	3.63 ± 0.70	3.63 ± 0.68
Ácido cis 10-heptadecenoico (C17:1)	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.009	0.32 ± 0.05	0.39 ± 0.07	0.43 ± 0.09
Ácid oleico (C18:1n9c)	3.27 ± 0.11	3.47 ± 0.24	3.25 ± 0.41	30.99 ± 2.68	39.58 ± 5.81	40.94 ± 8.92
Ácido eicosenoico (C20:1n9)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.09
Ácido nervónico (C24:1n9)	0.33 ± 0.03 ^b	0.39 ± 0.08 ^b	0.55 ± 0.09 ^a	0.32 ± 0.04 ^a	0.46 ± 0.10 ^{ab}	0.58 ± 0.13 ^b
Ácido linoleaídico (C18:2n-6)	nd	nd	nd	nd	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.02
Ácido linoleico (C18:2cn-6)	5.36 ± 0.85 ^b	6.97 ± 1.20 ^a	6.58 ± 0.61 ^a	13.87 ± 1.28	14.44 ± 1.73	18.05 ± 4.21
Ácido γ-linolénico (C18:3n-6)	0.21 ± 0.10 ^a	0.08 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.18 ± 0.04
Ácido α- linolénico (C18:3n-3)	0.32 ± 0.09 ^a	0.18 ± 0.07 ^b	0.28 ± 0.05 ^{ab}	0.51 ± 0.06 ^b	1.19 ± 0.27 ^a	1.39 ± 0.3 ^a
Ácido eicosadienoico (C20:2n-6)	0.11 ± 0.05 ^b	0.17 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.03 ^{ab}	0.28 ± 0.11 ^b	0.43 ± 0.07 ^a	0.42 ± 0.08 ^a
Ácido eicosatrienoico (C20:3n-6)	0.17 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.03 ^b	0.32 ± 0.07 ^a	0.73 ± 0.06	0.84 ± 0.23	0.81 ± 0.06
Ácido araquidónico (C20:4n-6)	5.76 ± 0.82	5.81 ± 0.61	6.27 ± 0.97	4.40 ± 0.42	5.00 ± 1.04	5.40 ± 0.70
Ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3)	nd	nd	0.19 ± 0.03	nd	0.14 ± 0.09 ^b	0.28 ± 0.05 ^a
Ácido docosahexaenoico (C22:6n-3)	1.19 ± 0.13 ^b	1.37 ± 0.01 ^a	1.53 ± 0.16 ^a	0.84 ± 0.10 ^b	1.04 ± 0.23 ^{ab}	1.28 ± 0.16 ^a

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a-c} Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos alimentados con la dieta estándar (NC, N2.5, N5) o la dieta alta en grasa (HC, H2.5, H5), después de realizar un ANOVA de una vía. nd: no detectado * Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), después de realizar una prueba t de dos muestras, entre los miembros de los pares NC-HC, N2.5-H2.5 y N5-H5.

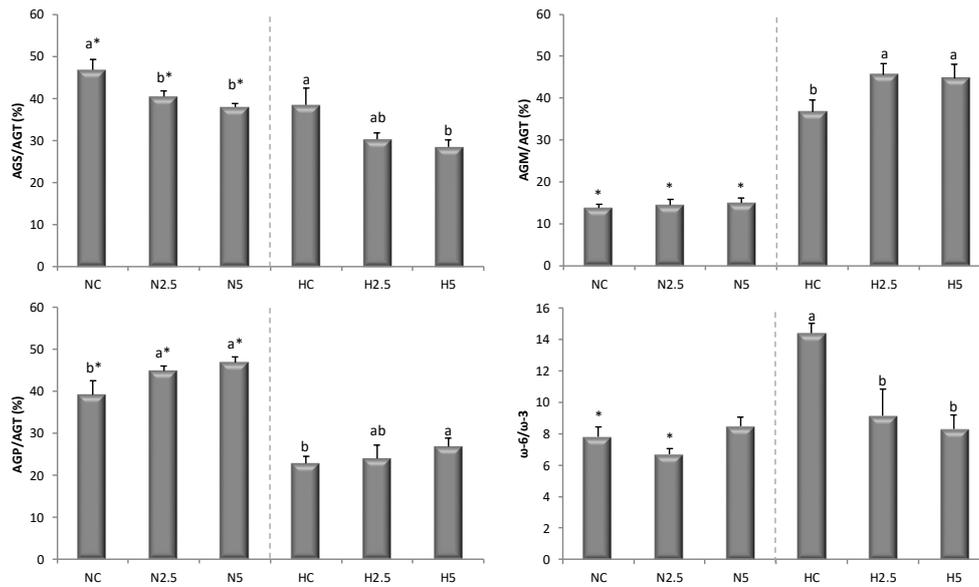


Figura 5.2.4. Ácido graso saturado (AGS)/ácido graso total (AGT), ácido graso monoinsaturado (AGM)/AGT, ácido graso poliinsaturado (AGP)/ácido graso total (AGT), y relaciones ω -6/ ω -3 en el hígado de ratas de los seis grupos experimentales. ^{a,b} Las letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los grupos alimentados con la dieta estándar (NC, N2.5, N5) o la dieta alta en grasa (HC, H2.5, H5) después de realizar un ANOVA de una vía. * Diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), después de realizar una prueba t de dos muestras, entre los miembros de los pares NC-HC, N2.5-H2.5 y N5-H5. Los resultados son expresan como media \pm SEM.

5.2.3.4. Expresión génica relacionada con EHGNA

Se seleccionaron veintisiete genes expresados diferencialmente del array de hígado graso (**Tabla 5.2.6**), de acuerdo con los criterios indicados en el apartado de material y métodos. Todos los genes con expresión diferencial mostraron una sobreexpresión del ARNm y no se observó de la batería de genes ninguno con una expresión relativa inferior a la muestra NC considerada como control. En términos generales, el grupo en el que se observaron los cambios más importantes en el transcriptoma fue N5, que muestra cambios en los genes relacionados con la β -oxidación (3 genes), el transporte de colesterol y otros lípidos y el metabolismo (14 genes) y la respuesta inflamatoria. y apoptosis (6 genes). Para los animales del grupo HC y H5, se sobreexpresaron 5 y 11 genes, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, una dieta rica en grasas condujo a cambios en la

expresión génica, pero se observaron cambios mayores en animales que ingirieron espinacas y acumularon carotenoides en sus hígados.

5.2.3.5. *Metabolitos en el hígado*

Respecto a los metabolitos hepáticos, el análisis de componentes principales (PCA) muestra una gran influencia del tipo de dieta (estándar o alta en grasa) sobre los metabolitos (representados por PC1), que representan el 74% de la varianza total en los aminoácidos y 69% de la varianza total en los componentes antioxidantes y nucleótidos (**Figura 5.2.5**). La suplementación con espinacas de la dieta (representada por PC2) representó el 10.7% de la varianza total en los aminoácidos y el 13% para los otros componentes analizados. Por lo tanto, la varianza total explicada conjuntamente por PC1 y PC2 fue de 84% para los aminoácidos y más del 82% para los otros componentes. En términos globales, la dieta estándar tuvo una influencia positiva en todos los metabolitos; sin embargo, el efecto de la espinaca (PC2) alteró principalmente las moléculas redox, como el L-glutati6n (GSH), la forma oxidada de L-glutati6n (GSSG), la L-homocisteína (Homo-Cys), la forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucle6tido (NAD), y la nicotinamida adenina dinucle6tido en su forma reducida (NADH), que muestra una modulaci6n de las respuestas redox, que podría estar asociada con la capacidad antioxidante de los carotenoides. Adem6s de lo anterior, un cambio en los nucle6tidos (monofosfato de adenosina (AMP), trifosfato de adenosina (ATP) y trifosfato de inosina (ITP)) y algunos aminoácidos (L-prolina (Pro), L-asparagina (Asn), L-cisteína (Cys), L-arginina (Arg), L-histidina (His), L-alanina (Ala), 6cido L-glut6mico (Glu) y taurina, lo que indica un efecto sobre el metabolismo redox.

En general, se observ6 una reducci6n significativa en el contenido de aminoácidos en los animales alimentados con una dieta grasa (HC y H5), en comparaci6n con los

grupos NC y N5. Cuando la dieta de los animales sanos se complementó con espinacas, las concentraciones de algunos aminoácidos aumentaron significativamente (L-serina [Ser], Pro, Cys, Asn, L-lisina/L-glutamina [Lys/Gln], Homo-Cys, L-triptófano [Trp], mientras que los de Glu y taurina disminuyeron (**Figura 5.2.6**). Los compuestos antioxidantes y nucleótidos también disminuyeron con la dieta grasa (**Figura 5.2.7**).

Tabla 5.2.6. El símbolo del gen, el nombre del gen y el cambio relativo de los genes que mostraron un valor de sobre o expresión inferior a 2 ($p < 0.05$) en los hígados de rata.¹

Símbolo	Nombre del Gen	NC-HC	NC-N5	NC-H5
<i>β-oxidación de ácidos grasos</i>				
<i>Acacl</i>	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, long-chain	-	3.03	-
<i>Cpt1a</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1A, liver	-	-	2.25
<i>Cpt2</i>	Carnitine palmitoyltransferase 2	-	7.97	2.24
<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	-	2.75	2.44
<i>Transporte y metabolismo del colesterol</i>				
<i>Abcg1</i>	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 1	5.89	2.26	-
<i>Apoa1</i>	Apolipoprotein A-I	-	7.86	-
<i>Apob</i>	Apolipoprotein B	-	2.68	-
<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	-	36.06	3.17
<i>Cnbp</i>	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein	-	4.70	-
<i>Cyp2e1</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	-	2.94	2.95
<i>Cyp7a1</i>	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	-	-	2.47
<i>Ldlr</i>	Low density lipoprotein receptor	-	4.76	-
<i>Nr1h3</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	-	2.23	-
<i>Nr1h4</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	-	11.29	2.88
<i>Ppard</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	-	2.93	-
<i>Pparg</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	3.36	6.81	3.85
<i>Srebf2</i>	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	-	3.66	-
<i>Transporte y metabolismo de otros lípidos</i>				
<i>Acsm3</i>	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	-	2.27	-
<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	2.98	-	-
<i>Respuesta inflamatoria y apoptosis</i>				
<i>Adipor1</i>	Adiponectin receptor 1	-	6.96	2.63
<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	2.15	-	-
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	7.04	3.23	-
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	-	3.05	-
<i>Casp3</i>	Caspase 3	-	2.62	3.02
<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	-	2.77	-
<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3	-	5.77	-

¹El cambio en veces para cada gen en los grupos N5, H5 y HC se calculó tomando como referencia un valor de 1 para el grupo NC. ATP: trifosfato de adenosina.

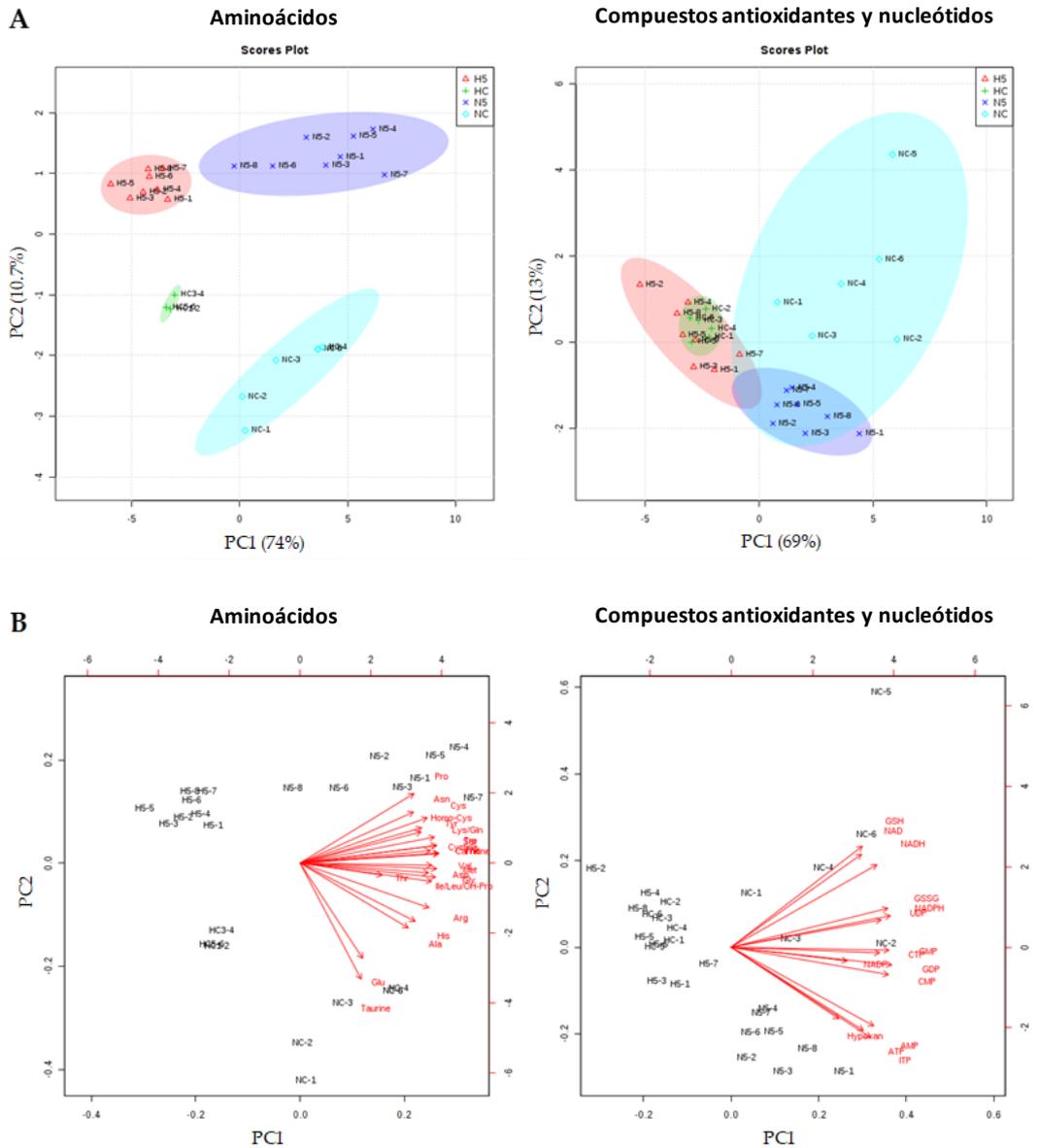


Figura 5.2.4. (A) puntuaciones de PCA y (B) longitud de los vectores para los aminoácidos, antioxidantes y compuestos de nucleótidos, según los metabolitos que se encuentran y que difieren significativamente (ANOVA $p < 0.05$) entre las diferentes dietas: grupo NC: dieta estándar, N5: dieta estándar + 5% de espinacas, HC: dieta alta en grasa y H5: dieta alta en grasa + 5% de espinacas. Las regiones de confianza están marcadas con diferentes elipses.

Sin embargo, en ratas alimentadas con la dieta N, el consumo de espinacas redujo significativamente las concentraciones de compuestos redox (GSH, GSSG, NAD, NADH) y de algunos nucleótidos (difosfato de uridina (UDP) y trifosfato de citidina (CTP)). El tipo de dieta, tanto el consumo de grasa como el de espinacas, influyeron en la relación GSH/GSSG del hígado, disminuyendo en ratas alimentadas con dietas H en

comparación con el grupo NC, y, de manera similar, se observó una reducción significativa en el grupo N5 (**Tabla 5.2.7**). Las relaciones de NAD/NADH y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada/nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADP/NADPH) se mantuvieron sin cambios entre los cuatro grupos experimentales (**Tabla 5.2.7**).

Tabla 5.2.7. Relación redox en el hígado de las ratas de cuatro grupos experimentales al final del periodo de intervención.¹

Relación	NC	N5	HC	H5
GSH/GSSG	1.39 ± 0.38 *	0.79 ± 0.16	0.97 ± 0.30	0.97 ± 0.21
NAD/NADH	0.33 ± 0.09	0.31 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.36 ± 0.10
NADP/NADPH	1.0 ± 0.26	1.29 ± 0.49	1.27 ± 0.59	1.27 ± 0.23

¹Los datos se expresan como media ± desviación estándar. * Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), después de realizar una prueba *t* de dos muestras comparando los grupos NC-N5 y HC-H5.

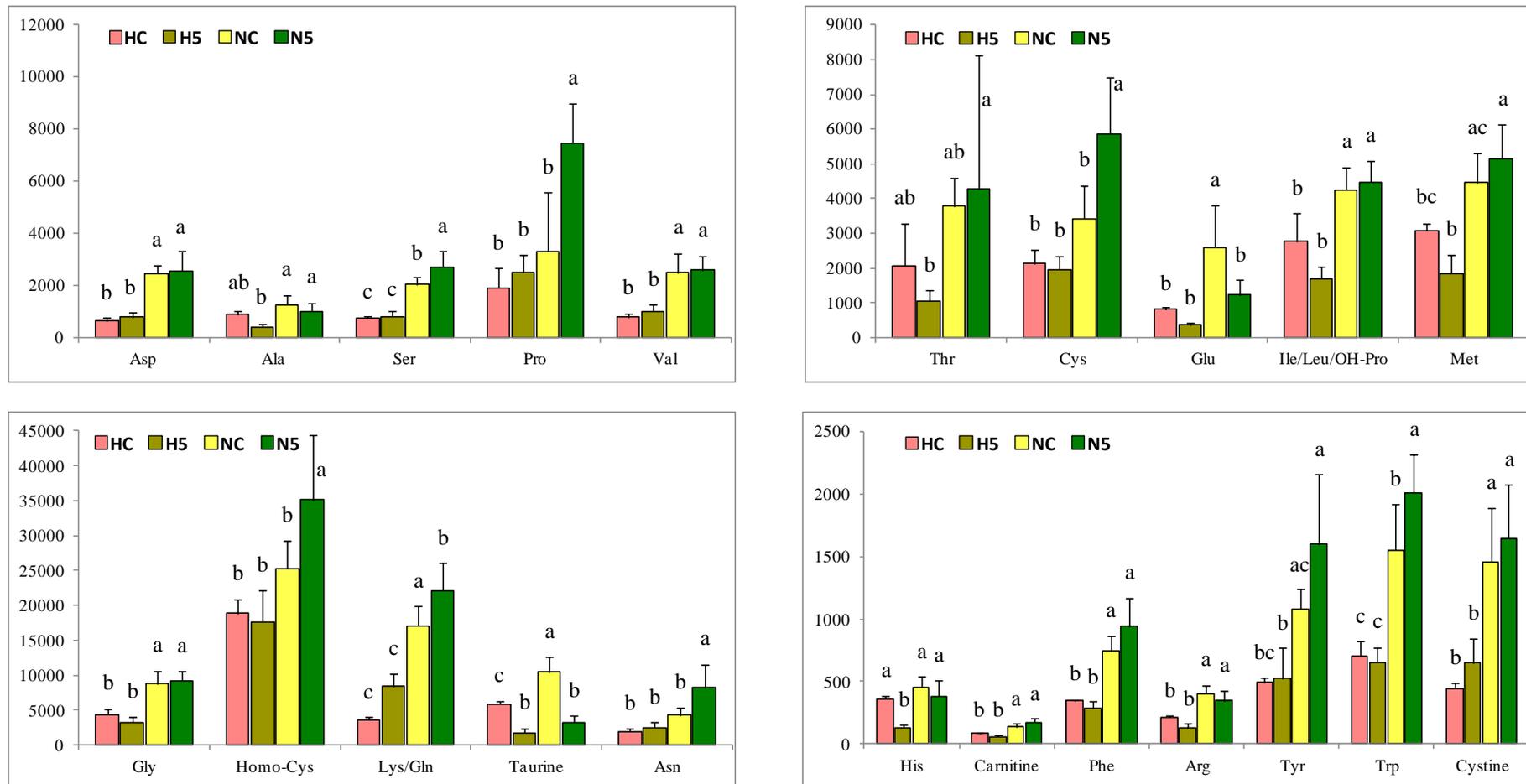


Figura 5.2.6. Contenido de aminoácidos en el hígado de ratas de los cuatro grupos experimentales (HC: dieta alta en grasa, H5: dieta alta en grasa + 5% de espinacas, NC: dieta estándar y N5: dieta estándar + 5% de espinacas). La altura de la barra indica el valor medio de cada condición de alimentación y la barra de error indica la desviación estándar. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

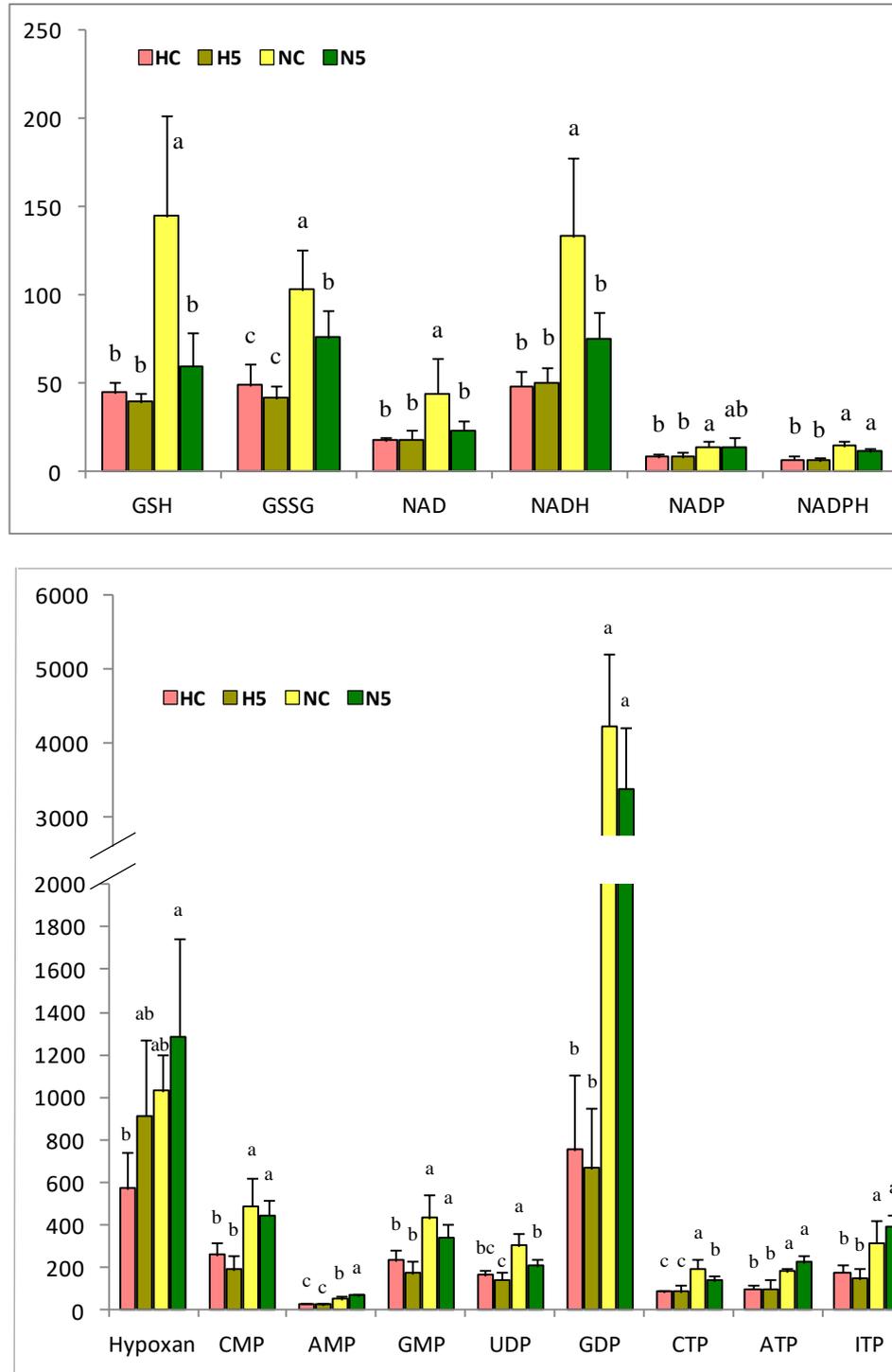


Figura 5.2.7. Compuestos antioxidantes y nucleótidos en el hígado de ratas de los cuatro grupos experimentales (HC: dieta alta en grasa, H5: dieta alta en grasa + 5% de espinacas, NC: dieta estándar y N5: dieta estándar + 5% de espinacas). La altura de la barra indica el valor medio de cada condición de alimentación y la barra de error indica la desviación estándar. ^{a-c} Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). GSH: L-glutatión; GSSG: forma oxidada de L-glutatión; NAD: nicotinamida adenina dinucleótido; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; CMP: monofosfato de citidina; AMP: monofosfato de adenosina; GMP: monofosfato de guanósina; UDP: difosfato de uridina; GDO: difosfato de guanósina; CTP: trifosfato de citidina; ATP: trifosfato de adenosina; ITP: trifosfato de inosina.

5.2.4. Discusión

5.2.4.1. Consumo de carotenoides y biomarcadores de la esteatosis

En el presente estudio, la ingesta de una dieta alta en grasa provocó esteatosis en ratas en los grupos H, según lo descrito por diferentes autores (Martín-Pozuelo *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015; Goossens y Jornayvaz, 2017). Los animales alimentados con la dieta alta en grasa mostraron un aumento significativo en las actividades de las enzimas hepáticas, relacionándolo con una esteatosis microvesicular. Sin embargo, esta alteración hepática no fue grave, ya que no hubo síntomas claros de lipotoxicidad y esteatohepatitis, según lo revelado por los biomarcadores de la inflamación y el estrés oxidativo. Aunque el consumo de espinacas no se acompañó, como era de esperar, de una reducción en los biomarcadores de la inflamación y de estrés oxidativo, en el examen histológico se observó una reducción del tamaño de los lípidos en las vacuolas y una reducción significativa en el peso total del hígado y los niveles de glucosa plasmática en los grupos H2.5 y H5. Este efecto de los carotenoides en el metabolismo de la glucosa se ha informado en estudios previos *in vivo* con carotenoides en la dieta (Ni *et al.*, 2015; Murillo y Fernandez, 2016), que muestran un efecto beneficioso en las características de la esteatosis mediante la disminución de la resistencia a la insulina. Aunque algunos parámetros plasmáticos se mantuvieron dentro del rango normal (León-Goñi *et al.*, 2011; Ihedioha *et al.*, 2013), desde el principio hasta el final del experimento, los cambios más significativos esperados estarían relacionados con el perfil lipídico debido a la esteatosis hepática. Se observó, una disminución en el colesterol total y las lipoproteínas LDL y VLDL, lo que podría explicarse por una disminución en la síntesis de lipoproteínas en el hígado, de modo que los lípidos se acumularon en los hepatocitos en lugar de ser liberados a la circulación periférica (Cabré-Gelada *et al.*, 2017), a la vez que se acumulan los niveles de TG circulantes. Es notable que el consumo de espinacas redujo

significativamente la proporción de TG plasmáticos, lo que nos indica una relación con el metabolismo lipídico en el hígado.

El papel de los carotenoides en la regulación de funciones específicas y en la prevención de enfermedades está determinada por su biodisponibilidad. Los carotenoides se absorben a través de la mucosa del intestino delgado por difusión pasiva, se incorporan a los quilomicrones debido a su naturaleza lipofílica, ya que son ricos en triglicéridos, y se transportan en la linfa al hígado (Maiani *et al.*, 2009). Más tarde, los carotenoides son transportados por las LDL y se incorporan al cuerpo interno de las lipoproteínas, mientras que las xantofilas se adhieren a su superficie; por este motivo, las xantofilas se transportan a otros órganos a una mayor velocidad (Massey, 1984). En el presente estudio, la acumulación de carotenoides totales se evaluó en el hígado, estando correlacionado positivamente, y de manera significativa, con la cantidad de espinacas y el tipo de dieta, ya que el contenido de grasa facilitó la absorción de los carotenoides, como se ha mencionado en otros estudios (Martín-Pozuelo *et al.*, 2015). Sin embargo, en los animales que ingirieron la dieta estándar con un 2.5% no se detectaron carotenoides en el hígado, al tener la dieta un contenido bajo en grasa y no actuar por tanto como elemento facilitador de la absorción.

Aunque los carotenoides fueron absorbidos y acumulados en el hígado de ratas de los grupos N5, H2.5 y H5, estos antioxidantes no tuvieron un efecto significativo sobre los biomarcadores del estrés oxidativo y la inflamación en plasma. Ko *et al.* (2014) informaron que el estrés oxidativo causado por la hiperlipidemia se puede prevenir en parte por las actividades antioxidantes de las espinacas administradas al 5%, junto con una dieta rica en grasa. Sin embargo, estos autores describieron una disminución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR) en el hígado, pero no en el plasma. Otros investigadores han reportado que varios carotenoides dietéticos, como el licopeno

del zumo de tomate administrado ad libitum, la luteína (100 mg/g de dieta), la zeaxantina (0.25 mg/g de dieta) y la astaxantina (0.2 mg/g de dieta), pueden disminuir el estrés oxidativo y/o los niveles de biomarcadores de inflamación celular en ratas (Kim *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2015; Martín-Pozuelo *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2016a). Estas concentraciones son más altas que las analizadas en este estudio. Por lo tanto, para evaluar el efecto beneficioso de los carotenoides procedentes de las espinacas en estos biomarcadores, podría requerirse una mayor concentración en la dieta. No se observaron cambios para la adiponectina en plasma y el TNF- α , lo que estaría asociado al bajo consumo de carotenoides, aunque la modulación de la respuesta inflamatoria por los carotenoides depende de diferentes factores, como los compuestos específicos y sus concentraciones, pero también del nivel de estrés oxidativo (Makon-Sébastien *et al.*, 2014). Así, los carotenoides se han utilizado para reducir la respuesta inflamatoria a través de los efectos en el sistema de transcripción del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Sin embargo, los resultados son contradictorios: en diferentes cultivos celulares, se encontró que el licopeno reprime el NF- κ B, mientras que el β -caroteno lo estimula (Sharoni *et al.*, 2016). Para tener una mayor información sobre el papel de los carotenoides en la respuesta inflamatoria, se estudió para los grupos NC, H5 y N5 los cambios en la expresión génica de determinados genes relacionados con la respuesta inflamatoria e involucrados en la EHGNA, que se discutirán más adelante.

Con relación a los cambios observados en el contenido de lípidos a nivel hepático, el agotamiento de AGP en los grupos H indica una disminución en la oxidación de ácidos grasos y la liberación de triglicéridos desde el hígado, con el consiguiente aumento de la síntesis de triglicéridos que puede haber contribuido significativamente a la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (Videla *et al.*, 2004). El consumo de espinacas condujo a cambios significativos en el perfil de ácidos grasos del hígado, observando un patrón

más saludable, con aumentos significativos en las proporciones de AGM y AGP y disminuciones significativas en las proporciones de AGS y la relación n-6/n-3. Estos cambios podrían considerarse beneficiosos con respecto a la inhibición de las quinasas relacionadas con el estrés y la apoptosis (Pardo *et al.*, 2015), ya que se ha informado de que los AGM disminuyen los niveles de lípidos intracelulares y los marcadores de inflamación, aumentando la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos (Reyes-Quiroz *et al.*, 2014). Además, este comportamiento sugiere que la acumulación de carotenoides estimuló la conversión de ácidos grasos en productos insaturados de cadena larga, produciendo ácido α -linolénico (C18: 3 n-3, ALA) y ácido eicosadienoico (C20: 2 n-6, EDA) según lo descrito por Bell *et al.* (Bell *et al.*, 2000). En nuestro estudio, cuando la dieta alta en grasa se complementó con espinacas, las concentraciones de AGM y AGP aumentaron significativamente, reduciendo la contribución de AGS (**Figura 5.2.3**). La explicación más plausible es una mayor actividad tanto de las desaturasas como de las enzimas elongasas, como lo describen otros autores (Da Silva-Santi *et al.*, 2016). Estos cambios reducen o inhiben la síntesis *de novo* de ácidos grasos y activan su oxidación mediante la estimulación de AGM y AGP. La disminución en la relación n-6/n-3 indica un aumento en la concentración de ácidos grasos n-3, que limita el almacenamiento de triglicéridos en el hígado, reduciendo el riesgo de desarrollo de EHGNA (Ferramosca y Zara, 2014). Además, los AGP n-3 son precursores de los eicosanoides antiinflamatorios, a diferencia de los AGP n-6, que producen eicosanoides proinflamatorios (Monteiro *et al.*, 2014). En los hígados de las ratas que acumularon carotenoides, las concentraciones de ácidos grasos ALA (C18: 3 n-3), EDA, EPA (C20: 5 n-3) y DHA (C22: 6 n-3) incrementaron, mejorando el perfil de ácidos grasos del hígado en términos de salud.

Además, la acumulación de carotenoides hepáticos también influyó en la reducción del nivel de colesterol en el hígado de las ratas con esteatosis, como se ha descrito en la literatura científica para diferentes carotenoides. Kim *et al.* (2012) informaron una reducción significativa en la distribución porcentual del colesterol libre en el hígado de ratas después de la administración de 0.1 g/100 g de luteína. Nicolle *et al.* (2003) informaron que la suplementación de la dieta con 0.25% de colesterol y 20% de zanahorias liofilizadas redujo significativamente los niveles de colesterol en plasma y en el hígado de ratones C57BL/6J. Qiu *et al.* (2015) alimentaron ratas Sprague-Dawley con una dieta alta en grasa suplementada con 50 mg de luteína/kg de peso corporal/día y encontraron una reducción en el contenido de colesterol en el hígado, que se correlacionaba con la concentración de luteína en la dieta. En otros estudios en animales que incluyeron una dieta alta en grasa suplementada con 20 mg de licopeno/kg de peso corporal/día o 30 mg de astaxantina/kg de peso corporal/día, la administración de estos carotenoides redujo la concentración de colesterol en el hígado a niveles similares al control (Jia *et al.*, 2016; Piña-Zentella *et al.*, 2016). En general, estos autores utilizaron material vegetal rico en carotenoides o compuestos puros en una dosis de 4 a 8 veces mayor que la utilizada en nuestro experimento. A pesar de que utilizamos una dosis más baja, el colesterol hepático disminuyó significativamente en ratas con esteatosis después de la ingesta de espinacas, así como en animales sanos al ingerir alrededor de 50 µg/día de carotenoides totales. Se han propuesto diferentes mecanismos para la reducción de la acumulación de colesterol en el hígado, uno es la inhibición de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), como se ha descrito para otros carotenoides como el licopeno (Periago *et al.*, 2016, Alvi *et al.*, 2016) y el β-caroteno (Fuhrman *et al.*, 1997), ya que aunque no se ha publicado para la luteína y zeaxantina,

estudios realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto que estos carotenoides también tiene capacidad de inhibir a la enzima (Cascales-Hernández, 2017).

5.2.4.2. *Bioactividad de dietas suplementadas con espinacas: modulación de la expresión génica*

Aunque la evidencia disponible sobre el uso potencial de carotenoides no provitamina A en la prevención y el tratamiento de la EHGNA sugiere que estos compuestos son efectivos para disminuir la acumulación de lípidos, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación en el tejido hepático, las vías más complejas relacionadas con la expresión génica no se han dilucidado completamente (Murillo *et al.*, 2016a). En esta investigación, observamos que la ingesta de una dieta rica en grasas y espinacas condujo a cambios en la expresión de genes relacionados con la enfermedad del hígado graso. En el grupo N5, los animales sanos que consumieron espinacas, se observó una sobreexpresión de un gran número de genes en comparación con el grupo control (NC). Así se recogió, la sobreexpresión de genes relacionados con la β -oxidación, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (*ACADL*), carnitina palmitoiltransferasa 2 (*CPT2*) y el receptor activado por el proliferador de peroxisoma- α (*PPARA*). *ACADL* codifica una enzima deshidrogenasa que cataliza la etapa inicial en cada ciclo de β -oxidación de ácidos grasos; esta es una de las clases de enzimas que son importantes debido a su papel en el metabolismo de los ácidos grasos presentes en la dieta (Thorpe y Kim, 1995). Además, *CPT2*, junto con la carnitina palmitoiltransferasa 1A de hígado (*CPT1A*), oxida los ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias, lo que permite la unión de los derivados de acil-CoA con una molécula polar de carnitina, lo que da como resultado la formación de moléculas de acilcarnitina que se transportan a la mitocondria (Gyamfi y Patel, 2010). En este estudio, solo *CPT2* se sobreexpresó, pero en un estudio

anterior, informamos que la ingesta de licopeno del zumo de tomate aumentó la abundancia de ARNm de *CPT1A*, junto con el contenido de carnitina en el hígado de ratas con esteatosis (Bernal *et al.*, 2013; Martín-Pozuelo *et al.*, 2015).

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) constan de tres miembros: receptor activado por el proliferador de peroxisoma- α (*PPARA*), receptor activado por el proliferador de peroxisoma- γ (*PPARG*) y el receptor activado por el proliferador de peroxisoma- δ (*PPARD*), que forman heterodímeros obligados con el receptor retinoide X (*RXR*). Los carotenoides y sus metabolitos son activadores de estos receptores (Sharoni *et al.*, 2016; Rühl y Landrier, 2016), que participan en la regulación transcripcional de varias vías del metabolismo de los lípidos. La *PPARA* se expresa en el hígado y se considera que ejerce un papel crítico en la prevención del estrés oxidativo relacionado con la grasa, la inflamación y la EHGNA (Abdelmegeed *et al.*, 2011). Los *PPARD* y *PPARG* también se expresaron en exceso en ratas N5, mostrando el efecto de los carotenoides procedentes de espinaca en la activación de otros tipos de receptores PPAR, expresados en otros tejidos (Wiersma *et al.*, 2009). Además, el gen acil-CoA sintetasa de la familia de cadena media, miembro 3 (*ACSM3*), que codifica una proteína que participa en la síntesis de los ácidos grasos de la cadena media, se sobreexpresó, lo que demuestra un aumento del metabolismo de los lípidos. La actividad de esta proteína conduce a una mayor afluencia de ácidos grasos en las mitocondrias, y en particular facilita la oxidación de los ácidos grasos de cadena media (de C4 a C11), ya que los derivados de acil-CoA de cadena pequeña y media tienen la capacidad cruzar la membrana mitocondrial interna por difusión (Gyamfi y Patel, 2010). Por estas razones, las ratas alimentadas con espinacas (grupos N5 y H5) tuvieron una relación AGS/AGT más baja en el hígado (**Tabla 5.2.6** y **Figura 5.2.3**).

En relación con el transporte y metabolismo de colesterol, se observó la sobreexpresión de apolipoproteínas (*APOA1*, *APOB* y *APOE*) y receptores de membrana como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*LDLR*) y el transportador de casetes de unión de ATP, subfamilia G, miembro 1 (*ABCG1*), lo que podría haber conducido a un aumento en la actividad de proteínas implicadas en el transporte del colesterol. El *ABCG1* se sobreexpresó, aumentando el flujo de salida de colesterol y fosfolípidos a las apolipoproteínas pobres en lípidos. Este transportador es un importante regulador del colesterol celular y la homeostasis de los fosfolípidos, ya que el colesterol absorbido por el hígado se puede reciclar a través de la vía *ABCG1*, que se secreta en la bilis, ya sea como colesterol libre o ácidos biliares, o se ensambla en partículas de lipoproteínas que se secretan de vuelta a la circulación (Wiersma et al., 2009). La sobreexpresión de *ABCG1* estuvo acompañada por la sobreexpresión del ARNm de las apolipoproteínas A, B y E, y también la del receptor de LDL, lo que indica un aumento en el metabolismo de las lipoproteínas. También encontramos una sobreexpresión del ARNm de genes implicados en la represión de la síntesis de diferentes lípidos, como el receptor nuclear 1H3 (*NR1H3*), receptor nuclear 1H4 (*NR1H4*), proteína de unión a ácido nucleico de dedo de cinc de tipo CCH (*CNBP*) y factor de transcripción de unión al elemento regulador de esterol 2 (*SREBF2*), que son responsables de la inhibición de la síntesis de colesterol y ácidos biliares. El LXR (*NR1H3*) está involucrado en el metabolismo de los lípidos del hígado (Musso et al., 2009) y muestra un efecto homeostático a nivel transcripcional. Este receptor regula la síntesis de lípidos a través de *SREBF2* y la excreción de ácidos biliares, activando el citocromo P450 7A1 (*CYP7A1*), logrando así un equilibrio en el contenido de colesterol hepático (Tainaka et al., 2011). Este efecto se ha descrito después del consumo de otros carotenoides, como el licopeno de tomate, en ratas con EHGNA inducida por una dieta grasa (Elvira-Torales et al., 2018).

Además, los genes implicados en la respuesta inflamatoria aumentaron su actividad, como lo demuestra la sobreexpresión de los genes supresores de la señalización de citoquinas 3 (*SOCS3*), caspasa 3 (*CASP3*) y la proteína quinasa 8 activada por mitógenos (*MAPK8*), que participan en la lucha contra procesos inflamatorios y apoptóticos. Otros carotenoides, como el licopeno, pueden prevenir el estrés oxidativo en los hepatocitos y también modular la respuesta del transcriptoma de los genes relacionados con la apoptosis y la regulación del ciclo celular, particularmente por la sobreexpresión de la proteína supresora de tumores (*TP53*), que actúa como una importante defensa contra el cáncer a través de la activación diferencial de los genes diana (Navarro-González *et al.*, 2018). Además, es importante destacar que los genes del receptor de adiponectina 1 (*ADIPOR1*) y del factor nuclear (*NFKB1*) estaban sobreexpresados, lo que también podría considerarse beneficioso para el hígado. Se ha demostrado que la adiponectina tiene propiedades citoprotectoras, mejorando tanto la sensibilidad a la insulina hepática como periférica y previniendo la esteatosis, la inflamación y la necrosis, mientras que la inhibición de la *NFKB1* induce la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y el carcinoma hepatocelular (CHC) sensibilizando a los hepatocitos para que se sometan a apoptosis espontánea (Streba *et al.*, 2015). Además, en el grupo N5, se observó la sobreexpresión de interleucina 1- β (*IL1B*), considerada una citoquina inflamatoria, pero no se detectó ningún efecto negativo en las ratas. Aunque no se detectaron cambios en los biomarcadores de inflamación analizados, los cambios en la expresión génica nos indicarían un posible efecto positivo en la regulación de la respuesta inflamatoria,

En el grupo de HC (ratas con esteatosis inducida por la dieta grasa), los genes como *ABCG1* y la lipoproteína lipasa (*LPL*) se expresaron en exceso. Estos genes codifican las proteínas que facilitan el transporte extracelular de lípidos y la hidrólisis de TG en ácidos grasos libres, respectivamente. La expresión génica de *LPL* es mayor en los sujetos obesos

con EHGNA que en los sujetos sin EHGNA, lo que sugiere que los ácidos grasos libres liberados por la lipólisis de los triglicéridos circulantes también contribuyen a la acumulación de ácido graso hepatocelular y la esteatosis (Fabbrini *et al.*, 2010). Además, hubo un aumento en la expresión de la transcripción factor *PPARG*; esto es responsable de aumentar la sensibilidad a la insulina y de promover la entrada de ácidos grasos y el almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos (Gavrilova *et al.*, 2003). Además, los genes *IL1B* y factor de necrosis tumoral (*TNFR [FAS]*) fueron sobreexpresados, revelando inflamación en los adipocitos, un resultado de la acumulación de grasa. Estos cambios están en concordancia con la alteración del metabolismo de los lípidos asociado con EHGNA y con lipotoxicidad (Gavrilova *et al.*, 2003).

A diferencia del grupo HC, el grupo H5 mostró algunas similitudes con el grupo N5, lo que indica que el consumo de espinaca tuvo un efecto positivo en la mejora de la afección del hígado graso. Por esta razón, se observó una modulación positiva de los genes involucrados en la oxidación de los ácidos grasos, asociada con la sobreexpresión de *CPT1A*, *CPT2* y el factor nuclear *PPARA*. Con respecto al transporte y metabolismo del colesterol, el gen *APOE*, que codifica las lipoproteínas, también se sobreexpresó, pero en menor medida en comparación con el grupo N5. Por lo tanto, la ingesta de espinacas promovió la expresión de estos genes, por lo que el colesterol del hígado disminuyó debido a su flujo de salida del hígado a través de las apolipoproteínas VLDL y LDL más abundantes. La actividad catabólica del colesterol se incrementó por la sobreexpresión de los genes del citocromo P450 2E1 (*CYP2E1*) y *CYP7A1*, responsables de la síntesis aumentada de ácidos biliares mediante la sobreexpresión de *NR1H4*. La *FXR (NR1H4)* estimuló la expresión de *CYP7A1* en ratas H5, manteniendo activa la síntesis de ácidos biliares y, por lo tanto, provocando una disminución del colesterol hepático (Musso *et al.* 2009). La *PPARG* es necesario para la diferenciación de adipocitos y para el

mantenimiento de adipocitos diferenciados, y se considera como un factor adipogénico, ya que es un activador de la síntesis y el almacenamiento de ácidos grasos. Sin embargo, desempeña funciones divergentes en el metabolismo, y estos efectos en el metabolismo son controvertidos. Por lo tanto, la activación de *PPARG* por las tiazolidinedionas, el agonista sintético más investigado, resulta en el aumento de la producción de adipocinas, incluida la adiponectina, que mejora la oxidación de los ácidos grasos hepáticos. Además, también promueve el almacenamiento de grasa en los adipocitos y disminuye la lipólisis del tejido adiposo, disminuyendo así la concentración de ácidos grasos almacenados en el hígado. Por otra parte, su activación también exhibe un papel antiinflamatorio. Este efecto está asociado con el aumento de la sensibilidad a la insulina, mejorando la resistencia de la insulina asociada con la esteatosis y el síndrome metabólico (Liss y Finck, 2017). En este estudio, también analizamos los índices de resistencia de la insulina [Log (HOMA-IR)] y sensibilidad a la insulina [QUICKI] (datos mostrados en el apartado 5.3 de esta tesis), donde observamos que ni el tipo de dieta (estándar vs alto en grasa) ni la ingesta de espinacas impactaron significativamente sobre sobre estos índices. Indicando que la homeostasis de la insulina no se aumentó de forma considerable a pesar del inicio de la EHGNA. Sin embargo, la suplementación de espinacas y la acumulación de carotenoides en el hígado (grupo H5) mostró un efecto significativo en la reducción de la glucosa plasmática, el colesterol total y los TG, así como el colesterol en el hígado. Finalmente, los genes *ADIPOR1* y *CASP3* se sobreexpresaron, como se describió anteriormente para ratas del grupo N5.

5.2.4.3. *Cambios en los metabolitos hepáticos*

Los aminoácidos analizados en el estudio metabólico tuvieron concentraciones más bajas en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa debido al alto contenido

calórico de esta dieta, que produjo un efecto hipoaminoacidémico (Xie *et al.*, 2010), principalmente para los aminoácidos glucogénicos, lo que confirma los resultados obtenidos en estudios realizados con dietas hiperlipidémicas. Las concentraciones de los intermediarios del proceso redox (Met y Taurina) disminuyeron en el grupo H5, lo que puede deberse a la ingesta de espinacas y al efecto antioxidante de los carotenoides acumulados en el hígado (Ip *et al.*, 2015). Una explicación plausible es que el nivel de moléculas antioxidantes endógenas se redujo y, por lo tanto, la relación GSH/GSSG mostró esta misma reducción. Aunque diferentes autores han considerado que un alto nivel de Homo-Cys en plasma está relacionado con EHGNA, siendo un factor crítico en los grupos de patogénesis (Bravo *et al.*, 2011; Ai *et al.*, 2017), en este estudio, el contenido hepático de Homo-Cys fue más alto en los animales del grupo N5; sin embargo, esto no puede considerarse un efecto negativo, ya que los animales de este grupo también tenían un alto contenido de metionina en el hígado. La relación GSH/GSSG fue alterada por los tratamientos, el tipo de dieta y la suplementación con espinacas, reduciéndose por el efecto antioxidante de la espinaca. Una explicación aceptable podría ser que el alto contenido de antioxidantes en la dieta determinó una respuesta *in vivo* más baja para mantener el equilibrio redox y, por lo tanto, el uso de glutatión reducido disminuyó significativamente. Este efecto concuerda con los hallazgos de otros autores que utilizaron extracto de tomate, licopeno y astaxantina y obtuvieron una reducción en la proporción redox (Leal *et al.*, 1999; Anuradha *et al.*, 2018).

REFERENCIAS

- Abdelmegeed MA, Yoo SH, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song BJ. PPAR α Expression Protects Male Mice from High Fat-Induced Nonalcoholic Fatty Liver. *J. Nutr.* 2011; 141(4): 603–610
- Ai Y, Sun Z, Peng C, Liu L, Xiao X, Li J. Homocysteine Induces Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in High Methionine Diet-Fed Mice. *Nutrients.* 2017; 9(4): E346.
- Alvi SS, Iqbal D, Ahmad S, Khan MS. Molecular rationale delineating the role of lycopene as a potent HMG-CoA reductase inhibitor: in vitro and in silico study. *Nat Prod Res.* 2016; 30(18): 2111–2114.
- Anuradha CV. Astaxanthin, a marine carotenoid against hepatic oxidative stress: A systematic review. In: Patel VB, Rajendram R, Preedy VR, editors. *The Liver: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants.* London, UK: Academic Press; 2018. p. 216–217.
- Bell JG, McEvoy J, Tocher DR, Sargent JR. Depletion of alpha-tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 2000; 130(7): 1800–1808.
- Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.* 2010; 28(1): 155–161.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B-Methodol.* 1995; 57(1): 289–300.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M, Periago MJ. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J. Nutr. Biochem.* 2013; 24(11): 1870–1881.
- Bravo E, Palleschi S, Aspichueta P, Buqué 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.
- Cabré-Gelada E, Peña-Quintana L, Virgili-Casas N. Tomo V. Nutrición en las enfermedades hepatobiliares. In: Gil-Hernández A, editor. *Tratado de Nutrición: Nutrición y enfermedad.* Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2017. p. 884.
- Cascales-Hernández AM. *Evaluación in vivo e in vitro del efecto hipocolesterolémico de los carotenoides dietéticos* (tesis de pregrado), Universidad de Murcia, Murcia, España. 2017.
- Charatcharoenwitthaya 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.
- Chun OK, Kim DO, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J Sci Food Agric.* 2005; 85(10): 1715–1724.
- Da Silva-Santi L, Antunes M, Caparroz-Assef S, Carbonera F, Masi L, Curi R, *et al.* Liver fatty acid composition and inflammation in mice fed with high-carbohydrate diet or high-fat diet. *Nutrients* 2016; 8(11): E682.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; 114(4): 842–845.
- Elvira-Torales LI, Navarro-González I, González-Barrio R, Martín-Pozuelo G, Doménech G, Seva J, *et al.* Tomato juice supplementation influences the gene

expression related to steatosis in rats. *Nutrients*. 2018; 10(9): E1215.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51(2): 679–689.

Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(7): 1746–1755.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497–509.

Fuhrman B, Elis A, Aviram M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 233(3): 658–662.

Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, *et al.* Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(36): 34268–34276.

Goossens N, Jornayvaz FR. Translational aspects of diet and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2017; 9(10): E1077.

Gyamfi D, Patel V. Liver metabolism: Biochemical and molecular regulations. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Watson RR, editors. *Nutrition, diet therapy, and the liver*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2017. p. 3–15.

Han H, Cui W, Wang L, Xiong Y, Liu L, Sun X, Hao L. Lutein prevents high fat diet-induced atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting NADPH oxidase and increasing PPAR expression. *Lipids*. 2015; 50(3): 261–273.

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(7): 344–349.

Her GM, Pai WY, Lai CY, Hsieh YW, Pang HW. Ubiquitous transcription factor YY1 promotes zebrafish liver steatosis and lipotoxicity by inhibiting CHOP-10 expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1831(6): 1037–1051.

Hijona E, Hijona L, Larzabal M, Sarasqueta C, Aldazabal P, Arenas J, Bujanda L. Biochemical determination of lipid content in hepatic steatosis by the Soxtec method. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(12): 1495–1499.

Hirawan R, Diehl-Jones W, Beta T. Comparative evaluation of the antioxidant potential of infant cereals produced from purple wheat and red rice grains and LC-MS analysis of their anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59(23): 12330–12341.

Ihedioha JI, Noel-Uneke OA, Ihedioha TE. Reference values for the serum lipid profile of albino rats (*Rattus norvegicus*) of varied ages and sexes. *Comp. Clin. Pathol.* 2013; 22(1): 93–99.

Ip BC, Liu C, Lichtenstein AH, von Lintig, J, Wang XD. Lycopene and apo-10'-lycopenoic acid have differential mechanisms of protection against hepatic steatosis in β -carotene-9',10'-oxygenase knockout male mice. *J. Nutr.* 2015; 145(2): 268–276.

Jia Y, Wu C, Kim J, Kim B, Lee SJ. Astaxanthin reduces hepatic lipid accumulations in high-fat fed C57BL/6J mice via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and inhibition of PPAR gamma and Akt. *J. Nutr. Biochem.* 2016; 28: 9–18.

Kim JE, Clark RM, Park Y, Lee J, Fernandez ML. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *Nutr. Res. Pract.* 2012; 6(2): 113–119.

- Ko SH, Park JH, Kim SY, Lee SW, Chun SS, Park E. Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2014; 19(1): 19–26.
- Kobori M, Ni Y, Takahashi Y, Watanabe N, Sugiura M, Ogawa K, *et al.* β -Cryptoxanthin alleviates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing inflammatory gene expression in mice. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e98294.
- Leal M, Shimada A, Ruíz F, González de Mejía E. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicol. Lett.* 1999; 109(1–2): 1–10.
- 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. Electron. Vet.* 2011; 12(11): 1–10.
- Liss HH, Finck BN. PPARs and Nonalcoholic Fatty liver disease. *Biochimie.* 2017; 136: 65–74.
- Maiani G, Periago Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, *et al.* Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53(2): S194–S218.
- Makon-Sébastien N, Francis F, Eric S, Henri VP, François LJ, Laurent P, *et al.* Lycopene modulates THP1 and CaCO₂ cells inflammatory state through transcriptional and nontranscriptional processes. *Mediat. Inflamm.* 2014; 2014: 507272.
- Martín-Pozuelo G, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J, Hidalgo N, *et al.* The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur. J. Nutr.* 2015; 54(6): 933–944.
- Massey JB. Kinetics of transfer of alpha-tocopherol between model and native plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1984; 793(3): 387–392.
- Monteiro J, Leslie M, Moghadasian MH, Arendt BM, Allard JP, Ma DW. The role of *n*-6 and *n*-3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Food Funct.* 2014; 5(3): 426–435.
- Murillo AG, Aguilar D, Norris GH, DiMarco DM, Missimer A, Hu S, *et al.* Compared with powdered lutein, a lutein nanoemulsion increases plasma and liver lutein, protects against hepatic steatosis, and affects lipoprotein metabolism in guinea pigs. *J. Nutr.* 2016b; 146(10): 1961–1969.
- Murillo AG, DiMarco DM, Fernandez ML. The potential of non-provitamin A carotenoids for the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Biology.* 2016a; 5(4): 42.
- Murillo AG, Fernandez ML. Potential of dietary non-provitamin A carotenoids in the prevention and treatment of diabetic microvascular complications. *Adv. Nutr.* 2016; 7(1): 14–24.
- 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): 1–26.
- Navarro-González I, García-Alonso J, Periago MJ. Bioactive compounds of tomato: Cancer chemopreventive effects and influence on the transcriptome in hepatocytes. *J. Funct. Foods.* 2018; 42: 271–280.
- Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, *et al.* Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci. Rep.* 2015; 5: 17192.
- Nicolle C, Cardinault N, Aprikian O, Busserolles J, Grolier P, Rock E, *et al.* Effect of carrot intake on

cholesterol metabolism and on antioxidant status in cholesterol-fed rat. *Eur. J. Nutr.* 2003; 42(5): 254–261.

Pardo V, Gonzalez-Rodriguez A, Muntane J, Kozma SC, Valverde AM. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem. Toxicol.* 2015; 80: 298–309.

Periago MJ, Martín-Pozuelo G, Gonzalez-Barrio R, Santaella M, Gómez V, Vazquez N, *et al.* Effect of tomato juice consumption on the plasmatic lipid profile, hepatic HMGCR activity, and fecal short chain fatty acids content of rats. *Food Funct.* 2016; 7(10): 4460–4467.

Piña-Zentella RM, Rosado JL, Gallegos-Corona MA, Madrigal-Pérez LA, García OP, Ramos-Gomez M. Lycopene improves diet-mediated recuperation in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Med. Food.* 2016; 19(6): 607–614.

Prior RL, Hoang HA, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(11): 3273–3279.

Prosky L, Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF. Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985; 68(4): 677–679.

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.

Reyes-Quiroz ME, Alba G, Saenz J, Santa-María C, Geniz I, Jiménez J, *et al.* Oleic acid modulates mRNA expression of liver X receptor (LXR) and its target genes ABCA1 and SREBP1c in human neutrophils. *Eur. J. Nutr.* 2014; 53(8): 1707–1717.

Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct.* 2016; 7(8): 3337–3353.

Rühl R, Landrier JF. Dietary regulation of adiponectin by direct and indirect lipid activators of nuclear hormone receptors. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016; 60(1): 175–184.

Sharoni Y, Agbaria R, Amir H, Ben-Dor A, Bobilev I, Doubi N, *et al.* Modulation of transcriptional activity by antioxidant carotenoids. *Mol. Asp. Med.* 2003; 24(6): 371–384.

Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K, Khanin M, Salman H, Veprik A, Danilenko M, Levy J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016; 56(2): 259–269.

Streba LAM, Vere CC, Rogoveanu I, Streba CT. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: An open question. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21(14): 4103–4110.

Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Zang L, Oka T, Nishimura Y, *et al.* Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutr. Metab. (Lond).* 2011; 8: 88.

Thorpe C, Kim JJ. Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J.* 1995; 9(9): 718–725.

Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37(9): 1499–1507.

Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2010; 44(7–8): 575–586.

Wiersma H, Nijstad N, de Boer JF, Out R, Hogewerf W, Van Berkel TJ, *et al.* Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*. 2009; 206(1): 141–147.

Xie Z, Li H, Wang K, Lin J, Wang Q, Zhao G, *et al.* Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metabolism*. 2010; 59(4): 554–560.

Yilmaz B, Sahin K, Bilen H, Bahcecioglu IH, Bilir B, Ashraf, *et al.* Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2015; 4(3): 161–171.

5.3. (ESTUDIO 2)

Efecto del consumo de espinacas en la microbiota intestinal y cambios en el perfil lipídico de ratas con enfermedad de hígado graso no alcohólico inducida por la dieta

5.3.1. Introducción

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se define como la acumulación de grasa en las células hepáticas, que causa graves consecuencias para la salud, como esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis en etapas tardías de la enfermedad. Esta enfermedad ha despertado interés general durante amplia difusión en los países desarrollados y semidesarrollados debido a su asociación con la obesidad, hiperlipidemia, síndrome metabólico y diabetes mellitus (Arslan, 2014; Cao *et al.*, 2015). Los principales síntomas de la EHGNA incluyen la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos y la resistencia a la insulina, que se evidencian por la presencia de hiperinsulinemia, hiperglucemia y aumento de la producción de VLDL y LDL (Park *et al.*, 2013).

Los estudios en animales y humanos sugieren que la microbiota intestinal desempeña un papel en la patogenia de la EHGNA, ya que el hígado está conectado al intestino a través de la vena porta y, por lo tanto, es susceptible a cambios en la microbiota y sus metabolitos (Gratz *et al.*, 2010; de Faria Ghetti *et al.*, 2018). La progresión de la EHGNA también se asocia con la sobreproducción de bacterias intestinales y el aumento de permeabilidad intestinal - que causa una mayor captación de monosacáridos desde el lumen, favorece la síntesis *de novo* de ácidos grasos y triglicéridos, y contribuye a la deposición de grasa en las vacuolas hepáticas, aumentando así la inflamación y el estrés oxidativo hepático debido a la absorción de productos de fermentación tales como etanol y lipopolisacáridos. (Gratz *et al.*, 2010; Eslamparast *et al.*, 2014)

Para el tratamiento de la EHGNA, el tratamiento inicial contempla cambios en el estilo de vida, principalmente cambios dietéticos, pérdida de peso y ejercicio físico. Según la investigación, la mejor dieta para mejorar esta condición es la Mediterránea, debido a sus características específicas: baja ingesta de grasas saturadas y azúcares procesados y una alta ingesta de frutas y verduras - que proporcionan una amplia gama de compuestos

bioactivos, como grasas insaturadas y compuestos antioxidantes, incluyendo vitaminas C y E, carotenoides y compuestos fenólicos (Bernal *et al.*, 2013). Además, está aumentando el interés en el uso de prebióticos, probióticos y su simbiosis como un medio para disminuir los efectos de la EHGNA, al reducir los marcadores de inflamación, como NF- κ B y TNF- α (Eslamparast *et al.*, 2014), y reduciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Raso *et al.*, 2014). El uso de prebióticos para el tratamiento de la EHGNA ha demostrado ser beneficioso en el tratamiento de la enfermedad, ya que mejora la reducción del peso corporal, disminuye la ingesta de alimentos y la sensibilidad a la insulina disminuye, mejorando la homeostasis de la glucosa (Jakobsdottir *et al.*, 2013; Kasubuchi *et al.*, 2015).

La fermentación microbiana intestinal de compuestos prebióticos como la fibra dietética conduce a la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que pueden tener efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de la EHGNA y síndrome metabólico. Entre los AGCC, el propionato y el butirato están relacionados con la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos y la glucosa, mientras que el acetato se utiliza principalmente en la síntesis de lípidos y colesterol hepáticos. El butirato activa la β -oxidación y el transporte de colesterol a través de las lipoproteínas, dando como resultado la disminución de los depósitos de grasa y resistencia a la insulina, disminuyendo así el contenido de triglicéridos. El propionato interviene en la inhibición de la síntesis de colesterol hepático y en la regulación de triglicéridos y niveles de HDL (Lin *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2013; Morrison y Preston, 2016).

Además de la fibra dietética, otros compuestos bioactivos presentes en alimentos de origen vegetal también se consideran prebióticos, modulando la microbiota intestinal. Al igual que los carbohidratos no digeribles, los polifenoles dietéticos no se absorben completamente en el tracto gastrointestinal y se metabolizan por la microbiota intestinal

al alcanzar el colon. Recientemente, se ha propuesto que al menos algunas de las actividades atribuidas a los polifenoles de los alimentos se deben a sus catabolitos fenólicos microbianos generados en el colon. Así, los compuestos fenólicos, y sus metabolitos, pueden acumularse para ejercer efectos fisiológicos locales y/o sistémicos o incluso modular la población bacteriana intestinal actuando como potenciales prebióticos. Existe evidencia del efecto de derivados de compuestos fenólicos sobre la microbiota, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y estimulando el desarrollo de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella* y Firmicutes productoras de butirato (Lee *et al.*, 2006; Cardona *et al.*, 2013; Valdés *et al.*, 2015).

Los vegetales de hoja verde, como la espinaca, se consumen comúnmente en la dieta Mediterránea y han sido dotados con propiedades funcionales antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas, antiobesidad, hipoglucemiantes, hipolipidémicas debido a su contenido de compuestos bioactivos. En particular, la espinaca se compone principalmente de agua (91.4%) y contiene pequeñas cantidades de proteína (2.9%), carbohidratos (3.6%) y grasa (0.4%). La fracción lipídica está compuesta principalmente de ácidos grasos mono y poliinsaturados (por ejemplo, ácido α -linolénico, ácido linoleico, ácido oleico) y pequeñas cantidades de ácidos grasos saturados (por ejemplo, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido esteárico). La espinaca también es fuente de fibra "principalmente insoluble" con un contenido promedio de 2–3 g/100 g, y proporciona cantidades importantes de vitaminas (K, A, folato, C) y Minerales (Mg, K, Fe) (Li *et al.*, 2002; Roberts y Moreau, 2016).

Además, la espinaca proporciona diferentes clases de compuestos fenólicos, carotenoides y clorofilas. El contenido total de carotenoides está en el rango de 7 a 17 mg/100 g, siendo la luteína, el β -caroteno y la zeaxantina los más representativos en su

perfil de carotenoides (Granado *et al.*, 1992). Entre los compuestos fenólicos, la espinaca tiene cantidades notables de flavonoides (100–300 mg/100 g) tales como patuletina, espinacetina, espinatosida y jaceidina. Los ácidos fenólicos predominantes (40–125 mg/100 g) son *o*-cumárico, ferúlico y *p*-cumárico, y los principales lignanos encontrados en espinacas son lariciresinol, secoisolariciresinol y pinoresinol (Roberts y Moreau, 2016).

Hasta donde sabemos, los estudios sobre el efecto de la ingesta de espinacas en la microbiota intestinal todavía son escasos. Varias investigaciones en animales relacionadas con la ingesta de tilacoides de espinacas informaron modulación de la microbiota intestinal, mejorando la respuesta a la insulina y la regulación del apetito (Montelius *et al.*, 2013; Erlanson-Albertsson y Albertsson, 2015; Stenblom *et al.*, 2016).

Sobre esta base, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del consumo de espinaca sobre ciertos grupos bacterianos intestinales y la producción de ACCG y catabolitos fenólicos microbianos en ratas con EHGNA inducida por la dieta alta en grasa, explorando las relaciones con los cambios en la glucosa plasmática y en el perfil lipídico, con la finalidad de establecer un posible mecanismo de acción de la ingesta de espinacas en la prevención y tratamiento dietético de la EHGNA y en el manejo de las características del síndrome metabólico.

5.3.2. Materiales y Métodos

5.3.2.1. Diseño experimental

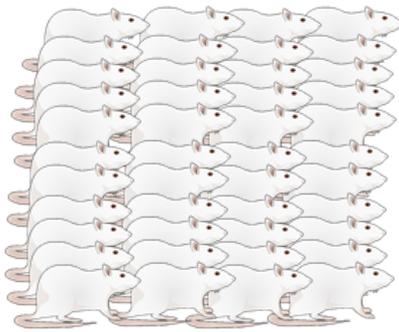
Para el presente estudio se seleccionaron 44 ratas Sprague-Dawley adultas (8 semanas de edad) en dos grupos (n = 22) según la dieta: la dieta normal (NC) (Dieta de mantenimiento de roedores con proteínas del 14% Teklad Global TD-2014; Harland Laboratories) y una dieta alta en grasa (HC) (Atherogenic Rodent Diet TD-02028;

Harland Laboratories). Estas dietas fueron administradas por un periodo de aclimatación de 2 semanas y, después de este tiempo, se inició un periodo de intervención de 5 semanas con espinacas. Para ello, los animales de cada grupo se asignaron al azar a diferentes subgrupos de acuerdo con el tipo de dieta (NC o HC) y la cantidad de espinacas suplementadas (0, 2.5 o 5%). Así que, había seis grupos experimentales; dos grupos de control (n = 6 ratas/grupo) que consumieron dietas libres de espinacas NC y HC, y cuatro grupos experimentales (n = 8 ratas/grupo): NA (NC + 5% espinacas), NB (NC + 2.5% de espinacas), HA (HC + 5% de espinacas) y HB (HC + 2.5% de espinacas) (**Figura 5.3.1; Tabla 5.3.1**). Durante el periodo de experimentación de 5 semanas, las ratas se colocaron en jaulas, en las mismas condiciones ambientales y se les dio libre acceso a alimentos y bebidas. Las condiciones experimentales y el procedimiento seguido fue el mismo que el descrito en el apartado 5.2. Donde el peso corporal fue registrado semanalmente, mientras que el consumo de alimento, las excreciones urinarias y fecales se registraron al inicio y final del periodo de intervención, utilizando para ello las jaulas metabólicas para su recolección. Al término de las 5 semanas, las ratas fueron sacrificadas y se recogieron las muestras biológicas (sangre, contenido intestinal, orina e hígado), al utilizar para esta experiencia el mismo estudio experimental (estudio 2). Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta que se llevaron a cabo los procesos analíticos.

5.3.2.2. *Espinacas y preparación de las dietas experimentales*

La preparación de las dietas se menciona en el capítulo 5.2 (espinacas y preparación de dietas). La composición de las dietas experimentales se muestra en la **Tabla 5.3.1**.

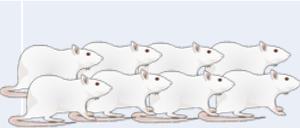
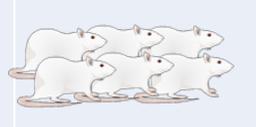
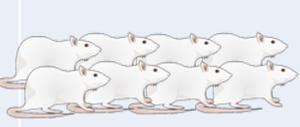
Ratas Sprague-Dawley
(n = 44)



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:201109_rat.png



<https://pixabay.com/es/verde-frondosas:hortalizas-hojas:576756/>

Periodo de aclimatación de 2 semanas	Periodo de intervención de 5 semanas		
Dieta normal (NC)	NC (0% espinaca)	NB (2.5%) 	NB (5%) 
 n = 22	 n = 6	 n = 8	 n = 8
Dieta alta en grasa (HC)	HC (0% espinaca)	HB (2.5%) 	HB (5%) 
 n = 22	 n = 6	 n = 8	 n = 8

5.3.1. Diseño experimental del estudio.

Tabla 5.3.1. Características nutricionales de las dietas utilizadas en el periodo de intervención.

Cantidad de nutrientes (por 100 g)	NC	NB	NA	HC	HB	HA
Energía (kcal)	290	292.7	287.5	450	437.7	438
Proteína (g)	14.3	14.98	15.46	17.3	17.71	18.12
Carbohidratos (g)	48.0	47.21	45.41	46.9	41.4	42
Grasa (g)	4.0	4.01	4.03	21.20	20.78	20.37
Saturada total (g)	0.6	0.7	0.9	12.8	12.6	12.5
Monoinsaturada total (g)	0.7	0.7	0.7	5.6	5.5	4.4
Poliinsaturada total (g)	2.1	2.5	2.8	1.0	1.4	1.8
Colesterol (g)	-	-	-	1.25	1.22	1.19
Fibra dietética (g) ¹	21.2	21.3	22.6	6.9	12.4	11.8
Fenólicos totales (mg GAE) ²	188	192	196	20	21	22
Carotenoides totales (µg) ³	-	305	909	-	305	909

NC: Dieta normal (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, 2014)

HC: Dieta alta en grasa (Atherogenic Rodent Diet, TD.02028, Harlan) que contiene caseína (19.5%), sacarosa (32.5%), grasa láctea anhidra (21%). Ácidos grasos principales (palmítico > oleico > esteárico > mirístico).

NB: Dieta normal + 2.5% espinaca, NA: Dieta normal + 5% espinaca, HB: Dieta alta en grasa + 2.5% espinaca, HA: Dieta alta en grasa + 5% espinaca

NB, NA, HB and HA: Datos estimados de las hojas de datos de la dieta y la composición próxima de espinacas.

¹Fibra dietética utilizando el método AOAC 985.29 (Prosky *et al.*, 1985).

²GAE; Equivalentes de ácido gálico analizados con el reactivo de fenol de Folin Ciocalteu (Hirawan *et al.*, 2011).

³Los carotenoides totales son la suma de β -caroteno, α -caroteno and luteína- analizados en espinacas liofilizadas mediante HPLC (Seybold *et al.*, 2004). Las cantidades en las dietas fueron calculadas sobre la base de la cantidad (%) agregada a las dietas.

5.3.2.3. *Inicio de la EHGNA*

Para corroborar la presencia de esteatosis, se examinó el tejido hepático mediante pruebas histopatológicas realizadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia. Como se ilustra en la **Figura 5.3.2**, en los grupos H (HC, HB, HA) se observó esteatosis hepática grado 3, caracterizada por la inflamación de los hepatocitos y acumulación de grasa en el 50–75% de los hepatocitos. Por lo tanto, el contenido de grasa del hígado resultó 5 veces mayor en los grupos H, en comparación con los grupos N, y los animales presentaron alteraciones del perfil lipídico del plasma. Estos cambios se acompañaron, como se ha descrito anteriormente, de un aumento del peso corporal (1.7 veces) y de la actividad de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) (1.5 veces) y alanina aminotransferasa (ALT) (1.4 veces), en comparación con los grupos N (datos no mostrados). Como se muestra en la **Tabla 5.3.7**, el contenido de colesterol en el hígado fue 33 veces mayor en el HC que en el grupo de NC.

5.3.2.4. *Análisis de la microbiota mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)*

Para el análisis de la microbiota se utilizó el kit comercial QIAmp DNA Stool Mini kit (QUIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la extracción del ADN. La posterior amplificación y detección se llevó a cabo utilizando un sistema de PCR en tiempo real BioRad CFX96 (BioRad Laboratories, Marnes la Coquette, Francia). El proceso consistió en un ciclo inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y 1 min a 60 °C como temperatura de anillamiento. La mezcla de reacción estaba compuesta de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 µM de cada cebador específico (**Tabla**

5.3.2) y 1 μL de ADN de plantilla en un volumen final de 25 μL . Se realizó el análisis de la fusión de la curva inmediatamente después de la amplificación, para distinguir el producto de la PCR específica, se cuantificó por un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen, Alemania). Las curvas de calibración fueron creadas usando series de dilución de 10 veces, correspondientes a 10 a 10^8 número de copias de genes/g. La concentración bacteriana en cada muestra se calculó comparando el ciclo umbral de los valores (Ct) obtenidos a partir de curvas de calibración, y los resultados se expresaron como el número de copias de genes/g de contenido intestinal. Las muestras fueron analizadas por duplicado con al menos dos análisis de PCR independiente.

5.3.2.5. *Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)*

Se siguió el método propuesto por Mateo-Anson *et al.* (2011), con modificaciones, para determinar los AGCC en el contenido intestinal. Para esto, se homogeneizaron 100 mg de muestra con 650 μL de una mezcla de ácido fórmico (20%), metanol y ácido 2-etilbutírico como estándar interno (2 mg/mL en metanol), en una proporción de 1/4.5/1 (v/v), se sonicó durante 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 16110 g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de politetrafluoroetileno con un diámetro de 13 mm y un tamaño de poro de 0.22 μm (VWR International, EE. UU.) y se analizaron por GC-FID. El análisis cromatográfico se realizó con un sistema Agilent 7890A GC-FID equipado con un inyector automático (7683B) (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.). Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna Nukol™ (Supelco, EE. UU.): 30 m de largo, diámetro interno de 0.25 mm, con un espesor de película de 0.25 μm . Se utilizó helio como gas portador a un caudal de 25 mL/min. La rampa de temperatura del horno fue la siguiente: 80 °C constante durante 5

minutos y luego se aumentó a 185 °C a una velocidad de 5 °C/min. La temperatura del detector y del inyector fue de 220 °C, el flujo de aire fue de 400 mL/min y el flujo de hidrógeno fue de 30 mL/min. Un multi-estándar comercial (SUPELCO, EE. UU.) con calidad certificada, con los AGCC mayoritarios y minoritarios (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocaproico y ácido heptanoico), a una concentración de 10 mM, fue utilizado para preparar estándares múltiples de 1, 5 y 10 mM.

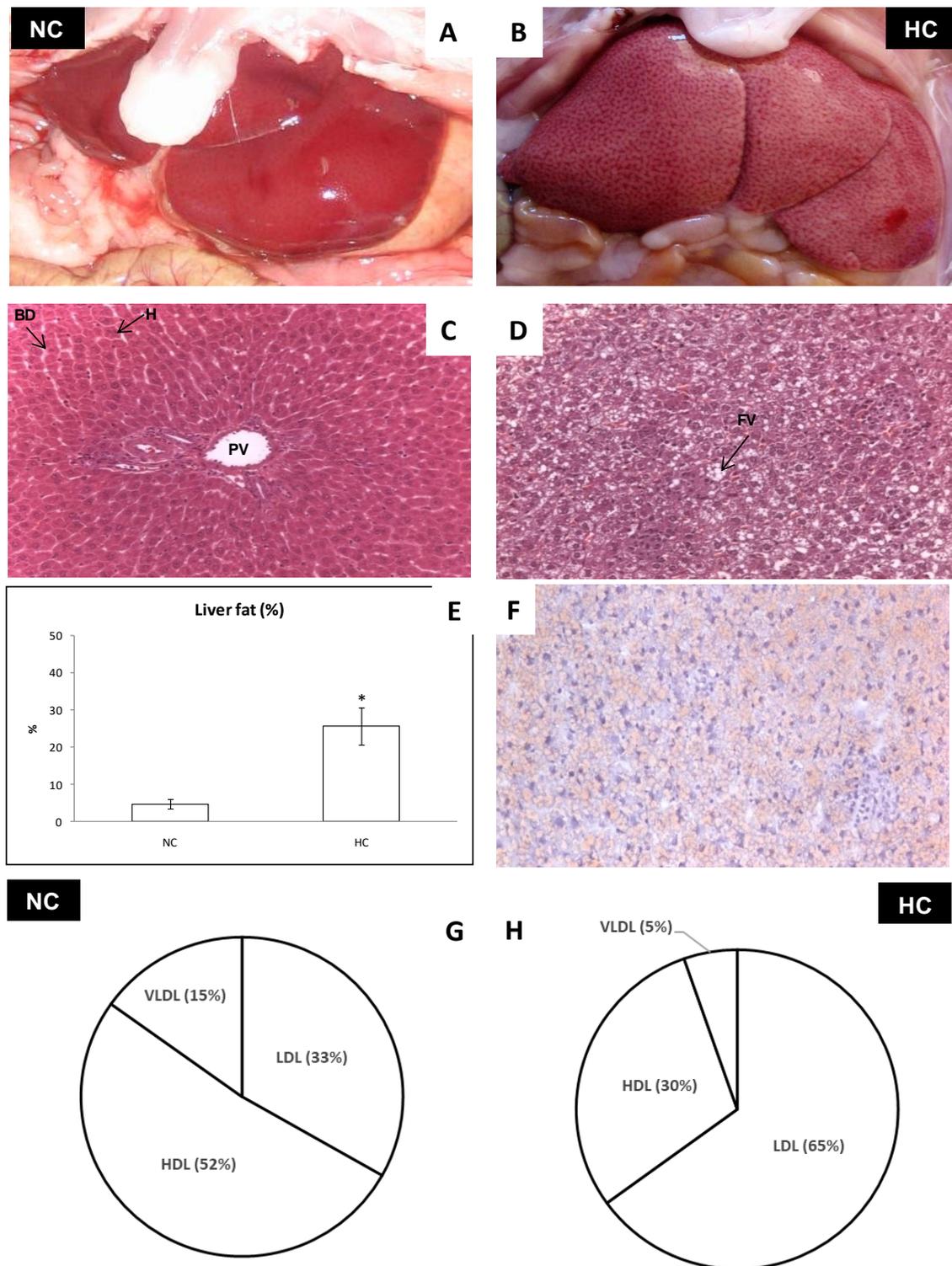


Figura 5.3.2. Fotografías representativas macroscópicas y microscópicas (20x) del hígado de los grupos NC (dieta estándar) y HC (dieta alta en grasa). Paneles **A**, **B**: aspecto visual del hígado de rata durante la disección para obtener muestras de hígado. Paneles **C**, **D**: imágenes microscópicas con tinción H&E. Panel **F**: imagen microscópica con tinción roja de Sudán. HC: dieta alta en grasa, NC: dieta estándar. PV: vena porta, H: hepatocito, BD: conducto biliar, FV: vacuola grasa. Panel **E**: contenido de grasa hepática al final del estudio. Paneles **G**, **H**: contribución relativa (%) de LDL, HDL y VLDL del total del colesterol en plasma en los grupos NC y HC. * Indica una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Table 5.3.2. Grupos bacterianos, cultivos estándar, cebadores y temperaturas de anillamiento utilizados en este estudio.

Objetivo microbiano	Cepa utilizada para la curva estándar	Secuencia de cebador 5'-3'	Tf*	Referencia
Grupo de <i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	F: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	64	Rinttilä <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacteroides-Prevotella-Porphiromonas</i>	DSMZ2079	R: CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC		
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	F: GATTCTGGCTCAGGATGAACGC	60	Gueimonde <i>et al.</i> , 2004
	NCIMB8809	R: CTGATAGGACGCGACCCCAT		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	F: CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	63	Bartosch <i>et al.</i> , 2004
	LMG2092	R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC		
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	F: CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	61	Rinttilä <i>et al.</i> , 2004
	IPLAIF3/1	R: ACTCGTTGTACTTCCCATTGT		
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	60	Walter <i>et al.</i> , 2001; Heiling <i>et al.</i> , 2002
	IPLAIF1/6	R: CACCGCTACACATGGAG		
<i>Clostridia IV (C. leptum-F. praustnitzii)</i>	<i>Clostridium leptum</i>	F: TTAACACAATAAGTWATCCACCTGG	60	Ramirez-Farias <i>et al.</i> , 2009
	DSMZ735	R: ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC		
Bacterias totales	<i>Escherichia coli</i>	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	50	Kullen <i>et al.</i> , 2000
	LMG2092	R: GGCTGCTGGCACGTAGTTAG		

*Tf: Temperatura de fusión (°C)

5.3.2.6. *Análisis de catabolitos fenólicos microbianos mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas con ionización por electrospray (UPLC-ESI-MS/MS).*

El análisis de catabolitos fenólicos microbianos en heces, orina, plasma e hígado se realizó en los grupos controles y en los que tomaron la concentración de 5% de espinacas (NC, NA, HC y HA) mediante UPLC-ESI-MS/MS (Vrhovsek, *et al.*, 2011; Gasperotti *et al.*, 2014). Para la extracción, se tomó 1 g o 1 mL de muestra y se mezcló con 9 mL de metanol al 95% que contenía 0.1 µg/mL de ácido *trans*-cinámico-*d*5 como estándar interno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min en un agitador orbital y luego se centrifugó a 5000 g durante 5 min a 4°C, en una centrífuga SIGMA 3–30 K (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Alemania). El sobrenadante se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, ajustando el volumen a 10 mL con metanol al 95%. Posteriormente, se evaporó una alícuota de 5 mL, que fue reconstituida con 10 mL de 0.01 N de H₂SO₄ en agua y sometiendo a extracción en fase sólida (SPE) utilizando un cartucho Biotage Isolute ENV + (Biotage, Uppsala, Suecia). El extracto se filtró a través de un filtro de 0.22 µm antes de la inyección. Los análisis se realizaron en un sistema Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, EE. UU.) que consta de una bomba binaria, un desgasificador de vacío en línea, un inyector automático y un compartimento de columna. La separación de los compuestos fenólicos se logró en una columna Waters Acquity HSS T3 (1.8 µm, 100 mm x 2.1 mm), mantenida a 40°C. Se utilizaron fases móviles de ácido fórmico al 0.1% en agua Milli-Q (A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (B). El flujo fue de 0.4 mL/min, y el perfil del gradiente fue de 0 min, 5% B; de 0 a 3 minutos, un gradiente lineal a 20% B; de 3 a 4.3 min, isocrático 20% B; de 4.3 a 9 min, un gradiente lineal a 45% B; de 9 a 11 min, un gradiente lineal hasta el 100% de B; de 11 a 13 min, un lavado al 100% de B; de 13.01 a 15 min, volviendo a las condiciones

iniciales de 5% B. El volumen de inyección fue de 10 μ L. Todos los metabolitos analizados se eluyeron en 11 minutos, con un tiempo de ejecución total y un equilibrio de columna de 17 minutos. El sistema MS utilizado fue un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple Waters Xevo TQ (Milford, Massachusetts, EE. UU.), junto con una interfaz de electrospray y una opción de cambio de polaridad durante la adquisición. Para optimizar la detección, cada metabolito se infundió directamente en el sistema MS en modo combinado con 50/50 v/v de los disolventes A y B. Las condiciones de las características MS se optimizaron automáticamente usando un Waters Acquity IntelliStart (Milford, Massachusetts, EE. UU.), optimizando el modo de ionización, energía de voltios de cono y energía de colisión. Los dos fragmentos más abundantes se seleccionaron para cada metabolito para establecer un método cuantitativo MRM (monitoreo de reacción múltiple). La primera transición, correspondiente al fragmento más abundante, se usó como el ion cuantificador, y la segunda como el ion calificador.

5.3.2.7. *Parámetros bioquímicos de plasma e índices de resistencia a la insulina [Log (HOMA-IR)] y sensibilidad a la insulina [QUICKI]*

La glucosa, la insulina, el colesterol total, el colesterol HDL, el colesterol LDL, el colesterol VLDL y los triglicéridos totales (TG) se analizaron en muestras de plasma utilizando un analizador automático (AU 600 Olympus Life, Alemania) en el Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia. El logaritmo del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina [Log (HOMA-IR)] fue calculado utilizando la fórmula: $\log [(insulina \text{ en ayunas } (\mu U/mL) \times glucosa \text{ en ayunas } (mmol/L)) / 22.5]$. Se calculó el índice de verificación de la sensibilidad cuantitativa a la insulina (QUICKI) utilizando la fórmula: $1 / [\log(insulina \text{ en ayunas } \mu U/mL) + \log(glucosa \text{ en ayunas } mmol/L)]$ (Chen *et al.*, 2005).

5.3.2.8. *Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico IBM SPSS versión 24.0. Se utilizaron un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para la comparación por pares para determinar las diferencias significativas en las variables analizadas en función de la dieta consumida. Las relaciones entre las variables se examinaron utilizando los coeficientes de correlación de Pearson. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5.3.3. Resultados

5.3.3.1. *Ingesta diaria de nutrientes y compuestos fenólicos.*

Como se puede ver en la **Tabla 5.3.3**, la ingesta de alimentos, energía, proteínas y carbohidratos no difirió significativamente entre los grupos experimentales. En comparación con las ratas alimentadas con la dieta normal (NC, NB, NA), en ratas alimentadas con la dieta alta en grasa (HC, HB, HA), la ingesta de grasa fue significativamente mayor (4.3 veces) y menor el consumo de fibra (2.2 veces más bajo) y fenólicos totales (10.5 veces más bajo). Sin embargo, dentro de los grupos experimentales NC, NB, NA y HC, HB, HA el consumo diario de fibra dietética y compuestos fenólicos no difirió a pesar de la suplementación con espinacas, ya que el aporte mayor de estos compuestos se debe a los otros ingredientes utilizados en la formulación de la dieta. El tipo de dieta –normal vs alta en grasa– no tuvo efecto en la ingesta de carotenoides, que fue determinado por la cantidad (%) de espinacas agregadas a la dieta. Es decir, la ingesta de carotenoides mostró dependencia de la dosis; por lo tanto, se observaron ingestas significativamente mayores para los grupos NA y HA, cuyas dietas se complementaron con un 5% de espinacas.

Table 5.3.3. Ingesta diaria de alimentos, energía, macronutrientes, fibra dietética, fenólicos totales y carotenoides totales.

Ingesta diaria de nutrientes	NC	NB	NA	HC	HB	HA
Alimento (g)	13.5±3.8 ^a	8.7±3.7 ^a	10.5±2.9 ^a	9.4±4.3 ^a	10.1±4.6 ^a	7.4±4.1 ^a
Energía (kcal)	26.0±10.6 ^a	19.8±6.6 ^a	20.7±11.2 ^a	32.5±9.4 ^a	34.3±11.8 ^a	25.6±8.3 ^a
Proteína (g)	1.3±0.5 ^a	1.0±0.3 ^a	1.1±0.6 ^a	1.3±0.4 ^a	1.4±0.5 ^a	1.1±0.3 ^a
Carbohidratos (g)	4.3±1.7 ^a	3.2±1.1 ^a	3.3±1.8 ^a	3.4±1.0 ^a	3.2±1.1 ^a	2.5±0.8 ^a
Grasa (g)	0.4±0.1 ^b	0.3±0.1 ^b	0.3±0.2 ^b	1.5±0.4 ^a	1.6±0.6 ^a	1.2±0.4 ^a
Colesterol (mg)	-	-	-	90.3±26.1 ^a	95.7±32.8 ^a	69.7±22.7 ^a
Fibra dietética (g)	1.9±0.8 ^a	1.4±0.5 ^{abc}	1.6±0.9 ^{ab}	0.5±0.1 ^d	1.0±0.3 ^{bcd}	0.7±0.2 ^{cd}
Fenólicos totales (mg GAE)	16.9±6.9 ^a	13.0±4.4 ^a	14.1±7.6 ^a	1.4±0.4 ^b	1.6±0.6 ^b	1.3±0.4 ^b
Carotenoides totales (µg)	-	20.6±6.9 ^b	55.5±35.4 ^a	-	23.9±8.2 ^b	53.2±17.3 ^a

^{a-c} Diferentes letras en superíndice dentro de la misma fila muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); ANOVA.

5.3.3.2. Efecto en la producción de microbiota y AGCC

Como se muestra en la **Tabla 5.3.4**, la ingesta de la dieta alta en grasa redujo significativamente la cantidad de *Lactobacillus* (-18%), *Bifidobacterium* (-5%) y, en menor medida la cantidad de *Clostridia* y *Bacteroides*. No se observaron cambios estadísticamente significativos para *Enterococcaceae* u otros grupos. La ingesta de espinacas incrementó débilmente los recuentos (+2%) de *Bifidobacterium* en ratas alimentadas con una dieta normal o alta en grasa, mientras que el aumento de *Lactobacillus* fue del 9% en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa suplementada con espinacas.

En general, la ingesta de la dieta alta en grasa llevó a reducir la producción de AGCC en comparación con la dieta normal, por lo que al comparar los grupos control (NC vs HC), las reducciones observadas fueron 66% para acetato, 45% para propionato, 46% para butirato y 78% para otros AGCC (suma de ácidos grasos minoritarios como el isobutirato, isovalerato, valerato y caproato). En ratas alimentadas con la dieta normal, la ingesta de espinacas redujo aún más la producción de acetato, de una manera dependiente de la dosis, logrando una significación estadística en el grupo de NA en comparación con NC (-33%), mientras que el comportamiento inverso se observó al consumir la dieta alta en grasa enriquecida con espinacas (la producción de acetato aumentó en un 44%). El consumo tanto de la dieta normal o alta en grasas suplementada con espinacas dio como resultado un aumento en la producción de propionato, aunque los cambios solo fueron estadísticamente significativos en el caso de la dieta normal (grupos NB y NA).

Como se ilustra en la **Figura 5.3.3**, el ratio Ac:Pr fue 46% más alta en ratas HC en comparación con ratas NC. En ratas alimentadas con la dieta normal, la ingesta de espinacas redujo significativamente el ratio Ac:Pr, en 44 y 54% en los grupos NB y NA,

respectivamente. Por el contrario, en ratas alimentadas con la dieta alta en grasa, el ratio Ac:Pr se mantuvo sin cambios, independientemente de la suplementación con espinacas.

Table 5.3.4. Composición de la microbiota (\log_{10} cells/g) y concentraciones de AGCC (mmol/g) en el contenido intestinal.

Grupo de estudio	NC	NB	NA	HC	HB	HA
Grupos bacterianos						
<i>Bacteroides</i>	11.3±0.1 ^a	11.3±0.1 ^a	11.4±0.1 ^a	11.0±0.3 ^b	11.2±0.2 ^{ab}	11.3±0.2 ^{ab}
<i>Bifidobacterium</i>	8.3±0.2 ^{ab}	8.5±0.1 ^a	8.5±0.1 ^a	7.9±0.3 ^c	8.0±0.2 ^{bc}	8.1±0.2 ^{bc}
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.6±0.6 ^{ab}	8.5±0.9 ^b	8.5±0.7 ^b	8.9±0.4 ^{ab}	9.0±0.5 ^{ab}	9.5±0.5 ^a
<i>Enterococcaceae</i>	6.7±0.3 ^a	6.4±0.4 ^a	6.9±0.5 ^a	6.6±0.3 ^a	6.6±0.2 ^a	6.7±0.4 ^a
<i>Lactobacillus</i>	9.8±0.1 ^a	9.3±0.3 ^{ab}	9.6±0.3 ^a	8.0±1.1 ^c	8.6±0.6 ^{bc}	8.8±0.7 ^{abc}
<i>Clostridia</i>	10.6±0.1 ^a	10.6±0.1 ^a	10.6±0.1 ^a	10.0±0.2 ^b	10.1±0.1 ^b	10.1±0.4 ^b
Bacterias totales	8.9±0.2 ^{ab}	8.9±0.2 ^{ab}	9.0±0.4 ^a	8.5±0.4 ^b	8.7±0.2 ^{ab}	8.8±0.4 ^{ab}
AGCC						
Acetato	96.7±6.7 ^a	85.5±8.8 ^a	64.2±9.9 ^b	32.7±7.0 ^d	42.7±4.4 ^{cd}	47.2±7.0 ^c
Propionato	7.2±1.6 ^b	11.5±2.8 ^a	10.2±2.5 ^a	1.6±0.2 ^c	2.2±0.5 ^c	2.2±0.2 ^c
Butirato	2.5±0.8 ^{abc}	5.5±4.4 ^a	4.8±3.2 ^{ab}	1.4±0.3 ^{abc}	0.6±0.1 ^c	0.8±0.2 ^{bc}
Otros AGCC	4.3±0.7 ^b	7.3±2.2 ^a	6.3±3.2 ^{ab}	1.0±0.2 ^c	1.2±0.3 ^c	1.0±0.3 ^c

^{a-d} Las letras en superíndice diferentes dentro de la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); ANOVA.

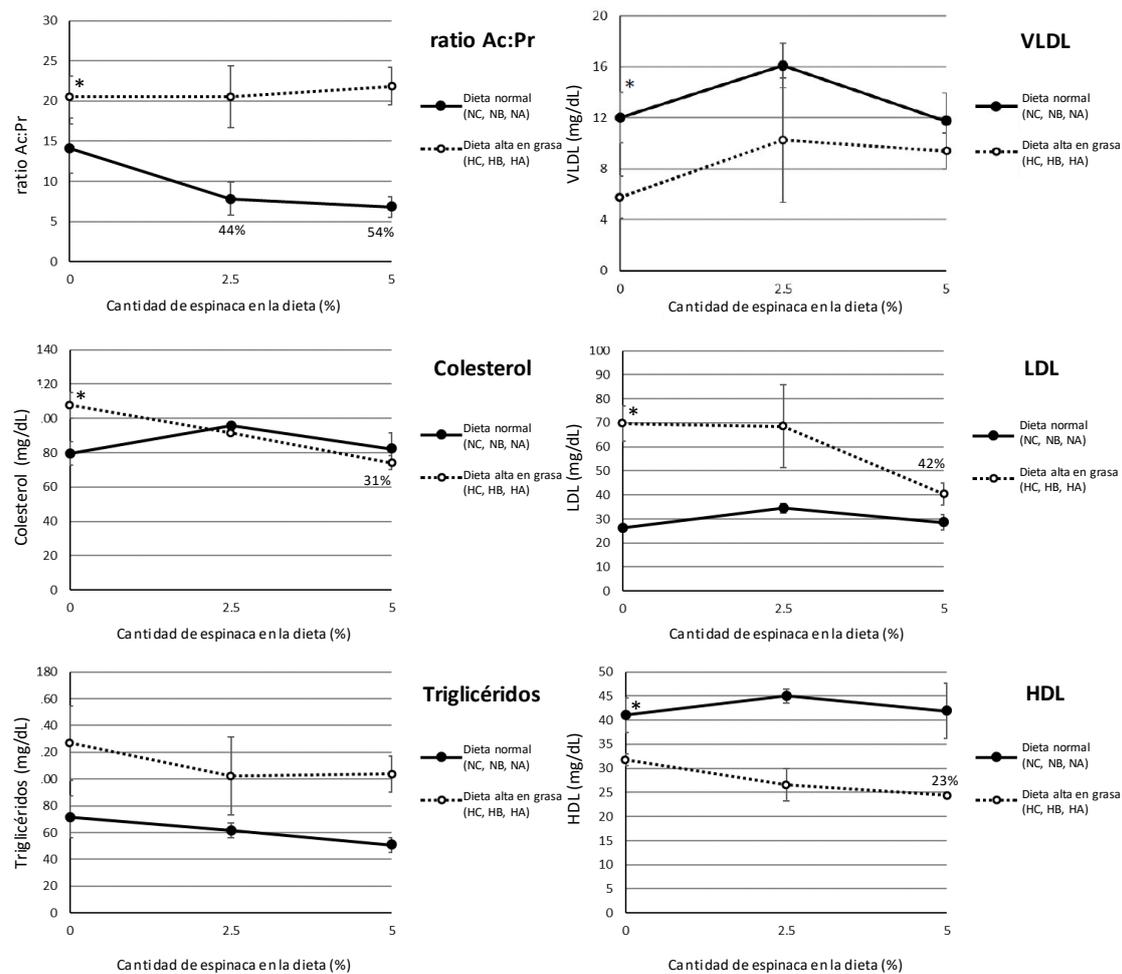


Figura 5.3.3. Cambios en el ratio de acetato a propionato (Ac:Pr) y lípidos plasmáticos. Los cambios estadísticamente significativos (%) se indican en los gráficos ($p < 0.05$). * Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre NC y HC.

5.3.3.3. Catabolitos fenólicos microbianos

En general, la producción de catabolitos fenólicos microbianos fecales (**Tabla 5.3.5**) se redujo en ratas que consumieron la dieta alta en grasa, aunque en ratas alimentadas con la dieta alta en grasa suplementada con 5% de espinaca (HA), se observó una tendencia general, aumentando las concentraciones fecales de catabolitos fenólicos, aunque sin significación estadística para el ácido *p*-cumárico. Los catabolitos fenólicos principales identificados en las heces fueron el ácido 3-(3-hidroxifenil) propanoico, el ácido *trans*-ferúlico y el ácido hidroferúlico. Las mayores variaciones en la concentración

media entre los grupos NC/NA y HC/HA se observaron para el ácido sinápico (15 veces), ácido hidroferúlico (13 veces) y ácido transferúlico (12 veces). A la inversa, las concentraciones fecales de ácido 4-hidroxibenzoico y ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico fueron mayores en los grupos HC/HA que en NC/NA. Todos los catabolitos fenólicos fecales también fueron detectados en la orina (**Tabla 5.3.6**), donde se encontraron las concentraciones más altas de ácido 3-(3-hidroxifenil) propanoico, ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, ácido *trans*-ferúlico y ácido hidroférulico. Nuevamente, las mayores variaciones en la concentración media entre los grupos NC/NA y HC/HA se observaron para el ácido sinápico (6 veces), ácido hidroferúlico (6 veces) y ácido *trans*-ferúlico (3 veces). Según lo observado para las heces, las concentraciones de ácido 4-hidroxibenzoico fue mayor en los grupos de HC/HA que en NC/NA. El único catabolito identificado en plasma fue el ácido 4-hidroxibenzoico, mientras que el ácido 4-hidroxibenzoico, el ácido vanílico y el ácido cafeico se detectaron en el hígado (**Tabla 5.3.7**).

Tabla 5.3.5. Concentraciones de catabolitos fenólicos en heces ($\mu\text{g/g}$).

Grupo de estudio/metabolito	NC	NA	HC	HA
Pirogalol	10.8 \pm 5.5 ^a	9.2 \pm 3.9 ^a	9.2 \pm 2.2 ^a	11.3 \pm 3.6 ^a
Ácido 4-hidroxibenzoico	10.1 \pm 4.7 ^{ab}	2.7 \pm 0.9 ^b	13.8 \pm 4.3 ^{ab}	22.4 \pm 9.8 ^a
Ácido <i>p</i> -Cumárico	5.2 \pm 2.1 ^a	1.8 \pm 0.5 ^{bc}	0.2 \pm 0.1 ^c	2.9 \pm 1.2 ^{ab}
Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico	16.0 \pm 8.5 ^{ab}	3.1 \pm 1.3 ^b	45.5 \pm 5.0 ^a	52.3 \pm 3.7 ^a
Ácido 3-(3-hidroxifenil) propanoico	356.5 \pm 87.8 ^a	225.0 \pm 134.5 ^{ab}	76.2 \pm 21.2 ^b	251.5 \pm 63.1 ^{ab}
Ácido vaníllico	13.6 \pm 5.4 ^a	2.2 \pm 1.0 ^b	0.4 \pm 0.1 ^b	1.4 \pm 0.3 ^b
Ácido cafeico	1.0 \pm 0.2 ^a	0.5 \pm 0.4 ^{ab}	0.02 \pm 0.01 ^b	0.2 \pm 0.09 ^b
Ácido <i>trans</i> -ferúlico	186.3 \pm 38.4 ^a	73.4 \pm 39.2 ^b	0.60 \pm 0.4 ^c	21.8 \pm 12.1 ^{bc}
Ácido hidroferúlico	64.5 \pm 54.9 ^a	25.2 \pm 30.5 ^{ab}	1.5 \pm 0.1 ^b	5.4 \pm 2.6 ^{ab}
Ácido sinápico	10.3 \pm 5.0 ^a	4.8 \pm 1.8 ^b	0.3 \pm 0.02 ^b	0.7 \pm 0.5 ^b
Ácido protocatechuico	2.9 \pm 0.7 ^a	1.3 \pm 0.7 ^a	1.6 \pm 2.6 ^a	3.0 \pm 0.9 ^a
Catabolitos totales	677.2 \pm 213.2 ^a	348.9 \pm 214.8 ^{ab}	149.3 \pm 37.0 ^b	372.6 \pm 98.3 ^{ab}

^{a-c} Las diferentes letras en superíndice dentro de la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); ANOVA.

Tabla 5.3.6. Concentraciones de metabolitos polifenólicos en orina ($\mu\text{g/mg}$ creatinina) y plasma ($\mu\text{g/mL}$).

Grupo de estudio/metabolito	NC	NA	HC	HA
<i>Orina</i>				
Pirogalol	1.2 \pm 0.8 ^a	2.1 \pm 1.0 ^a	1.4 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.79 ^a
Ácido 4-hidroxibenzoico	2.0 \pm 1.2 ^b	2.5 \pm 1.1 ^{ab}	4.5 \pm 2.2 ^{ab}	4.7 \pm 2.2 ^a
Ácido <i>p</i> -Cumárico	1.3 \pm 0.9 ^a	1.7 \pm 1.7 ^a	0.5 \pm 0.3 ^a	0.7 \pm 0.4 ^a
Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico	9.1 \pm 7.0 ^a	8.9 \pm 2.3 ^a	6.1 \pm 1.9 ^a	6.4 \pm 3.2 ^a
Ácido 3-(3-hidroxifenil) propanoico	63.9 \pm 25.2 ^a	60.2 \pm 20.3 ^a	14.3 \pm 14.5 ^b	21.6 \pm 14.8 ^b
Ácido vaníllico	1.1 \pm 0.5 ^a	1.1 \pm 0.4 ^a	0.3 \pm 0.2 ^b	0.23 \pm 0.2 ^b
Ácido cafeico	0.3 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.2 ^a	0.2 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.1 ^a
Ácido <i>trans</i> -ferúlico	6.3 \pm 4.2 ^{ab}	12.1 \pm 6.1 ^a	3.1 \pm 3.3 ^b	2.8 \pm 2.4 ^b
Ácido hidroferúlico	7.4 \pm 5.1 ^a	7.0 \pm 3.8 ^a	1.3 \pm 1.9 ^b	0.9 \pm 0.8 ^b
Ácido sinápico	0.5 \pm 0.5 ^a	0.5 \pm 0.2 ^a	nd	0.2 \pm 0.1 ^a
Ácido protocatechuico	0.2 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.3 ^a	0.1 \pm 0.08 ^a	0.11 \pm 0.10 ^a
Catabolitos totales	93.3 \pm 45.5 ^a	96.3 \pm 37.4 ^a	31.3 \pm 24.9 ^b	39.7 \pm 25.0 ^b
<i>Plasma</i>				
Ácido 4-hidroxibenzoico	153.2 \pm 78.4 ^{ab}	165.5 \pm 72.1 ^a	24.8 \pm 1.2 ^b	47.5 \pm 21.7 ^{ab}

^{a-c} Las diferentes letras en superíndice dentro de la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); ANOVA. nd; no detectado

Table 5.3.7. Concentraciones de colesterol (mg/g), carotenoides ($\mu\text{g/g}$) y metabolitos polifenólicos ($\mu\text{g/g}$) in hígado

Grupo de estudio/metabolito	NC	NA	HC	HA
Colesterol*	2.24±0.46 ^b	1.93±0.45 ^b	73.83±10.38 ^a	2.33±0.50 ^b
Luteína**	nd	nd	nd	0.03±0.06
α -caroteno	nd	nd	nd	0.15±0.10
β -caroteno	nd	0.20±0.09 ^b	nd	1.28±0.47 ^a
Carotenoides totales	nd	0.20±0.09 ^b	nd	1.45±0.51 ^a
Ácido 4-hydroxybenzoic	1.62±1.07 ^a	0.28±0.26 ^a	1.75±0.92 ^a	4.44±4.67 ^a
Ácido vanillic	0.13±0.16 ^a	0.32±0.34 ^a	0.13±0.02 ^a	0.05±0.06 ^a
Ácido cafeico	0.12±0.09 ^a	0.36±0.29 ^a	0.16±0.05 ^a	0.27±0.14 ^a

^{a-c} Las diferentes letras en superíndice dentro de la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); ANOVA. nd; no detectado. *El colesterol hepático se extrajo con un kit de extracción de colesterol Sigma Aldrich (MAK175) y se analizó por GC-FID (Martín-Pozuelo *et al.*, 2015). **Los carotenoides hepáticos (luteína, α -caroteno and β -caroteno) se analizaron por HPLC (Seybold *et al.*, 2004).

5.3.3.4. *Parámetros bioquímicos e índices de resistencia/sensibilidad a la insulina.*

Como se ilustra en la **Figura 5.3.3**, el consumo de la dieta alta en grasa empeoró el perfil de lípidos en plasma, al aumentar los triglicéridos, el colesterol total y el colesterol LDL, y al reducir el colesterol HDL. La ingesta de espinacas (5%) mejoró el perfil lipídico al reducir significativamente el colesterol total, LDL y triglicéridos (no significativamente). Los niveles de VLDL fueron más altos en ratas alimentadas con la dieta normal, pero no se observaron cambios significativos para VLDL a lo largo del estudio. Sin embargo, a pesar de esta mejora general del perfil lipídico, la HDL continuó disminuyendo.

Como se muestra en la **Figura 5.3.4**, la glucosa en ayunas fue mayor en ratas alimentadas con la dieta alta en grasa, y la intervención dietética con espinacas redujo significativamente sus niveles de una manera dependiente de la dosis. Una tendencia similar se observó en ratas alimentadas con la dieta normal, aunque los cambios no fueron

estadísticamente significativos. Ni el tipo de dieta (normal vs alto en grasa) ni la ingesta de espinacas tuvieron un impacto estadísticamente significativo en los índices de resistencia a la insulina [Log (HOMA-IR)] o sensibilidad a la insulina [QUICKI]. Esto indica que la homeostasis de la insulina no se alteró mucho a pesar del inicio de la EHGNA.

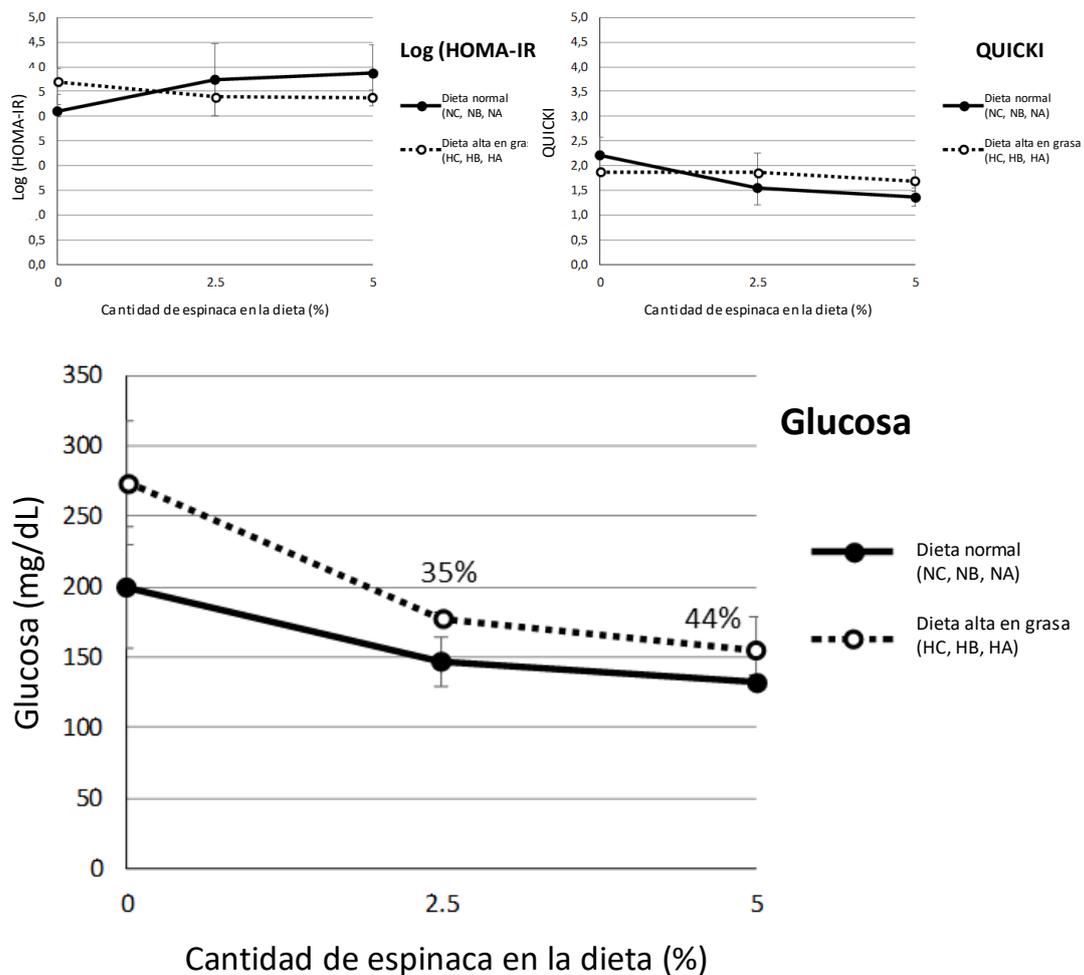


Figura 5.3.4. Cambios en la glucosa en ayunas y los índices de resistencia a la insulina/índices de sensibilidad.

5.3.3.5. Estudio de correlación entre las variables analizadas

La ingesta de fibra mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa con la cantidad de *Lactobacillus* ($r = 0.95$; $p = 0.015$) y acetato ($r = 0.85$; $p = 0.030$)

analizado en las heces. Por otro lado, la ingesta de compuestos fenólicos mostró correlaciones significativas con diferentes parámetros. Entre ellos destacan las correlaciones positivas con *Lactobacillus* ($r = 0.91$; $p = 0.011$), *Bifidobacterium* ($r = 0.86$; $p = 0.027$), acetato ($r = 0.92$; $p = 0.010$) y propionato ($r = 0.88$; $p = 0.022$), y las correlaciones negativas con *Enterobacteriaceae* ($r = -0.82$; $p = 0.044$) y el ratio Ac:Pr ($r = -0.85$; $p = 0.031$). Además, observamos que el ratio Ac:Pr se correlacionó positivamente con la glucosa plasmática ($r = 0.999$; $p = 0.030$) y los triglicéridos (aunque en este caso no fue significativa para $p < 0.05$); por lo tanto, cuanto más baja es el ratio Ac:Pr, más bajos serán las concentraciones plasmáticas de glucosa y triglicéridos. También, se encontraron correlaciones negativas entre la glucosa plasmática y *Lactobacillus* ($R = -0.999$; $p = 0.032$) y *Bifidobacterium* (aunque no fueron estadísticamente significativa para $p < 0.05$), observando relaciones inversas entre *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con los triglicéridos, colesterol total y LDL.

5.3.4. Discusión

En general, el consumo de la dieta alta en grasa causó esteatosis hepática, alteró el perfil de lípidos en plasma, aumentó la glucosa en ayunas y afectó la microbiota, reduciendo la abundancia de grupos bacterianos beneficiosos tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La alteración de la microbiota se combinó con una menor producción de catabolitos fenólicos microbianos y AGCC y un aumento del ratio Ac:Pr. Tales alteraciones están de acuerdo con estudios previos realizados en animales, debido a la combinación de ingestas más altas de grasas saturadas y azúcares simples e ingestas más bajas de fibra y compuestos fenólicos (Jakobsdottir *et al.*, 2013; Lam *et al.*, 2012; García-Alonso *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2013; Nihei *et al.*, 2018).

5.3.4.1. Cambios en la composición de la microbiota y concentraciones de AGCC

Está bien establecido que las dietas ricas en grasas alteran la composición de la microbiota intestinal al aumentar la proporción de Firmicutes a Bacteroidetes y al inducir una disminución general de la diversidad bacteriana. Además, la calidad de los ácidos grasos en la dieta afecta a las alteraciones de la microbiota intestinal, como se ha informado en un estudio con roedores en el que las dietas ricas en grasas saturadas, en particular aquellas formuladas con grasa láctea como la que usamos en el presente estudio— tuvo un impacto negativo en la proporción de Firmicutes a Bacteroidetes (Huang *et al.*, 2013). Similarmente, un estudio *in vitro* mostró que las grasas ricas en los ácidos grasos saturados (aceite de mantequilla) redujeron el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* mientras que los más ricos en ácidos grasos insaturados (linaza, oliva, hígado de bacalao y aceite de colza) promovieron su crecimiento (Partanen *et al.*, 2001). Sin embargo, el mecanismo por el cual los diferentes tipos de ácidos grasos modulan la microbiota intestinal todavía no ha sido estudiado en profundidad. Se propone que los ácidos grasos pueden actuar en la membrana celular, interferir con la producción de energía, inhibir las actividades enzimáticas, perjudicar la absorción de nutrientes y generar compuestos tóxicos para las células, lo que lleva a la inhibición del crecimiento o incluso a la muerte bacteriana (Coelho *et al.*, 2018).

En ratas que consumieron la dieta normal (NB/NA), la ingesta de espinacas mejoró el patrón de AGCC, ya que el ratio Ac:Pr disminuyó significativamente a través de la reducción de acetato y mejoró de la producción de propionato. Esto se considera un efecto positivo ya que un menor ratio Ac:Pr es preferible, porque puede reducir los niveles de lípidos plasmáticos, reduciendo el riesgo de enfermedad cardiovascular. Los AGCC tienen un efecto metabólico importante, ya que provocan efectos sobre la glucosa y el metabolismo de los lípidos. En el hígado, el destino del acetato es la lipogénesis *de novo*

y colesterogénesis, aunque se ha informado que el propionato inhibe la síntesis de colesterol, reduce la grasa visceral y hepática y tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa. El butirato también se ha estudiado por su papel en la nutrición de la mucosa colónica y la prevención del cáncer de colon, así como por su posible implicación en el metabolismo de los lípidos, mediante la regulación y desaceleración del transporte de grasa desde el intestino (Wong *et al.*, 2006; Jakobsdottir *et al.*, 2013; Morrison y Preston, 2016).

La mejora observada en el perfil de AGCC no se puede explicar completamente por los débiles cambios en la microbiota o por marcadas diferencias en el consumo de fibra y/o compuestos fenólicos. Tampoco puede atribuirse a la ingesta de carotenoides, cuyo efecto sobre las bacterias intestinales se considera insignificante (Bohn *et al.*, 2015). En este contexto, los estudios *in vitro* han demostrado que los cambios en el patrón de AGCC no siempre están acompañados por modificaciones profundas de la microbiota, incluso en condiciones experimentales que involucran la presencia de fibra (Sasaki *et al.*, 2018). De manera similar, los resultados son variados, ya sea que aumentan o disminuyen, con respecto a la producción de AGCC se ha observado en estudios en humanos el impacto del consumo de fibra o prebióticos en la composición y función de la microbiota gastrointestinal humana (Holscher, 2017).

En ratas alimentadas con la dieta alta en grasa (HB/HA), la suplementación con espinacas no pudo evitar el aumento de la acumulación de grasa en el hígado, pero mejoró parcialmente algunas alteraciones metabólicas inducidas por esta dieta. Se sabe que tanto *Bifidobacterium* como *Lactobacillus* podrían atenuar de manera diferente las comorbilidades de la obesidad inducidas por una dieta alta en grasa (por ejemplo, al disminuir la glucemia, la insulina o la esteatosis hepática), en parte debido a los efectos específicos de la cepa en los filotipos relacionados con el síndrome metabólico de la

microbiota intestinal (Wang *et al.*, 2015). En línea con esto, se informó que la suplementación con 5% de espinaca condujo a una mejora en el estado antioxidante y una leve disminución de los triglicéridos plasmáticos para las ratas que consumen una dieta rica en grasas y colesterol (Ko *et al.*, 2014). Al contrario de lo que se observó en ratas que consumían la dieta normal, la ingesta de una dieta rica en espinacas y grasas aumentó la producción de acetato, pero no redujo el ratio Ac:Pr, debido quizás al fuerte efecto de la dieta grasa sobre la microbiota. Sin embargo, en el contexto de la EHGNA, este aumento de la producción de acetato podría interpretarse como positivo, ya que el acetato se ha relacionado con la supresión de la lipólisis de los adipocitos, reduciendo así el flujo de ácidos grasos libres al hígado y mitigando el deterioro de la homeostasis de la glucosa inducido por el hígado (Morrison y Preston, 2016). Esto es consistente con la reducción observada en el colesterol total, LDL y triglicéridos en plasma y, lo que es más importante, con la reducción dependiente de la dosis de los niveles de glucosa en ayunas que denota mejor homeostasis de la glucosa en grupos HB y HA.

Por lo tanto, surge la pregunta de qué fitoconstituyentes de la espinaca son responsables de los efectos observados. Como se ha mencionado anteriormente, las ingestas de fibra y compuestos fenólicos por sí solos no pueden explicar los cambios observados en la microbiota y en el contenido de los AGCC, pero otros componentes de las células vegetales como los tilacoides de las espinacas, pueden modular la microbiota al aumentar el contenido de *Lactobacillus* y mejorar la tolerancia a la glucosa (Montelius *et al.*, 2013), aunque, el mecanismo de acción es desconocido. Así, estos autores propusieron dos explicaciones posibles. Una es que los tilacoides influyen en el crecimiento de las bacterias en el intestino directamente a nivel molecular; mientras que la otra explicación hace referencia a un efecto indirecto de los tilacoides, por lo que una reducción en el apetito y la ingesta de alimentos puede afectar la composición bacteriana

en el intestino (Montelius *et al.*, 2013). Por lo tanto, suponemos que la presencia de tilacoides intactos en las dietas experimentales puede haber contribuido a los cambios observados en la microbiota y, a su vez, a las reducciones que hemos observado en la glucosa y los lípidos en plasma.

5.3.4.2. *Efecto en la producción de catabolitos fenólicos microbianos*

Los productos de la metabolización bacteriana de la fibra (AGCC) y de los compuestos fenólicos que se forman como resultados de la actividad microbiana en el colon, son absorbidos y pueden desempeñar un papel importante en el metabolismo. En este sentido, el ácido 4-hidroxibenzoico que es un catabolito fenólico de origen microbiano, se incrementó en el plasma y el hígado de las ratas que consumieron la dieta alta en grasa con un 5% de espinacas (**Tabla 5.3.6** y **Tabla 5.3.7**). Se ha demostrado que este compuesto tiene un efecto hipoglucemiante después de la administración oral a ratas diabéticas, posiblemente mediado por un aumento en el consumo de glucosa periférica (Peungvicha *et al.*, 1998a; Peungvicha *et al.*, 1998b). Además, el ácido 4-hidroxibenzoico se ha informado que disminuye los valores de colesterol total en plasma, triglicéridos y colesterol hepático en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol (Jeon *et al.*, 2007). Es interesante observar que en nuestro estudio observamos una marcada reducción del colesterol hepático en ratas que consumieron una dieta alta en grasa con un 5% de espinacas, acompañada de una acumulación en el hígado de ácido 4-hidroxibenzoico y carotenoides, principalmente β -caroteno. Este resultado notablemente positivo podría surgir de los efectos combinados del ácido 4-hidroxibenzoico, derivado del metabolismo bacteriano intestinal, que, como se mencionó anteriormente, es capaz de reducir el colesterol hepático (Jeon *et al.*, 2007), a la vez que los carotenoides pueden mostrar efectos hipocolesterolémicos a través de un mecanismo que involucra la inhibición de la

síntesis de colesterol en el hígado (Fuhrman *et al.*, 1997). Otros estudios en roedores que incluyen carotenoides y alimentos ricos en carotenoides respaldaron su capacidad para disminuir el colesterol y mejorar el perfil de lípidos en el plasma (Nicolle *et al.*, 2004; Navarro-González *et al.*, 2014; Piña-Zentella *et al.*, 2016; Panda *et al.*, 2017). Por lo tanto, estos dos compuestos antioxidantes, cuando se acumulan en el hígado, podrían ejercer una acción sinérgica contra la EHGNA.

Por último, pero no menos importante, otros antioxidantes naturales presentes en las espinacas pueden haber contribuido a los efectos informados en este documento. La fracción de antioxidantes naturales se compone principalmente de polifenoles aromáticos, incluidos los derivados del ácido *p*-cumárico, flavonoides y otras moléculas hidrófilas, y se ha informado que mejora la tolerancia a la glucosa, los lípidos en la sangre y el estado antioxidante (Roberts y Moreau, 2016; Panda *et al.*, 2017). Además, las clorofilas se han relacionado con los efectos hipolipemiantes tras el consumo de espinacas (Roberts y Moreau, 2016), y otros compuestos derivados de las mismas, como el fenilpropanoide aurapteno oxipenilado, deben considerarse en el futuro por su posible papel en la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Fiorito *et al.*, 2019; de Medina *et al.*, 2010; Genovese *et al.*, 2017).

REFERENCIAS

- Anson NM, Havenaar R, Vaes W, Coulier L, Venema K, Selinheimo E, *et al.* Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production in vitro and postprandial plasma concentrations in men. *Food Chem.* 2011; 128(2): 404–409.
- Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(44): 16452–16463.
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo MET. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(6): 3575–3581.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M, Periago MJ. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr. Biochem.* 2013; 24(11): 1870–1881.
- Bohn T, McDougall GJ, Alegría A, Alminger M, Arrigoni E, Aura AM, *et al.* Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites--a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015; 59(7): 1307–1323.
- Cao Y, Wang C, Liu J, Liu M Z, Ling WH, Cheng YM. Greater serum carotenoid levels associated with lower prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults. *Sci. Rep.* 2015; 5: 12951.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr. Biochem.* 2013; 24(8): 1415–1422.
- Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol. Pharmacother.* 2013; 4(4): 303–306.
- Chen H, Sullivan G, Quon MJ. Assessing the predictive accuracy of QUICKI as a surrogate index for insulin sensitivity using a calibration model. *Diabetes.* 2005; 54(7): 1914–1925.
- Coelho OGL, Cândido FG, Alfenas RCG. Dietary fat and gut microbiota: mechanisms involved in obesity control. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018; 31: 1–9.
- de Faria Ghetti F, Oliveira DG, de Oliveira JM, de Castro Ferreira LEVV, Cesar DE, Moreira ABP. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Eur. J Nutr.* 2018; 57(3), 861–876.
- de Medina P, Genovese S, Paillasse MR, Mazaheri M, Caze-Subra S, Bystricky K, *et al.* Auraptene is an inhibitor of cholesterol esterification and a modulator of estrogen receptors. *Mol Pharmacol.* 2010, 78, 827–836.
- Endo H, Niioka M, Kobayashi N, Tanaka M, Watanabe T. Butyrate-producing probiotics reduce non-alcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS ONE.* 2013; 8(5): e63388.
- Erlanson-Albertsson C, Albertsson PÅ. The use of green leaf membranes to promote appetite control, suppress hedonic hunger and loose body weight. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2015; 70(3): 281–290.
- Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhan M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am. J Clin. Nutr.* 2014; 99(3): 535–542.

Fiorito S, Preziuso F, Epifano F, Scotti L, Bucciarelli T, Taddeo VA, Genovese S. Novel biologically active principles from spinach, goji and quinoa. *Food Chem.* 2019; 276: 262–265.

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(3): 658–662.

García-Alonso FJ, González-Barrio R, Martín-Pozuelo G, Hidalgo N, Navarro-González I, Masuero D, *et al.* A study of the prebiotic-like effects of tomato juice consumption in rats with diet-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Food Funct.* 2017; 8(10): 3542–3552.

Gasperotti M, Masuero D, Guella G, Mattivi F, Vrhovsek U. Development of a targeted method for twenty-three metabolites related to polyphenol gut microbial metabolism in biological samples, using SPE and UHPLC-ESI-MS/MS. *Talanta.* 2014; 128: 221–230.

Granado FB, Olmedilla I, Blanco E, Rojas-Hidalgo E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J Agric Food Chem.* 1992; 40(11): 2135–2140.

Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(4): 403–410.

Gueimonde M, Tölkö S, Korpimäki T, Salminen S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(7): 4165–4169.

Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific

amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(1): 114–123.

Hirawan R, Diehl-Jones W, Beta T. Comparative evaluation of the antioxidant potential of infant cereals produced from purple wheat and red rice grains and LC-MS analysis of their anthocyanins. *J Agric. Food Chem.* 2011; 59(23): 12330–12341.

Holscher HD1. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2017; 8(2): 172–184.

Huang EY, Leone VA, Devkota S, Wang Y, Brady MJ, Chang EB. Composition of dietary fat source shapes gut microbiota architecture and alters host inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J Parenter Enteral Nutr.* 2013; 37(6): 746–754.

Jakobsdottir G, Xu J, Molin G, Ahrné S, Nyman M. High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PLoS ONE.* 2013; 8(11): e80476.

Jeon SM, Kim HK, Kim HJ, Do GM, Jeong TS, Park YB, Choi MS. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Transl Res.* 2007; 149(1): 15–21.

Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients.* 2015; 7(4): 2839–2849.

Ko SH, Park JH, Kim SY, Lee SW, Chun SS, Park E. Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Prev Nutr Food Sci.* 2014; 19(1): 19–26.

Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl. Microbiol.* 2000; 89(9): 511–516.

- Lam YY, Ha CW, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A, Oscarsson J, *et al.* Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e34233.
- Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 2006; 157(9): 876–884.
- Li BW, Andrews KW, Pehrsson PR. Individual sugars, soluble, and insoluble dietary fiber contents of 70 high consumption foods. *J Food Comp Anal.* 2002; 15(6) 715–723.
- Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ Jr, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, *et al.* Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS ONE*, 2012, 7, e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240
- Martín-Pozuelo G1, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J, Hidalgo N, *et al.* The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur. J Nutr.* 2015; 54(6): 933–944.
- Montelius C, Osman N, Weström B, Ahné S, Molin G, Albertsson PÅ, *et al.* Feeding spinach thylakoids to rats modulates the gut microbiota, decreases food intake and affects the insulin response. *J Nutr. Sci.* 2013; 2: e20.
- Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016; 7(3): 189–200.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progr. Lipid Res.* 2009; 48(1): 1–26.
- 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.
- Nicolle C, Gueux E, Lab C, Jaffrelo L, Rock E, Mazur A, *et al.* Lyophilized carrot ingestion lowers lipemia and beneficially affects cholesterol metabolism in cholesterol-fed C57BL/6J mice. *Eur. J Nutr.* 2004; 43(4): 237–245.
- Nihei N, Okamoto H, Furune T, Ikuta N, Sasaki K, Rimbach G, *et al.* Dietary α -cyclodextrin modifies gut microbiota and reduces fat accumulation in high-fat-diet-fed obese mice. *Biofactors.* 2018; 44: 336–347.
- Panda V, Mistry K, Sudhamani S, Nandave M, Ojha S. Amelioration of abnormalities associated with the metabolic syndrome by *Spinacia oleracea* (Spinach) consumption and aerobic exercise in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 1–15.
- Park JS, Seo JH, Youn HS. Gut microbiota and clinical disease: obesity and nonalcoholic Fatty liver disease. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* 2013; 16(1): 22–27.
- Partanen L1, Marttinen N, Alatosava T. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *System Appl Microbiol.* 2001; 24(4): 500–506.
- Peungvicha P, Tamsiririrkkul R, Prasain JK, Tezuka Y, Kadota S, Thirawarapan SS, Watanabe H. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *J Ethnopharmacol.* 1998; 62(1): 79–84.
- Peungvicha P, Thirawarapan SS, Watanabe H. Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid, a constituent of *Pandanus odoratus* root. *Jpn. J Pharmacol.* 1998; 78(3) 395–398.
- Piña-Zentella RM, Rosado JL, Gallegos-Corona MA, Madrigal-Pérez LA, García OP, Ramos-Gomez M. Lycopene improves diet-mediated recuperation in

rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Food*. 2016; 19(6): 607–614.

Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr*. 2009; 101(4), 541–550.

Raso GM, Simeoli R, Iacono A, Santoro A, Amero P, Paciello O, *et al*. Effects of a *Lactobacillus paracasei* B21060 based symbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr. Biochem*. 2014; 25(1): 81–90.

Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl. Microbiol*. 2004; 97(6): 1166–1177.

Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct*. 2016; 7(8): 3337–3353.

S. Genovese S, Ashida H, Yamashita Y, Nakgano T, Ikeda M, Daishi S, *et al*. The interaction of auroptene and other oxyprenylated phenylpropanoids with glucose transporter type 4. *Phytomedicine*. 2017; 32: 74–79.

Sasaki D, Sasaki K, Ikuta N, Yasuda T, Fukuda I, Kondo A, Osawa R. Low amounts of dietary fibre increase in vitro production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 435.

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(23): 7005–7010.

Stenblom EL, Weström B, Linninge C, Bonn P, Farrell M, Rehfeld JF, Montelius C. Dietary green-plant thylakoids decrease gastric emptying and gut

transit, promote changes in the gut microbial flora, but does not cause steatorrhea. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2016; 13: 67.

Valdés L, Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct*. 2015; 6(8): 2424–2439.

Vrhovsek U, Masuero D, Gasperotti M, Franceschi P, Caputi L, Viola R, Mattivi F. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *J Agric. Food Chem*. 2012; 60(36): 8831–8840.

Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ Microbiol*. 2001; 67(6): 2578–2585.

Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, *et al*. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J*. 2015; 9(1): 1–15.

Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin. Gastroenterol*. 2006; 40(3): 235–243.

5.4. (ESTUDIO 3)

Efecto de la suplementación de la dieta con carotenoides procedentes de espinacas y tomate en el tratamiento de la esteatosis inducida en ratas

5.4.1. Introducción

Los cambios en el estilo de vida han modificado las prioridades de salud a nivel mundial, debido al creciente aumento de enfermedades no transmisibles, frente a las enfermedades transmisibles e infecciosas. Dentro de enfermedades no transmisibles, las enfermedades hepáticas crónicas (EHC) se han convertido en la nueva epidemia de este siglo, siendo una de las más importantes la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), asociado al incremento de la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (Younossi *et al.*, 2016; Calzadilla-Bertot y Adams, 2016). La prevalencia de la EHGNA es en todos los continentes, sin embargo, las tasas más altas se registran en América del Sur (31%), Oriente Medio (32%), Asia (27%), los Estados Unidos (24%) y Europa (23%), siendo menos común en África (Younossi *et al.*, 2016). La EHGNA es la acumulación de grasa excesiva en más del 5% de los hepatocitos sin una ingesta significativa de alcohol (Mencin y Lavine, 2011). Además, esta enfermedad exhibe un espectro histológico, que va desde una esteatosis simple hasta la necroinflamatoria más agresiva, la denominada esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que puede progresar a fibrosis, cirrosis y en última instancia a carcinoma hepatocelular (CHC) (Gao y Bataller, 2011; Calzadilla Bertrot y Adams, 2016). En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en el efecto de la dieta en la prevención de esta enfermedad, existiendo evidencias inequívocas de que el consumo de carotenoides, ingeridos a partir de las de frutas y verduras que forman parte de la dieta, disminuye la prevalencia de EHGNA debido, principalmente, a su potencial para suprimir las especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo (Yilmaz *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2016; Latief y Ahmad, 2018). Los vegetales como las espinacas y tomate son buena fuente de carotenoides dietéticos con valores que pueden llegar a 10.87 y 7.82 mg/100 g de peso fresco, respectivamente (Maiani *et al.*, 2009). Aunque los carotenoides están reconocidos como antioxidantes y son tan potentes como

la vitamina E en la inhibición de la peroxidación lipídica (Rock *et al.*, 1996), la suplementación de carotenoides, como la luteína, zeaxantina, β -caroteno y el licopeno no se han utilizado como un tratamiento antioxidante para pacientes con EHGNA, aunque experimentalmente ya han sido estudiados sus posibles efectos beneficiosos (Bernal *et al.*, 2013; Martín Pozuelo *et al.*, 2015; Elvira-Torales *et al.*, 2018; Matsuura *et al.*, 2016; Elvira-Torales *et al.*, 2019a). La luteína protege contra la acumulación de lípidos hepáticos y la resistencia a la insulina, atenúa la peroxidación de lípidos al disminuir el MDA (malondialdehído) y la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el hígado, además de restaurar la expresión de PPAR que se veía inhibido por una dieta alta en grasa suministrada a cobayos y ratas, desempeñando un papel importante en el metabolismo de lípidos (Kim *et al.*, 2012, Qiu *et al.*, 2015). La administración de zeaxantina en Gerbil de Mongolia disminuye el estrés oxidativo y la fibrosis hepática, relacionando este efecto con su capacidad antioxidante (Chamberlain *et al.*, 2009). La ingesta de alimentos con alto contenido en β -caroteno como las bayas de goji, favorecen la modulación del factor de transcripción NF- κ B, la vía MAPK y el proceso autofágico, mejorando así mismo la fibrosis hepática, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria (Xiao *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los niveles séricos de β -caroteno en pacientes con EHGNA (con signos clínicos de esteatosis hepática, inflamación y fibrosis) fueron significativamente más bajos que en sujetos sanos, por lo que distintos autores han descrito que un mayor consumo de este carotenoide en la dieta obtenido de fuentes alimenticias se asocia con un menor riesgo de padecer cáncer primario de hígado (Lan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Igualmente, el licopeno, al ser un potente antioxidante, su ingesta dietética podría usarse para la quimioprevención de los trastornos relacionados con el estrés oxidativo, incluyendo las enfermedades hepáticas (Latief y Ahmad, 2018). Varias investigaciones realizadas en estudios

epidemiológicos y en animales han demostrado que el licopeno posee capacidades de desintoxicación y de reducir el riesgo de cáncer y de enfermedades cardiovasculares, presentando muy pocos efectos secundarios (Kavanaugh 2007; Pyrayesh-Islamian y Mehrali, 2015; Müller 2016).

En estudios previos realizados en el grupo de investigación y dentro de las tareas de investigación de esta Tesis Doctoral, hemos observado que la suplementación de la dieta con espinacas, en ratas con esteatosis inducida, conduce a una acumulación de α y β -caroteno y luteína en el hígado mostrando una correlación inversa con el colesterol total y la glucosa en suero y el contenido de colesterol hepático. Asimismo, se produjeron cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, principalmente a través de la sobreexpresión de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR), además de regular los genes *FXR* y *HNF4A* que se han propuesto como factores preventivos de la esteatosis (Elvira-Torales, 2019a). Por otro lado, en estudios previos indicamos que la ingesta de zumo de tomate rica en licopeno es un agente terapéutico contra la NAFLD, ya que reduce la acumulación de grasa y la inflamación en el hígado, aumentando la actividad de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal y los niveles de metabolitos relacionados con la respuesta antioxidante, además de regular modulación de genes involucrados en el metabolismo lipídico (Bernal *et al.*, 2013; Martín-Pozuelo 2015 *et al.*; Elvira Torales *et al.*, 2018). En estudios anteriores hemos observado como el consumo de carotenoides provenientes de espinacas y tomate ejercen un impacto beneficioso en los marcadores relacionados con EHGNA, sin embargo, el efecto sinérgico de las espinacas y tomate no se ha evaluado. Teniendo en cuenta que entre los antioxidantes se pueden observar efectos potenciadores y que una dieta variada y equilibrada proporciona varios carotenoides, el objetivo de este estudio, ha sido investigar si el consumo de espinacas y tomate, y los carotenoides presentes en

estos alimentos, tienen efectos protectores en el tratamiento dietético de la esteatosis inducida por la dieta alta en grasa. Para lograr este objetivo, se evaluaron los cambios en los parámetros plasmáticos, los biomarcadores de estrés oxidativo, el contenido de lípidos en el hígado y los perfiles transcriptómicos y proteómicos de las ratas con esteatosis, tras aplicar durante la fase de tratamiento o reversión una dieta suplementada con polvo de tomate y espinaca a diferentes concentraciones.

5.4.2. Materiales y Métodos

5.4.2.1. *Obtención de las espinacas, tomate y preparación de las dietas experimentales*

Las espinacas (*Spinacia oleracea*) se adquirieron en un supermercado local como producto de cuarta gama (Florette SAS, milagro, Navarra, España). Las espinacas se hirvieron durante 10 minutos para reducir su contenido en ácido oxálico, desechando el agua de cocción y liofilizando las espinacas cocidas. Las muestras liofilizadas fueron trituradas en una Thermomix, hasta la obtención de un polvo fino. Por otro lado, la pasta de tomate fue proporcionada por una empresa alimentaria, y sometida a liofilización obteniendo las placas secas de concentrado de tomate que también se trituraron hasta la obtención de un polvo fino. Las muestras en polvo de estos dos vegetales se almacenaron a 4 °C hasta su uso, utilizándolas como ingrediente rico en carotenoides.

Para la preparación de las dietas experimentales enriquecidas con espinacas y tomate se mezcló la dieta estándar pulverizada (Teklad Global 14%, Protein Rodent Maintenance Diet TD-2014, Harland Laboratories) con polvo de espinacas y tomate, en las siguientes proporciones 12.75% (7.12:5.63, respectivamente) y 25.5% (14.23:11.27, respectivamente). A las diferentes mezclas de polvo y pienso se le añadió agua hasta formar una masa homogénea, preparando los pellets con una manga pastelera.

Posteriormente, se llevaron a una estufa de desecación a 60 °C durante 21 h. Los pellets secos se introdujeron en bolsas de polietileno, almacenándolos en un refrigerador a 4 °C hasta el momento de su utilización.

5.4.2.2. *Composición química de las dietas experimentales*

La composición proximal se determinó siguiendo los métodos de la AOAC (1990): humedad (930.15), ceniza (942.05) y grasa cruda (920.39), las proteínas se calcularon utilizando un factor de conversión de nitrógeno en proteína de 6.25 (954.01). También se determinó el contenido de fibra dietética total (FDT) (985.29) (1990) descrito por Prosky *et al.* (1985). Los carbohidratos se calcularon por diferencia.

5.4.2.3. *Animales y diseño experimental*

El protocolo experimental del presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia y por la Dirección General de Ganadería y Pesca de la C.A.R.M. (No. A1320140701). Se emplearon 22 ratas macho adultas Sprague-Dawley (6 semanas de edad), las cuales fueron alimentadas con una dieta rica en grasas (Atherogenic Rodent Diet TD-02028; Harland Laboratories) y una solución de fructosa al 20% durante 8 semanas, con el objetivo de inducir la esteatosis. Tras confirmar la esteatosis mediante un estudio histológico del hígado de dos ratas, los animales se clasificaron en tres grupos experimentales; un grupo control-CD ($n = 6$, dieta estándar), bajo en carotenos-BC ($n = 8$, dieta estándar suplementada con un 12.75% de mezcla de polvo de espinacas y tomate) y alto en carotenos-AC ($n = 8$, dieta estándar suplementada con un 25.5% de mezcla de polvo de espinacas y tomate). El periodo experimental de administración de las dietas ricas en carotenoides fue de cinco semanas como se muestra en la **Figura 5.4.1**, y durante este periodo se llevó a cabo un registro del

peso corporal semanalmente, mientras que la ingesta de alimento y las excreciones de orina y heces durante 24 horas se registraron al inicio y final del periodo experimental, mediante el uso de jaulas metabólicas. Transcurridas las cinco semanas, y tras un periodo de ayuno de 4 horas los animales fueron anestesiados con isoflurano y se realizó la extracción de sangre mediante punción cardiaca, para posteriormente ser sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico mediante inyección intraperitoneal (Dolethal, Laboratorios Vétoquinol, España). Para las muestras de sangre se utilizaron tubos heparinizados y el plasma se obtuvo por centrifugación a (3000 x g, 10 min, a 4 °C) conservándolas posteriormente a -80 °C. Paralelamente, se obtuvieron las otras muestras biológicas de heces, orina e hígado, tratándolas de diferente modo según el destino que se le iba a dar en los posteriores análisis y almacenándolas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

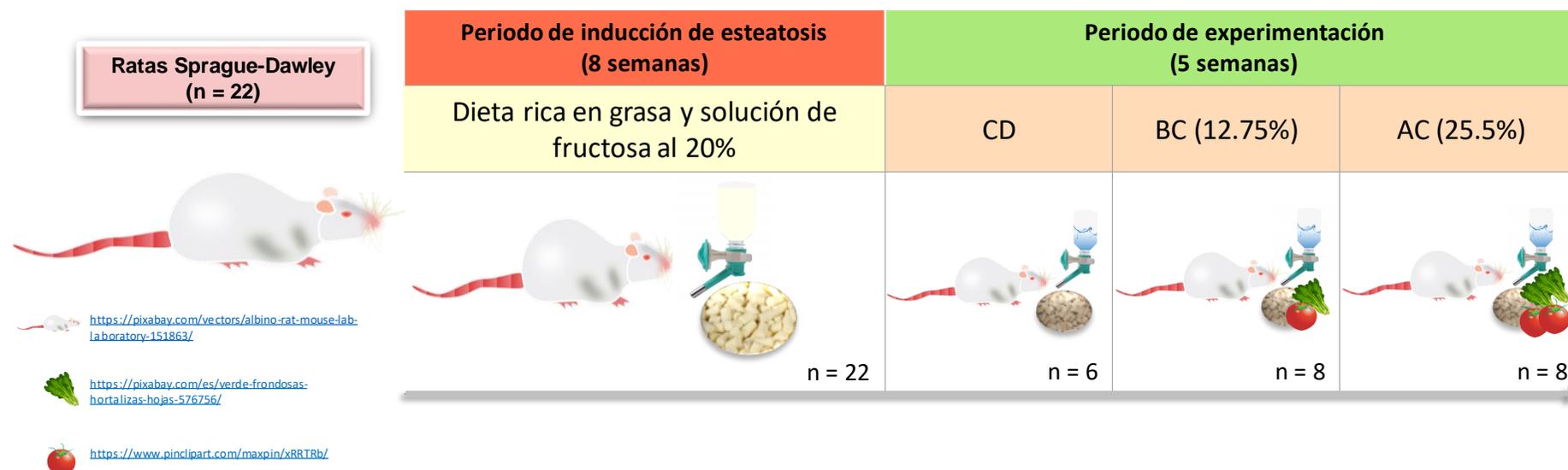


Figura 5.4.1. Diseño experimental del estudio.

5.4.2.4. *Examen histopatológico*

Se tomaron las muestras de hígado de dos ratas al término de las 8 semanas de la inducción de la esteatosis para corroborar la patología mencionada y también al final del periodo experimental, los hígados de las ratas se dividieron en dos partes, uno se fijó en formalina y se incrustó en parafina, obteniéndose secciones de 4 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) para su examinación con un microscopio de luz. La otra parte se congeló instantáneamente en 2-metilbutano (isopentano), se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C hasta su posterior uso. La evaluación de la esteatosis se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Brunt *et al.* (1999).

5.4.2.5. *Parámetros bioquímicos del plasma*

La concentración de glucosa, colesterol total, fracciones de colesterol-HDL, colesterol-LDL y colesterol-VLDL, triglicéridos totales (TG), proteína total y la actividad de las enzimas alanina y aspartato aminotransferasa (ALT y AST) fueron analizadas utilizando un analizador automático (A25 BioSystems S.A., Barcelona, España) en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia.

5.4.2.6. *Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo*

La capacidad antioxidante total del plasma y de las dietas, expresada como mmol de equivalentes de Trolox (TE)/L, se midió utilizando la técnica de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), adaptada para la medición semiautomática en un lector de microplacas multimodal de 96 pocillos (Synergy HT Biotek, Winooski, VT, EE. UU.) (Prior *et al.*, 2003). Para evaluar el grado de peroxidación lipídica se analizaron los niveles de malondialdehído (MDA) en muestras de hígado, plasma y orina, las cuales se midieron con el método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

descrito por Mateos *et al.* (2005). Los resultados se expresaron como nmol de MDA/g de proteína en hígado, nmol de MDA/mL de muestras de plasma y nmol de MDA/mg de creatinina en la orina. La concentración de proteína en hígado fue analizada siguiendo el método de Lowry, modificado por Bensadoun y Weinstein (1976). La concentración de creatinina en orina se analizó siguiendo el método espectrofotométrico del ácido pícrico por la reacción de Jaffè (Helger *et al.*, 1974).

5.4.2.7. *Análisis de carotenoides en las dietas, el hígado y las heces*

El análisis de carotenoides se realizó de acuerdo con el método descrito por Seybold *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Para la extracción de carotenoides de las dietas y de las heces, se pesaron 0.5 g de muestra y 2 g en el caso del hígado, las muestras se extrajeron dos veces en tetrahidrofurano/metanol (1/1, v/v) con 0.1% de butilhidroxitolueno. Los extractos se combinaron y se llevaron a un evaporador rotatorio, hasta la completa extracción del disolvente. Los residuos se reconstituyeron con una solución de TBME/MeOH adicionando 5 mL para las dietas y heces, y 1 mL en el caso del análisis de los carotenoides hepáticos. Las muestras se volvieron a centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se filtraron. Los carotenoides se analizaron por HPLC (Agilent 1200, Waldbronn, Alemania) con una columna C30 (250 x 4.6 mm, 5 µm id) (Trentec, Gerlinger, Germany), usando las condiciones descritas por Elvira-Torales *et al.* (2019a), utilizando patrones puros de licopeno, luteína, zeaxantina y β-caroteno para cuantificar el contenido de carotenoides.

5.4.2.8. *Análisis de lípidos en el hígado y en las heces*

Se analizó el contenido de grasa total y colesterol en el hígado y en las heces, y además el contenido de ácidos grasos y triglicéridos en los hígados de rata. La grasa total

se determinó mediante el método Soxhlet, aplicado a muestras de hígado según el procedimiento descrito por Hijona *et al.* (2010), utilizando éter etílico como disolvente. Para la determinación de ácidos grasos y colesterol se empleó un kit de extracción de lípidos Sigma Aldrich (MAK174) y un kit de extracción de colesterol (MAK175), respectivamente, utilizando como paso previo el método de extracción de Folch *et al.* (1957) y las instrucciones referidas por el fabricante. Los sobrenadantes extraídos se evaporaron bajo flujo de N₂, y se reconstituyeron con hexano inyectando, inmediatamente, en un cromatógrafo de gases (Agilent GC 7890A, Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID), según lo reportado por Martín-Pozuelo *et al.* (2015). El análisis de triglicéridos se realizó utilizando un kit de ensayo colorimétrico de triglicéridos (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

5.4.2.9. *Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces y contenido intestinal*

Para el análisis de AGCC en heces y contenido intestinal se siguió el método adaptado de Anson *et al.* (2011), con ligeras modificaciones. Se homogeneizaron 100 mg de muestra con 650 µL de una mezcla de ácido fórmico (20%), metanol y ácido butírico 2-etil como estándar interno (2 mg/mL en metanol), en una proporción de 1/4.5/1 (v/v/v). La mezcla se llevó a un baño de ultrasonidos, sometiéndola a sonicación durante 5 min a temperatura ambiente, centrifugándola a 16110 x g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de polietrafluoroetileno (PTFE) con un diámetro de 13 mm y un tamaño de poro de 0.22 µm (VWR International, EE. UU.) para posteriormente analizarlo por cromatografía de gases. El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un sistema Agilent 7890A GC-FID equipado con un inyector automático

(7683B) (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) y para la separación cromatográfica, se utilizó una columna Nukol™ (Supelco, EE. UU.) de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película, usando las condiciones descritas por Elvira *et al.* (2019b.). Para la cuantificación se utilizó un multi-estándar comercial (SUPELCO, EE. UU.) con concentraciones certificadas de ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocaproico y ácido heptanoico. Se prepararon estándares múltiples de 1, 5 y 10 mM del multi-estándar (10 mM).

5.4.2.10. *Estudio de la expresión de genes implicados en la enfermedad de hígado graso*

Para los análisis de expresión génica, las muestras de hígado de recogieron en microtubos estériles libres de ARNasa con adición de solución RNAlater®, con la finalidad de evitar la degradación del ARN durante el almacenamiento de las muestras. El ARN fue extraído del hígado utilizando un mini kit TNeasy® (Qiagen, Duesseldorf, Alemania) siguiendo el procedimiento descrito en las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se evaluó la cantidad y calidad del ARN empleando un Nano-Drop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE. UU.), verificándolo espectrofotométricamente con relaciones de 260/280 nm >2.0 y relaciones de 260/230 nm > 1.7. Para la transcripción inversa se utilizó 1 µg de ARN total con un kit RT2 First Strand (Qiagen, SABioscience). Se procedió a la transcripción utilizando un termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis EE. UU.) y las muestras de ADN se almacenaron para llevar a cabo los experimentos de PCR a tiempo real (qPCR) con un array específico para el estudio de genes relacionados con la enfermedad del hígado graso de rata (PARN-157ZD-24, Qiagen, SABiosciences,

Frederick, MD, EE. UU.). El array cuenta con una placa de 96 pocillos diseñada para la evaluación de genes relacionados con la esteatosis, incluyendo un total de 84 genes involucrados en los siguientes procesos: señalización de la insulina, síntesis de adipocinas, respuesta inflamatoria, apoptosis, y metabolismo de carbohidratos y lípidos en el hígado. Los resultados de fluorescencia obtenidos se analizaron utilizando el análisis de datos de matriz RT2 Profiler™ PCR, considerando el grupo control como referencia para determinar el cambio de expresión relativa. Los resultados fueron considerados válidos cuando se obtuvo un “*fold change*” en la expresión génica ≥ 1.5 o ≤ -1.5 , con diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$, indicando una expresión superior o inferior a la encontrada en el grupo control.

5.4.2.11. Western Blot

Para la extracción de proteínas se realizó una lisis celular con buffer de Tris 50mM, EDTA 1mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5mM y 2-Mercaptoetanol (98%) 0.5 mM, empleando un homogeneizador de pistilo rotativo, seguido de una centrifugación de los lisados a 10600 rpm durante 5 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Lowry, modificado por Bensadoun y Weinstein (1976). Se separaron 20 µg de proteínas de hígado de rata mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% y se transfirieron a membranas de PVDF. Inmediatamente después, las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en TBS (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.15 M) durante 2 h a 4 °C, y se incubaron durante 12 horas a 4 °C con anticuerpos primarios anti-IGFBP1 (abcam, ab181141;1:1000), anti-ACOX1 (abcam, ab184032; 1:1000), anti-LXR-β (abcam, ab28479; 1:1000), anti-apoA1 (abcam, ab20453; 1:1000), y el anti-F-actin (abcam, ab205; 1:500). Las membranas se lavaron tres veces (5 min cada una) con solución de T-TBS (Tween-20 al 0.1% en TBS)

e inmediatamente se incubaron durante 2 horas a 25 °C con un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-mouse (PIERCE, 1858413; 1:100000) o un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-rabbit HRP (PIERCE, 1858415; 1:100000). Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con T-TBS y luego 2 veces con TBS. Las señales se detectaron con sustrato HRP quimioluminiscente, utilizando el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.). Para obtener las imágenes de las bandas, se utilizó el sistema de imagen UVP chemiDoc-It2 (UVP, LLC, Upland, CA, EE. UU.). La intensidad de las bandas en las imágenes se determinó empleando el software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.). Los valores informados se normalizaron con F-actina. Para verificar las proteínas procesadas, se determinó el peso molecular contrastando con el estándar.

5.4.2.12. *Análisis estadístico*

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos de esta investigación se analizaron mediante un ANOVA de una vía con medias repetidas, con una prueba post-hoc para comprobar las diferencias entre los promedios de todas las determinaciones analíticas: la prueba de Tukey o de Games-Howell según corresponda. Además, para el parámetro de MDA en orina se realizó la prueba *t* de Student pareada para comparar los valores al principio y al final del experimento. Los datos se expresaron como valores medios \pm SD de los resultados obtenidos. El nivel de significancia fue $p < 0.05$. Se utilizó el paquete de software estadístico Minitab versión 17.0 (Minitab, LLC., State College, PA, EE. UU.). Los análisis de los genes expresados diferencialmente se realizaron con Partek Genomics Suite 6.6.

5.4.3. Resultados

5.4.3.1. *Ingesta diaria de nutrientes y carotenoides, reducción de peso y volumen de alimento ingerido*

Como se puede observar en la **Tabla 5.4.1**, la composición proximal, los valores de energía, la capacidad antioxidante (medido por el método ORAC) y los carotenoides de las dietas suplementadas con espinacas y tomate mostraron diferencias significativas entre las dietas administradas a las ratas con esteatosis durante las cinco semanas que duró el estudio de intervención. En comparación con los animales alimentados con la dieta estándar (CD), se observó que en los animales que tomaron la dieta alta en carotenoides (AC) la ingesta de proteínas, grasa y fibra dietética fue significativamente mayor (1.13, 1.17, 1.21 veces, respectivamente) y menor en el consumo de carbohidratos (1.15 veces más bajo), dando como resultado una disminución del valor energético (306.59 kcal/100 g), aumentando las calorías tanto de proteína y grasa, y reduciéndose así mismo, las calorías de carbohidratos para esta dieta. No obstante, aunque esta diferencia calórica fue significativa en valor absoluto, la dieta de este grupo fue solo un 5% más baja en el valor calórico total que la estándar. De manera similar, se observó una tendencia parecida en el grupo bajo en carotenoides (BC), sin embargo, estadísticamente no muestra diferencias significativas con el grupo control para la ingesta de fibra y carbohidratos y con el grupo AC para el contenido de proteínas y grasa.

La suplementación con la mezcla de espinacas y tomate proporcionó compuestos bioactivos de interés nutricional observando un incremento significativo en el contenido de compuestos fenólicos totales y carotenoides, que se incrementaron significativamente conforme al porcentaje de vegetales liofilizados incluidos en la dieta. Para los compuestos fenólicos los valores medios oscilaron entre 205.03 y 265.30 mg/100 g para la dieta control y alta en carotenoides, respectivamente. Las dietas suplementadas con tomate y

espinacas mostraron una amplia gama de carotenoides, presentando neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina, fitoeno, α -caroteno, β -caroteno y el licopeno. La presencia de carotenoides estuvo directamente relacionada con la dosis administrada, observando un contenido significativamente mayor en el grupo AC, con un contenido medio de 528.65 μg de carotenoides totales/g de alimento, mientras que en la dieta BC presentó 283.84 μg de carotenoides totales/g de alimento. Con respecto a la capacidad antioxidante de las dietas, se puede observar un aumento significativo de este parámetro en BC (21.78%) y AC (95.64%) en comparación con la dieta CD, siendo estos resultados esperables si tenemos en cuenta principalmente el incremento de compuestos bioactivos con actividad antioxidante presentes en las dietas experimentales.

Tabla 5.4.1. Composición proximal, valores de energía, capacidad antioxidante y contenido de carotenoides de las dietas administradas en los grupos experimentales.¹

Cantidad de nutrientes (por 100 g)	CD	BC	AC
Proteína cruda (g)	14.33±0.15 ^b	15.79±0.75 ^a	16.63±0.14 ^a
Grasa (g)	2.91±0.06 ^b	3.28±0.18 ^a	3.43±0.14 ^a
Fibra dietética total (g)	21.16±1.73 ^b	21.27±0.9 ^b	25.63±1.01 ^a
Ceniza (g)	1.51±0.16 ^c	1.85±0.11 ^b	2.45±0.03 ^a
Carbohidratos (g)	60.09±1.48 ^a	57.81±1.83 ^a	51.85±0.99 ^b
Valor energético (kcal)	323.9±6.09 ^a	323.93±2.84 ^a	306.59±2.73 ^b
Calorías de la proteína (%)	17.7±0.15 ^b	19.5±1.08 ^b	21.68±0.05 ^a
Calorías de grasa (%)	8.1±0.29 ^b	9.12±0.59 ^{ab}	10.14±0.38 ^a
Calorías de carbohidratos (%)	74.2±0.44	71.38±1.63	68.26±0.45
Fenólicos totales (TPC) (mg GAE)	205.03 ± 1.71 ^c	243.66 ± 4.47 ^b	265.30 ± 5.69 ^a
ORAC (mmoles TE)	4.59 ± 0.35 ^c	5.59 ± 0.34 ^b	8.98 ± 0.33 ^a
Carotenoides (µg/100 g)			
Neoxantina	-	5.64±1.11 ^b	8.36±0.34 ^a
Violaxantina	-	3.24±0.91 ^b	5.13±0.64 ^a
Luteína	-	58.71±2.39 ^b	95.05±4.51 ^a
Zeaxantina	-	4.68±0.62 ^b	91.5±1.27 ^a
Fitoeno	-	44.02±8.86 ^b	84.69±7.18 ^a
α-caroteno	-	8.51±0.74 ^b	18.33±1.05 ^a
β-caroteno	-	46.76±2.00 ^b	91.96±1.17 ^a
Lycopeno	-	113.28±17.40 ^b	218.77±17.28 ^a
Total	-	283.84±8.46 ^b	528.65±24.29 ^a

¹Los valores se expresan como media ± SEM. ^{a-c}Diferentes letras en la misma fila muestran diferencias significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$). CD: Dieta estándar (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, 2014). LC12.75: Dieta estándar + 12.75% de mezcla de espinaca y tomate. HC: Dieta estándar + 25.5% de mezcla de espinaca y tomate.

En la **Tabla 5.4.2** se muestra el consumo de alimento y agua, los cambios en el peso corporal, la excreción de heces y orina, la ingesta y absorción de carotenoides durante el periodo experimental. No se encontraron diferencias significativas en el peso inicial y final entre los grupos experimentales, debido a la variabilidad encontrada en el peso de los distintos animales. Sin embargo, se observó una disminución significativa del peso corporal entre el inicio y el final del estudio de 27.5 g y 50.17 g en los grupos BC y AC respectivamente, en comparación con las ratas alimentadas con CD que solo mostraron

una variación de peso de 2.83 g. Este hecho estaría determinado por una ligera disminución del valor calórico de las dietas experimentales frente a la dieta estándar de mantenimiento administrada al grupo control. En relación con el comportamiento de los animales y la aceptación de la dieta, no se observaron cambios significativos para la ingesta de alimento y agua, ni para la excreción de orina y heces entre los tres grupos experimentales.

Tabla 5.4.2. Ingesta de alimento y bebida, excreción de heces y orina, y consumo de carotenoides de los tres grupos experimentales, en el periodo de 5 semanas de intervención¹

Parámetros	CD	BC	AC
Peso corporal inicial (g)	554.17 ± 63.71	547.88 ± 68.44	546.13 ± 82.57
Peso corporal final (g)	551.33 ± 64.11	523.63 ± 49.26	506.38 ± 60.99
Disminución de peso corporal (g)	2.83 ± 1.94 ^b	27.50 ± 10.50 ^a	50.17 ± 23.65 ^a
Ingesta comida (g/día)	14.72 ± 4.81	15.09 ± 5.11	15.26 ± 3.23
Ingesta de agua (mL/día)	32.48 ± 5.70	31.68 ± 1.43	32.41 ± 8.66
Heces excretadas (g/día)	2.46 ± 0.69	3.05 ± 0.82	3.49 ± 0.92
Orina excretada (mL/día)	14.67 ± 1.13	13.91 ± 2.62	16.14 ± 5.44
Ingesta de carotenoides (mg/día)	-	4.00 ± 1.35 ^b	8.07 ± 1.71 ^a
Carotenoides excretados en heces (mg/día)	-	1.80 ± 0.48 ^b	3.64 ± 0.96 ^a
Absorción aparente de carotenoides (%)	-	54.94 ± 14.15	69.02 ± 13.36
Ingesta de FDT (g/día)	3.11 ± 1.02	3.21 ± 1.09	3.67 ± 1.03
Ingesta de fenólicos totales (mg/día)	32.85 ± 9.85	36.76 ± 12.46	37.97 ± 10.64

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a,b}Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

De acuerdo con la proporción de la mezcla de espinacas y tomate adicionada a las dietas experimentales y según el contenido de carotenoides presente en las mismas (**Tabla 5.4.1**), la ingesta de estos antioxidantes fue significativamente mayor en el grupo AC con una ingesta media de 8.07 mg/día, que en el grupo BC en el que la ingesta media fue de 4 mg/día. Considerando la cantidad de carotenoides excretados en heces, que fue proporcional a la cantidad ingerida, se determinó la absorción aparente presentando la misma tendencia, siendo de 54.94% y 69.02 en los grupos BC y AC, respectivamente.

Teniendo en cuenta que las dietas experimentales presentaron un mayor aporte de FDT, procedente del polvo de tomate y espinacas, se determinó la ingesta diaria de este componente, observando que la mayor concentración no se reflejó en un incremento significativo de la ingesta, al no existir diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

5.4.3.2. Examen histopatológico y parámetros bioquímicos

De acuerdo con el examen histopatológico (**Figura 5.4.2**), se puede observar que debido a la dieta grasa grasas y a la solución de fructosa que consumieron las ratas durante ocho semanas, antes de empezar el periodo de intervención, los animales desarrollaron esteatosis, mostrando degeneración vacuolar de los hepatocitos conteniendo en el interior grasa mostrando diferentes grados de degeneración y esteatosis (Brunt *et al.*, 1999). Además, la esteatosis inducida por la dieta se corroboró mediante la actividad de las enzimas hepáticas: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), cuyas actividades estuvieron muy incrementadas (84.83 U/L y 161.30 U/L, respectivamente), así como por el incremento en los triglicéridos en plasma (189 mg/dL).

Partiendo de este estado de esteatosis inducida, se inició la fase de intervención de 5 semanas con las dietas experimentales suplementadas con espinacas y tomate, evaluando los cambios en el examen histopatológico y en los parámetros bioquímicos de los tres grupos experimentales la finalizar este periodo. Las ratas del grupo control presentaron esteatosis grado 2 (25–50% de degeneración vacuolar de hepatocitos) y un bajo grado de inflamación (grado 1, <20% del área examinada afectada); sin embargo, las ratas que ingirieron las dietas suplementadas con espinacas y tomate (BC y AC), mostraron un grado bajo de degeneración vacuolar (grado 1), con menos del 25% de los

hepatocitos afectados. Estos resultados mostraron un mejor estado del hígado tras la intervención con carotenoides, hecho que se acompañó de una disminución significativa de las enzimas hepáticas en los grupos BC y AC. Así, la actividad de la enzima ALT se redujo 1.4 y 1.6 veces, mientras que la enzima AST 1.7 y 1.9 veces, en los grupos BC y AC, respectivamente, en comparación con el grupo CD (**Tabla 5.4.3**).

Los resultados de los parámetros bioquímicos del plasma se muestran en la **Tabla 5.4.3**. Se detectaron cambios importantes en los valores plasmáticos, al comparar los grupos BC y AC con respecto al grupo CD, que están claramente relacionados con las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis. Al final del experimento, se mostraron niveles significativamente más bajos de glucosa, colesterol total, colesterol-VLDL, triglicéridos y proteínas en los grupos alimentados con la mezcla de espinacas y tomate. En el caso concreto del colesterol total, triglicéridos totales y colesterol VLDL la disminución observada fue directamente proporcional a la cantidad de carotenoides presentes en la dieta, indicando que una mayor ingesta puede tener un efecto mayor en determinados parámetros plasmáticos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las fracciones de colesterol-HDL y colesterol-LDL entre los tres grupos experimentales.

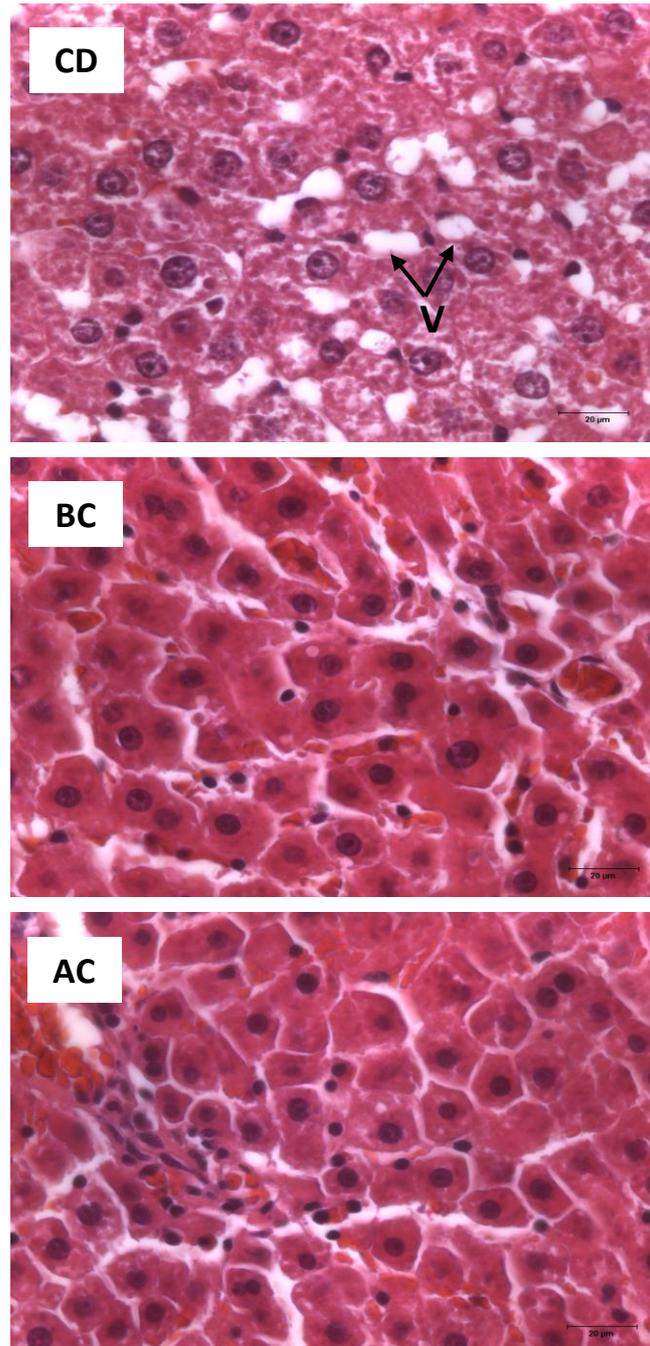


Figura 5.4.2. Fotografías microscópicas de muestras de hígado. Imágenes microscópicas con H&E visualizadas por microscopía óptica (x63) para los grupos experimentales. Grupo control-CD; bajo en carotenos-BC-; alto en carotenos-AC. Las flechas muestran la degeneración vacuolar del hepatocito (V).

Tabla 5.4.3. Parámetros bioquímicos finales en plasma, las actividades de las enzimas hepáticas y el contenido de carotenoides (licopeno) se analizaron en los tres grupos experimentales después del periodo de intervención de 5 semanas.¹

Parámetros	CD	BC	AC
Glucosa (mg/dL)	205.50±15.59 ^a	156.33±26.21 ^b	140.86±23.77 ^b
Colesterol total (mg/dL)	111.20±8.26 ^a	90.50±5.61 ^b	78.00±8.16 ^c
Colesterol-HDL (mg/dL)	33.92±3.21	30.63±2.46	31.74±5.00
Colesterol-LDL (mg/dL)	13.10±1.29	12.37±1.78	11.83±1.77
Colesterol-VLDL (mg/dL)	63.59±8.94 ^a	47.57±3.51 ^b	35.75±7.36 ^c
Triglicéridos (mg/dL)	81.91±12.45 ^a	52.86±14.79 ^b	43.11±9.85 ^b
ALT (U/L)	36.88±8.50 ^a	25.43±2.72 ^b	21.63±1.99 ^b
AST (U/L)	112.33±13.38 ^a	69.37±7.27 ^b	58.42±3.38 ^c
Proteínas (g/dL)	7.17±0.22 ^a	6.36±0.33 ^b	5.29±0.32 ^c

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a-c}Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

En la **Tabla 5.4.4** se muestran los valores obtenidos para los parámetros analizados con relación al estrés oxidativo. Con respecto a la concentración de carotenoides en plasma, solo fue detectado el licopeno con niveles medios de 0.013 y 0.016 $\mu\text{g/mL}$ para el grupo BC y AC, respectivamente, mostrando diferencias significativas entre ellos en función de la concentración ingerida. Otros parámetros analizados como biomarcadores de estrés oxidativo fue el ORAC del plasma y las concentraciones de MDA en plasma, hígado y orina. La ingesta de dietas ricas en carotenoides aumentó significativamente la capacidad antioxidante del plasma en las ratas con valores medios de 7.56, 10.40 y 13.11 mmoles de TE/L (**Tabla 5.4.4**), siendo proporcional a la proporción de carotenoides en la dieta. Así, en BC y AC los valores de ORAC aumentaron significativamente en un 37% y 73%, respectivamente, en comparación al grupo CD. Con respecto a los niveles de MDA en plasma, hígado y orina, fueron significativamente mayores en el grupo CD, indicando un aumento de peroxidación lipídica como resultado de la acumulación de lípidos, por el contrario, en los grupos suplementados con la mezcla de espinacas y tomate, se redujo significativamente el MDA plasmático (48 y 54%), hepático (44 y 51%)

y urinario (56 y 79%) para los grupos BC y AC, respectivamente, revelando que la ingesta de espinacas y tomate ricos en carotenoides ayuda a la reducción de los biomarcadores de oxidación lipídica, tras el consumo de una dieta alta en grasa y azúcares. Hay que destacar especialmente los valores de MDA detectados en las muestras de orina al inicio del estudio de intervención y al final. Si bien al inicio del estudio no se observaron diferencias entre los tres grupos, ya que se partía en todos los casos con ratas con esteatosis inducida a partir de la dieta, tras las cinco semanas de intervención con las dietas ricas en carotenoides se observó una disminución significativa en los valores de MDA en orina, que fue proporcional a la cantidad ingerida.

Tabla 5.4.4. Concentraciones de licopeno en plasma y biomarcadores de estrés oxidativo en diferentes muestras biológicas en los tres grupos experimentales.¹

Parámetros	CD	BC	AC
Licopeno en plasma (µg/mL)	nd	0.013±0.001 ^b	0.016±0.001 ^a
ORAC en plasma (mmoles TE/L)	7.56 ± 0.33 ^c	10.40 ± 0.27 ^b	13.11 ± 0.74 ^a
MDA en plasma (nmol MDA/mL)	7.42 ± 0.76 ^a	3.88 ± 0.47 ^b	3.39 ± 0.44 ^b
MDA en hígado (nmol MDA/g proteína)	1.05 ± 0.14 ^a	0.59 ± 0.16 ^b	0.51 ± 0.08 ^b
MDA en orina inicial (nmol MDA/mg creatinina)	18.55 ± 2.44 [*]	19.79 ± 1.30 [*]	19.20 ± 2.92 [*]
MDA en orina final (nmol MDA/mg creatinina)	14.07 ± 1.75 ^a	6.20 ± 2.43 ^b	2.97 ± 1.13 ^c

¹Los datos se expresan como media ± SEM. a–cDiferentes letras muestran diferencias significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$). *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), después de realizar una prueba *t* pareada, entre el comienzo y final del experimento, para todos los grupos.

5.4.3.3. Contenido de carotenoides en el hígado y en las heces

El contenido de carotenoides en el hígado de las ratas se muestra en la **Tabla 5.4.5**. El contenido total de carotenoides en el hígado no mostró diferencias significativas entre los dos grupos que consumieron la mezcla de espinacas y tomate. Sin embargo, el contenido de luteína y fitoeno fue significativamente mayor en el grupo AC, en comparación con el grupo BC. A pesar de no encontrar diferencias significativas en el contenido de licopeno entre los grupos mencionados, se observa que este carotenoide fue

el que presentó una mayor acumulación a nivel hepático, al ser el mayoritario de las dietas enriquecidas (**Tabla 5.4.1**), alcanzando valores de 11.87 $\mu\text{g/g}$ para AC y 9.82 $\mu\text{g/g}$ para BC. Los carotenoides acumulados en menor cantidad en el hígado fueron la zeaxantina (promedio de 0.027 $\mu\text{g/g}$) y el β -caroteno (promedio 0.024 $\mu\text{g/g}$).

Con respecto al contenido de carotenoides en las heces, se detectaron neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina, fitoeno, α y β -caroteno, y licopeno (**Tabla 5.4.6**), observando diferencias significativas entre ambos grupos, mostrando cantidades más elevadas de carotenoides totales en heces el grupo AC (1043.84 $\mu\text{g/g}$) que en el grupo BC (589.21 $\mu\text{g/g}$), relacionado directamente con la cantidad de carotenoides presentes en la dieta e ingeridos diariamente. El licopeno también ha sido el carotenoide mayoritario determinado en las heces, presentando la misma tendencia que lo encontrado en el hígado. En las ratas CD no se detectaron carotenoides ni en el hígado ni en las heces, debido al bajo contenido de estos compuestos en el en las materias primas utilizadas para la elaboración de la dieta control.

Tabla 5.4.5. Contenido de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) en el hígado de las ratas de los tres grupos experimentales, al final del periodo de intervención de 5 semanas.¹

Carotenoides	CD	BC	AC
Neoxantina	nd	5.58±2.21 ^b	10.23±1.73 ^a
Violaxantina	nd	3.82±1.54 ^b	7.35±1.46 ^a
Luteína	nd	63.64±8.86 ^b	127.54±19.05 ^a
Zeaxantina	nd	9.94±1.15 ^b	13.68±1.96 ^a
Fitoeno	nd	66.8±18.41 ^b	103.67±15.38 ^a
α -caroteno	nd	8.82±2.61 ^b	28.07±5.46 ^a
β -caroteno	nd	51.22±10.15 ^b	76.33±13.79 ^a
Licopeno	nd	379.37±108.33 ^b	676.96±64.97 ^a
Total	nd	589.21±142.93 ^b	1043.84±107.3 ^a

¹Los valores se expresan como media \pm SEM. ^{a,b}Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos es después de realizar un ANOVA de una vía. nd: no detectado.

Tabla 5.4.6. Contenido de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) en las heces de ratas de los tres grupos experimentales, al final del periodo de intervención de 5 semanas.¹

Carotenoides	CD	BC	AC
Luteína	nd	0.071±0.02 ^b	0.113±0.04 ^a
Zeaxantina	nd	0.026±0.005	0.027±0.005
Fitoeno	nd	0.324±0.069 ^b	0.397±0.076 ^a
β -caroteno	nd	0.023±0.008	0.025±0.010
Licopeno	nd	9.826±2.111	11.876±3.224
Total	nd	10.27±2.21	12.44±3.35

¹Los valores se expresan como media \pm SEM. ^{a,b}Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos es después de realizar un ANOVA de una vía. nd: no detectado.

5.4.3.4. *Contenido de grasa total, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos en el hígado*

En la **Tabla 5.4.7** se recogen los valores medios de la composición grasa del hígado. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en los valores medios del peso del hígado de los tres grupos al finalizar las 5 semanas de intervención, sí que se observó una reducción significativa en la acumulación de grasa hepática total en el grupo AC en comparación con el grupo CD (11.98% vs. 12.97%). Paralelamente, dicha disminución fue observada para los valores medios de colesterol total y triglicéridos en hígado. Las concentraciones de colesterol hepático disminuyeron significativamente tras la ingesta de la dieta suplementada con espinacas y tomate, reduciéndose un 41% en el grupo BC y un 51% en el grupo AC, en comparación con los valores medios obtenidos para el grupo control. Con respecto a los triglicéridos hepáticos, la disminución fue del 28% y 46% para los grupos BC y AC, respectivamente, comparados con el contenido de triglicéridos observado en el hígado de los animales del grupo CD. Teniendo en cuenta que las principales diferencias en la composición de las dietas se deben a la ingesta de carotenoides, y no a la grasa, estos resultados aparentemente podrían sugerir que el consumo de la mezcla de espinacas y tomate y la acumulación de carotenoides hepáticos tienen un efecto positivo sobre el metabolismo lipídico en el hígado, disminuyendo la grasa total, colesterol total y triglicéridos.

Para obtener más detalles sobre los cambios producidos en el perfil lipídico del hígado, se cuantificaron los ácidos grasos en muestras de hígado (**Tabla 5.4.7**). En general, los resultados muestran diferencias en las cantidades de ácidos grasos individuales y en el perfil de ácidos grasos. Con relación a la concentración, es importante señalar el aumento significativo de n-3 (ácido linolénico [ALA], ácido eicosapentaenoico [EPA] y ácido docosahexaenoico [DHA] y n-6 (ácido linoleico [AL], ácido

eicosadienoico [EDA] y ácido graso araquidónico [AA] en animales alimentados con espinacas y tomate. En relación con el perfil de los ácidos grasos presentes en los hígados de las ratas de los tres grupos experimentales, la incorporación de estos vegetales ricos en carotenoides influyó positivamente en la composición de ácidos grasos (**Figura 5.4.3**), reduciendo significativamente el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) (24.5% en BC y 18.5% en AC, frente al 41.2% en CD), y aumentando significativamente el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) (32.6% en HC25.5 frente a 24.9% en CD) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) (alrededor de un 48% en BC y AC frente a 33.9% en CD). Además, se observó un incremento significativo de los AGM y una disminución, también significativa, de la relación n-6/n-3 en el grupo AC.

Tabla 5.4.7. Peso del hígado (g), grasa total (%), colesterol total (mg/100 g), contenido de triglicéridos (mg/g) y concentraciones de ácidos grasos (mg/g) en los tejidos hepáticos de ratas en los tres grupos experimentales al final del periodo de intervención de 5 semanas¹.

Parámetros	CD	BC	AC
Peso del hígado	14.06±1.15	14.18±1.04	13.89±1.80
Grasa total	12.97 ± 0.12 ^a	12.27 ± 0.35 ^{ab}	11.98 ± 0.006 ^b
Colesterol total	836.9 ± 64.9 ^a	495.6 ± 47.6 ^b	406.5 ± 44 ^c
Triglicéridos	13.81 ± 1.47 ^a	9.89 ± 1.93 ^b	7.43 ± 1.39 ^c
Ácido caprílico (C8:0)	0.013±0.003 ^a	0.011±0.004 ^a	0.006±0.001 ^b
Ácido cáprico (C10:0)	0.033±0.002 ^a	0.012±0.007 ^b	0.007±0.001 ^b
Ácido undecanoico (C11:0)	0.042±0.007 ^a	0.019±0.004 ^b	0.014±0.001 ^c
Ácido láurico (C12:0)	0.024±0.008 ^a	0.014±0.005 ^a	0.007±0.002 ^b
Ácido mirístico (C14:0)	0.035±0.003 ^a	0.020±0.006 ^b	0.018±0.002 ^b
Ácido pentadecanoico (C15:0)	0.015±0.001 ^a	0.010±0.001 ^b	0.010±0.001 ^b
Ácido palmítico (C16:0)	0.038±0.010 ^a	0.020±0.004 ^b	0.016±0.004 ^b
Ácido margárico (C17:0)	0.020±0.003 ^a	0.016±0.002 ^b	0.015±0.001 ^b
Ácido esteárico (C18:0)	0.810±0.035 ^a	0.540±0.045 ^b	0.535±0.032 ^b
Ácido araquídico (C20:0)	0.046±0.015 ^a	0.026±0.006 ^b	0.019±0.005 ^b
Ácido behénico (C22:0)	0.048±0.016 ^a	0.028±0.005 ^b	0.020±0.005 ^b
Ácido lignocérico (C24:0)	nd	nd	0.032±0.006
Ácido miristoleico (C14:1)	0.052±0.015 ^a	0.022±0.001 ^b	0.017±0.004 ^c
Ácido cis 10 pentadecenoico (C15:1)	nd	0.007±0.001 ^b	0.016±0.004 ^a
Ácido palmitoleico (C16:1)	0.116±0.008 ^a	0.067±0.008 ^b	0.047±0.002 ^c
Ácido cis 10-heptadecenoico (C17:1)	nd	nd	0.010±0.004
Ácido elaídico (C18:1n9t)	0.106±0.014 ^b	0.119±0.010 ^b	0.167±0.041 ^a
Ácido oleico (C18:1n9c)	0.372±0.078 ^c	0.562±0.090 ^b	0.916±0.067 ^a
Ácido eicosenoico (C20:1n9)	nd	nd	0.006±0.001
Ácido nervónico C24:1n9	0.036±0.003 ^b	0.051±0.009 ^a	0.057±0.010 ^a
Ácido linolelaídico ω6 (C18:2tn-6)	nd	0.087±0.005 ^b	0.096±0.007 ^a
Ácido linoleico ω6(C18:2cn-6)	0.358±0.040 ^c	0.526±0.062 ^b	0.858±0.021 ^a
Ácido γ -linolénico ω6 (C18:3n-6)	0.014±0.001 ^a	0.009±0.001 ^b	0.009±0.002 ^b
Ácido α -linolénico ω3 (C18:3n-3)	nd	0.019±0.003 ^b	0.026±0.004 ^a
Ácido eicosadienoico ω6 (C20:2n-6)	nd	nd	0.008±0.001
Ácido eicosatrienoico ω6 (C20:3n-6)	0.029±0.006	0.022±0.003	0.029±0.010
Ácido araquidónico ω6 (C20:4n-6)	0.401±0.050 ^b	0.540±0.044 ^a	0.556±0.054 ^a
Ácido eicosatrienoico ω3 (C20:3n-3)	nd	0.012±0.001 ^b	0.077±0.002 ^a
Ácido eicosapentaenoico ω3 (C20:5n-3)	nd	0.023±0.004 ^b	0.026±0.003 ^a
Ácido docosahexaenoico ω3(C22:6n-3)	0.125±0.004 ^c	0.142±0.017 ^b	0.163±0.014 ^a

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a-c}Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$). nd: no detectado.

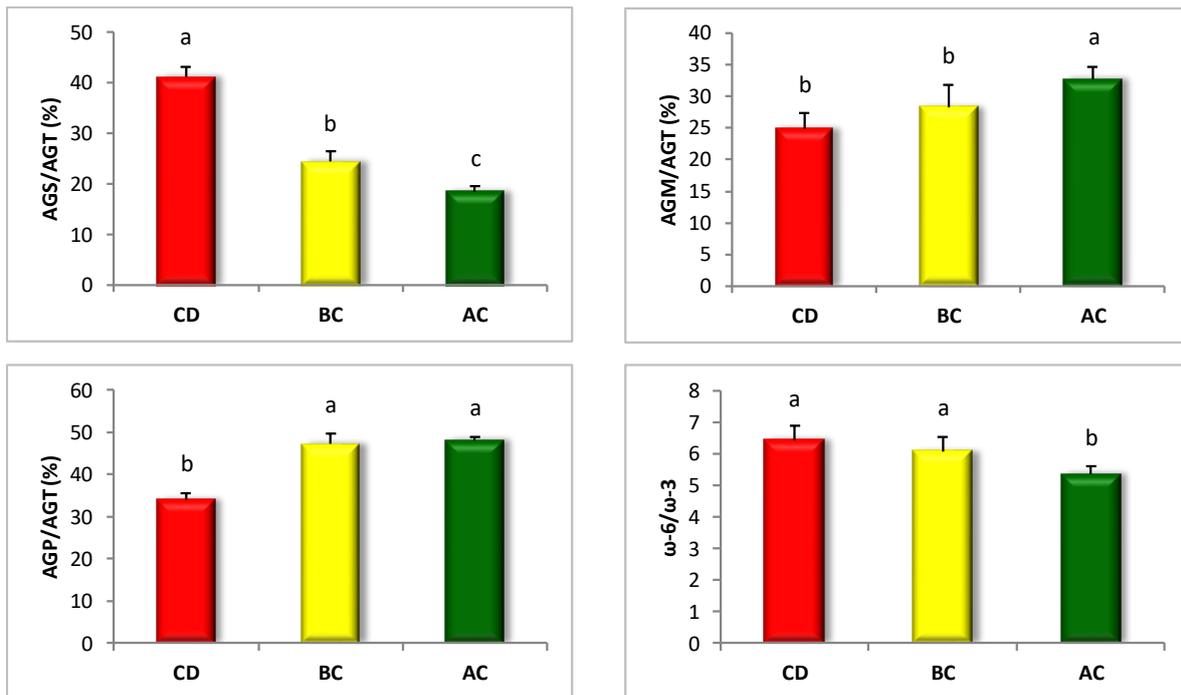


Figura 5.4.3. Perfil de ácidos grasos de cadena larga. Media \pm SEM de las relaciones AGS/TAG, AGM/TAG, AGP/AGT, y ω -6/ ω -3 en el hígado de ratas de los tres grupos experimentales.

5.4.3.5. *Contenido de grasa total y colesterol en materia fecal y AGCC en heces y contenido intestinal*

Las excreciones de grasa total fecal en los grupos alimentados con las dietas BC y AC fueron significativamente más altas ($p < 0.05$) que el grupo control (CD) (**Figura 5.4.4**), lo que se asocia con el mayor aporte de grasa que ofrecieron las dietas ricas en espinacas y tomate, principalmente por la presencia de carotenoides. Además, estos carotenoides fueron excretados en las heces cuantificándolos dentro del contenido de grasa total por la técnica de Soxhlet cómo puede verse en la cantidad de carotenoides excretados en heces (**Tabla 5.4.6**). Además, la suplementación con espinacas y tomate también condujo a una disminución significativa de los niveles de colesterol en heces (21% en BC y 42% en AC) al final del experimento. Esto se puede deber al efecto de los carotenoides sobre la regulación de la síntesis de colesterol hepática. Ya que al haber una mayor acumulación de colesterol a nivel hepático en el grupo CD, las células del hígado

no utilizan el colesterol en exceso que se podría estar generando de forma exógena y endógena, y por consiguiente aumenta la excreción de colesterol a través de las heces en el grupo CD en comparación con los grupos BC y AC.

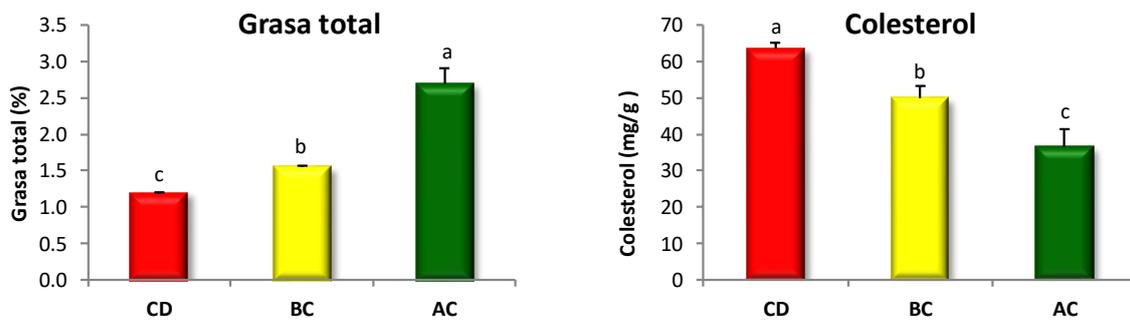


Figura 5.4.4. Grasa total y colesterol en las heces de los tres grupos experimentales. ^{a-c} Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como media \pm SEM.

Para completar el posible efecto de la suplementación de la dieta con espinacas y tomate, se evaluó el contenido de AGCC individuales en heces (acético, propiónico, butírico, valérico, isobutírico, isovalerico, isocaproico y caproico) y el total de AGCC, analizados tanto al inicio como al final del experimento (**Figura 5.4.5**). Respecto al contenido de AGCC detectados tras inducir la esteatosis y antes de iniciar el periodo de intervención, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, después de las cinco semanas del periodo experimental, la producción de AGCC se incrementó significativamente en todos los grupos de estudio (exceptuando el ácido propiónico del grupo CD), hallando diferencias significativas entre los valores iniciales y finales para los tres grupos CD, BC y AC. Además, se puede observar que los animales alimentados con las dietas suplementadas (BC y AC) presentaron significativamente una mayor producción de AGCC en heces que los animales alimentados con dieta estándar (CD), siendo los más abundantes el ácido

acético, propiónico, butírico y valérico, representando en promedio el 98% de AGCC presentes en las heces.

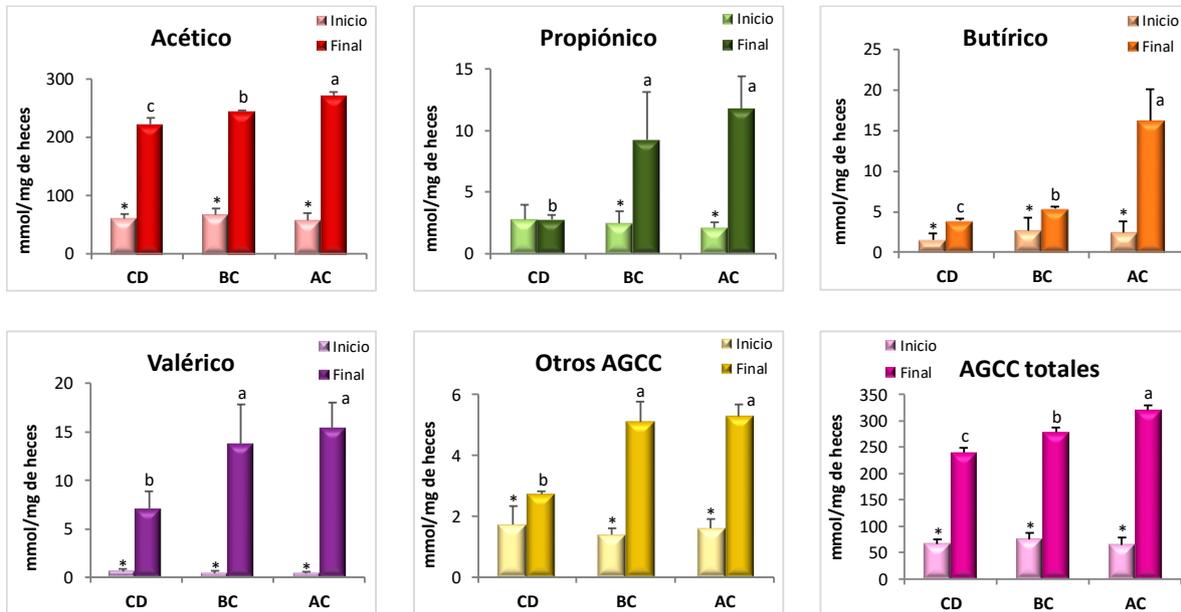


Figura 5.4.5. Concentración de AGCC individuales y otros minoritarios (isobutírico, isovalérico, isocaproico y caproico) en las heces. La altura de la barra indica el valor medio de cada condición de alimentación y la barra de error indica la desviación estándar. ^{a-c}Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$). *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), después de realizar una prueba *t* pareada, entre el comienzo y el final del experimento, para todos los grupos.

Teniendo en cuenta que los AGCC son volátiles y parte se puede perder cuando se analizan en heces, para las muestras de tiempo final se analizó también la presencia de AGCC en el contenido intestinal, que nos da una idea más real de su formación en el intestino, así como los principales AGCC que están disponibles para ser absorbidos vía porta y llegar al hígado donde pueden modular determinadas actividades metabólicas. Como se muestra en la **Tabla 5.4.8**, para los grupos BC y AC se observó un aumento significativamente la producción de AGCC en el contenido intestinal en comparación con la dieta normal. Si comparamos los resultados obtenidos en el grupo BC y AC con los obtenidos en el DC se observan, aumentos hasta 1.15 y 1.68 veces para acético, 2.08

y 3.04 veces para propiónico, 1.16 y 2.25 veces para butírico, 1.54 y 1.73 veces para valérico y 1.06 y 1.12 veces para otros AGCC (suma de isobutírico, isovalérico, isocaproico y caproico), respectivamente, aunque los cambios no fueron estadísticamente significativos para la producción del ácido butírico y otros AGCC en el grupo BC con respecto al control.

Como se puede observar en la **Figura 5.4.5** y en la **Tabla 5.4.8**, la producción de AGCC tanto en las heces como en el contenido intestinal fue dependiente de la cantidad aportada de espinacas y tomate en la dieta, sin embargo, en algunos AGCC (propiónico y valérico en heces, y butírico y valérico en contenido intestinal) no presentan diferencias significativas entre los grupos BC y AC, probablemente debido a la variabilidad de los datos.

Tabla 5.4.8. Concentración de AGCC (mmol/mg) en el contenido intestinal de los tres grupos experimentales¹.

Parámetros	CD	BC	AC
Acético	247.15±31.99 ^c	285.96±22.88 ^b	415.74±51.88 ^a
Propiónico	8.47±1.64 ^c	17.67±4.05 ^b	25.78±5.62 ^a
Butírico	26.59±5.2 ^b	30.93±10.8 ^b	60±12.01 ^a
Valérico	18.46±0.89 ^b	28.6±7.17 ^a	32.02±9.91 ^a
Otros AGCC	3.16±0.14 ^b	3.38±0.48 ^{ab}	3.56±0.48 ^a
AGCC totales	303.83±32.67 ^c	366.55±37.91 ^b	537.1±55.28 ^a

¹Los datos se expresan como media ± SEM. ^{a-c} Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre los grupos después de realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

El ratio entre la concentración de ácido acético y propiónico fue calculado, como un ratio indicador del riesgo cardiometabólico, en los tres grupos experimentales y para el contenido de AGCC en heces y en el contenido intestinal. Como se ilustra en la **Figura 5.4.6**, las ratas alimentadas con las dietas suplementadas redujeron significativamente el ratio de Ac:Pr en heces, en 64 y 71% en los grupos BC y AC, respectivamente, para las muestras de heces, y un 44% en BC y 46% en AC para el contenido intestinal, comparándolos con los valores del ratio obtenido en el grupo CD.

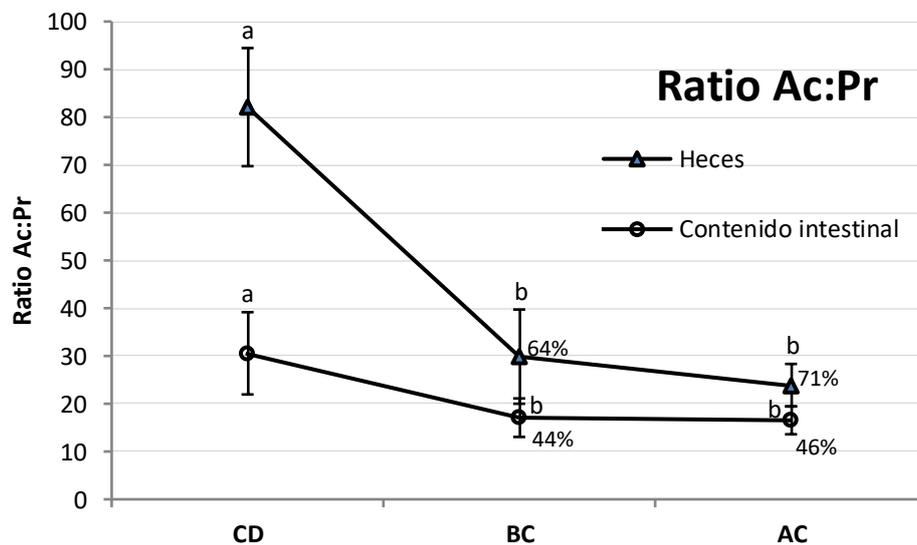


Figura 5.4.6. Cambios en el ratio de acético a propiónico (Ac:Pr) en heces y contenido intestinal. ^{a-c}Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Los cambios estadísticamente significativos (%) se indican en los gráficos ($p < 0.05$).

5.4.3.6. Identificación de los genes relacionados con la EHGNA

En la **Tabla 5.4.9** se muestran los 19 genes expresados diferencialmente ($p < 0.05$) con un cambio de fold change mayor que ± 1.5 , en el array comercial de hígado graso para los grupos experimentales BC y AC, utilizando como grupo de referencia el DC. Todos los genes con expresión diferencial revelaron una sobreexpresión del ARNm, al no obtener para ningún gen una expresión relativa inferior a la observada en el grupo DC, lo que determinaría un “fold change” negativo. Los cambios en la expresión relativa en los grupos BC y AC muestran que las dietas suplementadas con espinacas y tomate modificaron el transcriptoma del hígado. Así, en el grupo AC se observó una sobreexpresión significativa para los genes relacionados con la β -oxidación (*ACOX1*), el metabolismo de carbohidratos (*GSK3B*, *G6PC* y *RBPA*), el metabolismo y transporte de colesterol (*APOA1*, *CNBP*, *NRIH2* y *PPARD*) y apoptosis y señalización de insulina (*IGFBP1*, *NFKB1* y *SOCS3*). Mientras que para los animales del grupo BC, se sobreexpresaron dos genes relacionados con la β -oxidación (*ACOX1* y *ACADL*), dos genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (*G6PD* y *PDK4*), solo 1 gen relacionado con el metabolismo y transporte del colesterol (*CYP2E1*) y tres genes relacionados con la apoptosis y señalización de insulina (*IGFBP1*, *PIK3R1* y *PPARGCIA*), es de destacar, que en este grupo se sobreexpresaron los genes *ACSM3* y *HNF4A* involucrados en el metabolismo y transporte de lípidos.

Tabla 5.4.9. El símbolo del gen, el nombre del gen y el cambio relativo de los genes que mostraron un valor de expresión superior a 1.5 ($p < 0.05$) en los hígados de rata.¹

Símbolo	Nombre del gen	C-BC	C-AC
<i>β-oxidación de ácidos grasos</i>			
<i>Acox1</i>	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	4.4899	3.3974
<i>Acadl</i>	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	6.3239	-
<i>Metabolismo de carbohidratos</i>			
<i>Gsk3b</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	-	2.8736
<i>G6pd</i>	Glucose-6-phosphatase deshydrogenase	3.4979	-
<i>G6pc</i>	Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	-	3.0628
<i>Pdk4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	4.0687	-
<i>Rbp4</i>	Retinol binding protein 4, plasma	-	2.4863
<i>Transporte y metabolismo del colesterol</i>			
<i>ApoA1</i>	Apolipoprotein A-1	-	4.6452
<i>Cyp2e1</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	6.9253	-
<i>Cnbp</i>	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein	-	3.1198
<i>Nr1h2</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	-	1.7508
<i>Ppard</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	-	9.5545
<i>Transporte y metabolismo de otros lípidos</i>			
<i>Acsm3</i>	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	3.3228	-
<i>Hnf4a</i>	Hepatocyte nuclear factor 4, Alpha	4.9751	-
<i>Señalización insulínica y apoptosis</i>			
<i>Igfbp1</i>	Insulin-like growth factor binding protein 1	13.5559	10.963
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	-	3.9478
<i>Pik3r1</i>	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	2.8624	-
<i>Ppargc1a</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	2.3782	-
<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3	-	3.7375

¹El cambio en veces para cada gen en los grupos BC y AC se ha calculado tomando como referencia un valor de 1 para el grupo C.

5.4.3.7. Expresiones de la proteína *ACOX1*, *IGFBP1*, *LXR β* and *APOA1* en el hígado

De los resultados obtenidos en el estudio de la expresión génica, se seleccionaron 4 genes para evaluar si la sobreexpresión estaba relacionada con una mayor síntesis de proteínas. Así, el análisis de transferencia Western de los tejidos hepáticos de las ratas alimentadas con la dieta suplementada (BC y AC), reveló que la expresión de las proteínas *ACOX1* e *IGFBP1* aumentó significativamente, en los dos grupos, mientras que el nivel de proteína *LXR β* y *APOA1* solo aumentó significativamente en los hígados de ratas alimentadas con mayor porcentaje de carotenoides (AC) en comparación con las ratas alimentadas con CD. Por lo tanto, la suplementación de los piensos con la mezcla de espinacas y tomate, en comparación con el grupo CD, condujo a un incremento en la síntesis de *ACOX1* (CD, 1.0 vs BC y AC, 1.62 y 1.50, respectivamente), de *IGFBP1* (CD, 0.56 vs BC y AC, 1.81 y 1.52, respectivamente), de *LXR β* (CD, 2.43 vs AC, 3.90) y de *APOA1* (CD, 3.45 vs AC, 4.88) (**Figura 5.4.7**).

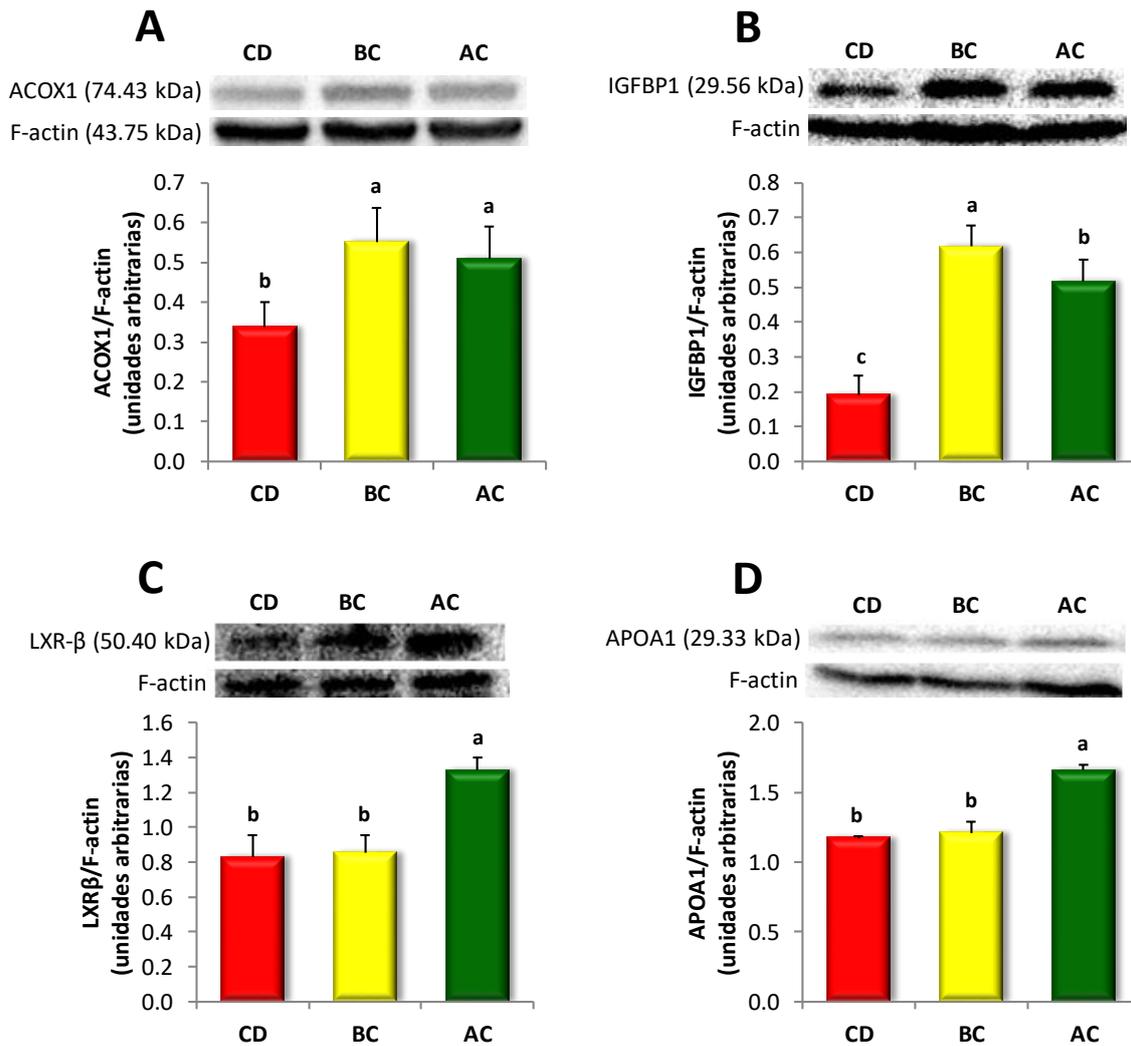


Figura 5.4.7. Efecto de la suplementación de la mezcla de espinaca y tomate en la dieta sobre los niveles de proteína (A) ACOX1, (B) IGFBP1, (C) LXR- β y (D) APOA1 medido por Western blot en muestras de hígado de rata. La imagen representativa de los experimentos por triplicado se muestra en el panel superior. El panel inferior muestra la intensidad de las bandas medidas densitométricamente y normalizadas a los niveles de expresión de proteína de F-actin. Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes $p < 0.05$.

5.4.4. Discusión

El objetivo principal del presente estudio ha sido evaluar el efecto de los principales carotenoides dietéticos (luteína, zeaxantina, β -caroteno y licopeno), aportados a partir de la suplementación del pienso con una mezcla de espinacas y tomate, en el tratamiento dietético de la esteatosis inducida por una dieta alta en grasa y azúcares en ratas Sprague Dawley. Los resultados obtenidos muestran una mejora significativa en muchos de los

marcadores relacionados con la enfermedad. Los carotenoides dietéticos son una parte importante del sistema de defensa antioxidante aportado por la dieta y diferentes estudios han descrito que su consumo puede tener un papel fundamental en la prevención y tratamiento de la esteatosis hepática, regulando las reacciones de oxidación, inflamación y modulando la expresión génica (Chamberlain *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2013; Xiao 2013; Martin-Pozuelo *et al.*, 2015; Matsuura *et al.*, 2016; Elvira-Torales *et al.*, 2018; Elvira-Torales *et al.*, 2019a).

5.4.4.1. *Ingesta de carotenoides y su acción en los biomarcadores de esteatosis*

Varios autores han señalado que una dieta alta en grasa, colesterol y fructosa son los principales impulsores del desarrollo y progresión de obesidad y esteatosis (Jarukamjorn *et al.*, 2016; Jensen *et al.*, 2018). En el presente estudio se utilizó una dieta aterogénica (21% de grasas y 1.25% de colesterol) y alta en fructosa (20%) para la inducción de esteatosis hepática durante 8 semanas. La enfermedad se confirmó mediante el análisis histopatológico del hígado y por el aumento de triglicéridos plasmáticos (TG) y de la actividad de las enzimas hepáticas en el plasma, los cuales estaban fuera del rango considerado normal (León-Goñi *et al.*, 2011). La ingesta específica de carotenoides de la mezcla de espinacas y tomate utilizada en nuestro estudio a la dosis de 4–8 mg/día, en función de que la dieta estuviera suplementada con bajo o alto contenido en carotenoides, grupos BC y AC, respectivamente. Teniendo en cuenta que el peso medio de las ratas estuvo en 0.5 kg, la dosis ingerida fue de 8 y 16 mg/kg/día, valores que se encuentran dentro de los que se han considerado seguros en diferentes estudios de toxicidad. Concretamente el Panel de la Autoridad Europea de Sanidad Alimentaria (EFSA), tras evaluar un estudio realizado con ratas, ha considerado una dosis máxima sin efecto adverso observado (NOAEL) de 500 mg/kg/día para el licopeno, 538 mg/kg/día para la

luteína y 150 mg/kg/día para la zeaxantina ya que, aunque se acumule en el hígado, la presencia de pigmentos sin alteraciones histopatológicas, no es relevante desde un punto de vista toxicológico (EFSA, 2008, EFSA, 2019).

En primer lugar, la suplementación de los piensos con los concentrados de tomate y espinacas fue suficiente para reducir el peso corporal de las ratas en un 5 y 8% de manera significativa. En personas con sobrepeso con riesgo metabólico, se ha demostrado que una reducción del 5% en el peso corporal reduce en un 58% la incidencia de diabetes tipo 2 (Tuomilehto *et al.*, 2001). En consecuencia, una pérdida de peso relativamente moderada es capaz de provocar mejorías en el control metabólico. Este hecho incide directamente sobre el tratamiento de la EHGNA, ya que el sobrepeso y la diabetes juegan un papel fundamental en la aparición de la enfermedad (Noureddin y Rinella, 2015; Mantovani *et al.*, 2018). Este efecto podría estar asociado a la menor ingesta calórica, pero también otros factores de las dietas experimentales pueden incidir control de peso como sería el mayor consumo de FDT. Paralelamente a los cambios observados en el peso corporal, la suplementación con la mezcla de espinacas y tomate mejoró el perfil lipídico del plasma, disminuyendo notablemente los niveles de glucosa, colesterol total, VLDL, triglicéridos, proteínas, ALT y AST, en comparación con el grupo control. Este efecto hipolipemiante de los carotenoides se ha descrito en otros estudios previos con animales obesos con EHGNA inducida por la dieta (Kim *et al.*, 2017, Jiang *et al.*, 2016). Este efecto se debe a diferentes mecanismos que pueden ejercer los carotenoides cuando se almacenan en el hígado. Así, se ha demostrado que el licopeno tiene un efecto hipocolesterolémico, al ser capaz de inhibir a la enzima limitante de la síntesis del colesterol la HMGCoA reductasa (Navarro-González *et al.*, 2014; Alvi *et al.*, 2016), aunque también es capaz de modular la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, observando un incremento de la β -oxidación lipídica debido

principalmente a la modulación de los genes involucrados en las rutas de señalización de los PPAR (Bernal *et al.*, 2013; Martin-Pozuelo *et al.*, 2015; Elvira-Torales *et al.*, 2018; Elvira-Torales *et al.*, 2019a). El efecto hipolipemiante e hipocolesterolemico estaría relacionado directamente con la acumulación de licopeno tras la ingesta, ya que este fue el carotenoide mayoritario en las dietas experimentales, y el único carotenoide que se encontró a nivel plasmático, con concentraciones que oscilaron entre 13 a 15 ng/mL, en función de concentración de licopeno en las dietas. Estos valores coinciden con los niveles de licopeno reportados por Luvizotto *et al.* (2013), quienes encontraron un valor medio de 12.67 ng de licopeno/mL, tras el consumo de 3.5 mg de este carotenoide por ratas Wistar. Paralelamente al incremento del licopeno se vio aumentada la capacidad antioxidante del plasma, medido como ORAC. El valor ORAC representa un parámetro bioquímico adecuado para evaluar el estado general de los antioxidantes (Prior *et al.*, 2003; Kusano y Ferrari, 2008) e incrementó tras el consumo de mezcla de espinacas y tomate en la dieta.

A pesar de no haber detectado en el plasma otros carotenoides diferentes al licopeno, los carotenoides presentes en los piensos experimentales se acumularon en el hígado mostrando el grupo AC un mayor contenido, aunque sin diferencias significativas con el grupo BC, a excepción de las concentraciones de luteína y fitoeno. Por lo tanto, los diferentes carotenoides, luteína, zeaxantina, fitoeno, β -caroteno y licopeno fueron absorbidos y acumulados en el hígado, para después incorporarse a las lipoproteínas para su liberación en la circulación (Sugiura *et al.*, 2014). En el hígado, estos micronutrientes ejercen un claro efecto antioxidante, participando de manera eficaz contra las especies de radicales libres, lo que se traduce en una menor lipoperoxidación y una disminución de MDA en este órgano. Este efecto se observó claramente en los grupos BC y AC, ya que en los hígados de las ratas que presentaron carotenoides los niveles de MDA fueron

significativamente inferiores al del grupo control, observando en este último una mayor acumulación de MDA como es resultado de la excesiva peroxidación lipídica causada por los radicales libres que conduce al estrés oxidativo (Janero, 1990). Este hecho también se refleja en otros biomarcadores de estrés oxidativo como el contenido de MDA en plasma y en orina. Estos datos, coinciden con los reportados por otros investigadores quienes observaron que algunos carotenoides como el licopeno, β -caroteno y luteína disminuyen el MDA en plasma e hígado en estudios *in vivo* (ratas y cobayos) con esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) inducida a través de una dieta alta en grasa, hipercolesterolémica o por tetracloruro de carbono (CCL₄) (Ozturk *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2016). Así, los carotenoides juegan un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo al evitar o retrasar la oxidación, al neutralizar radicales libres secuestrando al oxígeno singlete (Sugiura *et al.*, 2013), y por tanto la acumulación de carotenoides en el hígado se considera beneficiosa para la prevención y tratamiento de la EHGNA debido al papel en la disminución del daño oxidativo (Latief y Ahmad, 2018).

Aunque los carotenoides fueron absorbidos y acumulados en el hígado, un análisis fecal determinó que no se absorben el 100% de los carotenoides ingeridos, excretándose en las heces, tal y como han descrito otros autores (Shimizu *et al.*, 2006; Palozza *et al.*, 2011). Aunque siempre se busca la máxima absorción de estos compuestos bioactivos, son muchos los factores que pueden afectar a su absorción intestinal, por lo que hay que tener en cuenta que una proporción va a llegar al colon, donde puede ejercer un efecto en la microbiota intestinal o incluso como antioxidante para las células del colon (Periago *et al.*, 2016).

Estudios recientes en la EHGNA apuntan que una dieta alta en grasa y colesterol son factores clave para la activación de las vías inflamatorias implícitas en la transición de la EHGNA, que abarca desde una esteatosis hasta progresar a esteatohepatitis no

alcohólica (EHNA) a carcinoma hepatocelular en modelos animales (Vinué *et al.*, 2018). En el estudio actual se muestra la influencia de los carotenoides (grupos BC y AC), exhibiendo concentraciones más bajas de grasa total, colesterol total y triglicéridos hepáticos como los hallados en otras investigaciones con la suplementación de luteína, licopeno, astaxantina y β -caroteno (Qiu *et al.*, 2015; Piña Zentella 2016, Jia 2016, Elvira-Torales 2019). En el examen histológico, los hígados de los grupos BC y AC tuvieron una puntuación de esteatosis más baja que los del grupo CD. Es posible que, en los grupos suplementados con la mezcla de espinacas y tomate ricos en carotenoides, el colesterol del hígado se movilizara mediante LDL plasmático (Piña-Zentella *et al.*, 2016; Vinué *et al.*, 2018). Esto podría explicar la disminución del colesterol hepático en esta investigación. Además, tal y como se ha mencionado anteriormente otro de los posibles efectos hipocolesterolémico del licopeno, carotenoide mayoritario acumulado en el hígado, se debe a la inhibición de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), así como la regulación de la expresión génica implicada en el metabolismo lipídico (Navarro-González *et al.*, 2014; Martín-Pozuelo *et al.*, 2015; Alvi *et al.*, 2016). Cabe mencionar que a pesar de que en el estudio microscópico no se observó una recuperación completa de la esteatosis, son evidentes las diferencias en el tamaño de las vacuolas asociado con la ingesta de carotenoides. Asimismo, la ingesta de carotenoides dietéticos mostró un efecto positivo al disminuir los niveles de grasa total, colesterol total y triglicéridos hepáticos de manera efectiva, disminuyendo la acumulación de lípidos y ayudando a restablecer la función hepática. Además del colesterol y triglicéridos, también se analizaron los ácidos grasos como otro marcador del metabolismo lipídico. Determinados ácidos grasos, denominados bioactivos que incluyen los AGM y AGP, aportan beneficios a la salud modificando la concentración de los ácidos grasos en el hígado, modulando la actividad de las células hepáticas durante la fibrosis

hepática (Juárez-Hernández *et al.*, 2016). La ingesta de espinacas y tomate modificó significativamente el perfil de ácidos grasos en el hígado, incrementando las proporciones de AGM y AGP, y disminuyendo los AGS y la proporción de n-6/n-3. Este aumento de los AGM puede resultar beneficioso para la salud hepática, ya diferentes autores han demostrado que los AGM puede mejorar la resistencia a la insulina, aumentar la liberación de triglicéridos en el hígado, disminuir el flujo lipolítico del tejido adiposo periférico (Ferramosca y Zara 2014; Reyes-Quiroz *et al.*, 2014) e inhibir las quinasas relacionadas con el estrés oxidativo y la apoptosis (Pardo *et al.*, 2015) en modelos humanos y animales con EHGNA. En este estudio se encontraron en mayor proporción los AGP, sugiriendo que la acumulación de carotenoides hepáticos estimula la conversión de ácidos grasos en productos insaturados de cadena larga como lo mencionamos en un estudio anterior con la suplementación de espinacas en la dieta (Elvira-Torales *et al.*, 2019a). La producción de ALA (C18:3n-3 α), AET (C20:3n3), AEP (C20:5n-3) y ADH (C22:6n-3) se incrementaron en los grupos BC y AC, mejorando el perfil de ácidos grasos. En general, los AGP n-3 han demostrado tener efectos contra la obesidad, la esteatosis e inflamación (Tapia *et al.*, 2014), la glucosa y el metabolismo de lípidos (Burri *et al.*, 2011). Estos efectos podrían deberse a la estimulación del catabolismo de las grasas y a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Ferramosca y Zara, 2014). En nuestro estudio, el aumento de ácidos grasos n-3 se correlaciona de forma significativa con la disminución de los lípidos hepáticos encontrados en las ratas que acumularon carotenoides en el hígado. Además, la disminución en la relación n-6/n-3 tiene un efecto en la reducción del almacenamiento de triglicéridos hepáticos (Ferramosca y Zara, 2014), lo que contribuye al tratamiento de la esteatosis hepática inducida por la dieta alta en grasa y fructosa.

5.4.4.2. Cambios en la concentración de AGCC y su efecto prebiótico

Entre los posibles mecanismos de acción del aporte de espinacas y tomate a la dieta de mantenimiento de las ratas para el tratamiento de la esteatosis, se evaluó el efecto prebiótico midiendo los AGCC en heces y contenido intestinal de las ratas, ya que diferentes autores han descrito en ratas con esteatosis una disbiosis asociada al exceso de consumo de grasa (de Wit *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2015; Porras *et al.*, 2018). Se ha señalado que los AGCC son los productos finales de la fermentación de las fibras dietéticas por la microbiota intestinal anaeróbica, ejerciendo varios efectos benéficos sobre el metabolismo energético (den Besten *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que la fibra dietética está asociada con fitoquímicos como los fenólicos, carotenoides, lignanos, entre otros (Stevenson *et al.*, 2012; Liu, 2003), los cuales pueden proteger el tracto gastrointestinal del daño oxidativo, y así mismo, retrasar la aparición de cáncer de colon (Halliwell *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2014). La ingesta de espinacas y tomate mejoró el perfil de AGCC, aumentando de manera importante el acético, propiónico, butírico, valérico y otros minoritarios en heces y contenido intestinal, lo que es indicativo de cambios en la microbiota intestinal. Este incremento se ve influenciado por la cantidad administrada de la mezcla de estos vegetales en la dieta. A pesar de que se ve un incremento del butírico y otros AGCC en el contenido intestinal, no fueron significativos en el grupo BC, debido principalmente a la gran variabilidad de los datos. Es importante mencionar que las ratas alimentadas con la mezcla de espinacas y tomate consumieron diariamente un contenido mayor de carotenoides y un contenido similar tanto de FDT como de compuestos fenólicos. Estos hallazgos sugieren que probablemente la FDT y los compuestos fenólicos no influyen totalmente en la producción de AGCC, ya que tanto en el grupo AC como en el BC se observa un aumento de AGCC en heces y contenido intestinal. En un estudio anterior mencionamos que la ingesta de zumo de tomate a ratas

con esteatosis inducida a través de la dieta mejoró parcialmente las alteraciones provocadas por la dieta alta en grasa, incrementando significativamente la cantidad de *Lactobacillus*, disminuyendo así mismo la proporción Ac:Pr, indicando una posible mejora en la EHGNA. Asimismo, en otro estudio señalamos que la suplementación con espinacas a ratas Sprague Dawley mejoró parcialmente la cuenta de *Lactobacillus*, modulando la microbiota intestinal, y reduciendo así mismo la glucosa, colesterol total y colesterol LDL. Sin embargo, la mejora observada en el perfil de AGCC no se pudo explicar por los cambios menores en la microbiota intestinal (Elvira-Torales *et al.*, 2019b). Además, otro estudio realizado en modelos murinos observó que después del consumo de dietas suplementadas con tomate cherry aumentó la producción de propionato y en menor medida butirato y acetato en el ciego de las ratas (Hwang *et al.*, 2014). Además de inducir cambios en la microbiota intestinal, Lyu *et al.* (2018) mencionan que los carotenoides como el β -caroteno (en la forma de metabolito del ácido retinoico) y la astaxantina pueden favorecer la homeostasis inmune a nivel intestinal regulando de manera puntual la producción de inmunoglobulina A (IgA), previniendo o protegiendo el desarrollo de disbiosis intestinal y así regular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y AGCC (Lyu *et al.*, 2018). Las bacterias intestinales desempeñan un papel importante en la degradación de polifenoles de la dieta en ácidos fenólicos más simples con actividades antioxidantes (Pasinetti *et al.*, 2018). Estudios epidemiológicos han indicado que la ingesta dietética de compuestos fenólicos está asociada con beneficios a la salud, en especial con una reducción del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hooper *et al.*, 2008). Los resultados en nuestro estudio muestran un efecto prebiótico con el consumo de la mezcla de espinacas y tomate. Los cambios en el perfil de AGCC en las ratas que ingirieron estos vegetales podría deberse no solo al aporte de fibra dietética y de compuestos fitoquímicos, sino a la

presencia de carotenoides, y aunque el efecto prebiótico de los compuestos fenólicos ha sido estudiado en diferentes investigaciones (Cardona *et al.*, 2013; Ozdal *et al.*, 2016), el efecto de los carotenoides y su relación con la microbiota intestinal es un campo todavía sin explorar.

5.4.4.3. *Componentes bioactivos de espinacas y tomate modulan la expresión génica relacionada con la esteatosis*

Para revelar el mecanismo terapéutico de los carotenoides presentes en la mezcla de espinacas y tomate en la prevención y tratamiento de la esteatosis hepática, realizamos experimentos de micromatrices de ADN utilizando tejidos hepáticos de ratas Sprague Dawley, ya que los carotenoides son capaces de modular la expresión génica a través de los receptores nucleares (Sharoni *et al.*, 2016). Además, en estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación observamos que los carotenoides presentes en el zumo de tomate y en las espinacas pueden modular la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico involucrados en la enfermedad de hígado graso (Martín-Pozuelo *et al.*, 2015, Elvira-Torales *et al.*, 2018; Elvira-Torales *et al.*, 2019a). En este estudio observamos que la ingesta de una dieta rica en carotenoides, tras la inducción de esteatosis, conlleva cambios en la expresión de genes relacionados con la enfermedad de hígado graso. Tanto en el grupo BC como en el AC se sobreexpresaron un gran número de genes en comparación con el grupo suplementado con dieta estándar (CD). Se observó la sobreexpresión del gen *ACOX1*, el cual está relacionado con la β -oxidación; tanto la acumulación de lípidos como la síntesis de lipoproteínas favorecen la expresión de este gen, llevando a cabo la oxidación lipídica peroxisomal, y en consecuencia rehabilitando la homeostasis de los lípidos hepáticos en los grupos suplementados con espinacas y tomate. También se expresó en exceso *ACADL* en el grupo BC, la cual codifica una

enzima deshidrogenasa que cataliza el paso inicial en cada ciclo de β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (Thorpe *et al.*, 1995), este efecto también fue descrito tras el consumo de zumo de tomate en ratas con esteatosis (Martín-Pozuelo *et al.*, 2015).

En relación con el metabolismo de carbohidratos, se observó una sobreexpresión de *GSK3B*, *G6PC* y *RBP4* en el grupo AC. La *GSK3B* que codifica la serina/treonina quinasa, actuando como un regulador negativo en el control hormonal de la homeostasis de la glucosa y el desarrollo de la resistencia a la insulina, mediante la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa (Lee y Kim, 2007). El gen *G6PC* codifica la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa que cataliza la reacción final en la producción de glucosa, por lo tanto, es una enzima clave en la homeostasis de la glucosa en el hígado (Berlanga *et al.*, 2014). Además, el gen *RBP4* es un portador específico de retinol (vitamina A) en la sangre, reconocido como un biomarcador de inflamación y resistencia a la insulina (Zabetian-Targhi *et al.*, 2015), por ende, al tener una un adecuado nivel de vitamina A, se produce una mayor secreción de la proteína de unión, resultando en un suministro apropiado de carotenoides pro-vitamina A (β -caroteno). Los genes *G6PD* y *PDK4* se sobreexpresaron en el grupo BC. La *G6PD* produce NADPH celular, requerida para la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, así mismo, desempeña un papel importante en la adipogénesis, relacionando su incremento con la desregulación del metabolismo lipídico y la resistencia a la insulina (Dore *et al.*, 2017). Por otra parte, el *PDK4* desempeña un rol valioso en el metabolismo de la glucosa, regulando la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) (Zhang *et al.*, 2018).

Además, los genes implicados en el transporte y metabolismo del colesterol aumentaron su actividad sobreexpresando la *APOA1*, *CNBP*, *NR1H2* y *PPARD* en el grupo AC. El gen *APOA1* codifica la apolipoproteína A-1, que es la proteína principal de las HDL en plasma, promoviendo la salida de colesterol de los tejidos al hígado para su

posterior excreción. Por lo tanto, un consumo alto en carotenoides podría estar promoviendo sus propiedades ateroprotectoras, además de modular los procesos asociados con la deposición de lípidos en el hígado provocados por la dieta y el progreso de la EHGNA (Karavia *et al.*, 2012). *CNBP* funciona como un regulador negativo en el control del metabolismo del colesterol (Lusis *et al.*, 1990). *LXRB* (*NR1H2*) es un regulador metabólico clave de la función de los macrófagos, controlando la homeostasis del colesterol y ácidos grasos a nivel transcripcional (Becares *et al.*, 2019). Además, tanto el *LXRB* y el *PPARD* forman heterodímeros con el receptor retinoide X (RXR). Se ha demostrado que los trastornos metabólicos vinculados con la obesidad se pueden aliviar por medio de la activación del *PPARD* (Chen 2018). El *CYP2E1* se expresó en exceso en ratas BC incrementándose la actividad catabólica del colesterol (Musso *et al.*, 2009).

La ingesta de espinacas y tomate moduló el metabolismo de los lípidos en el grupo BC, sobreexpresando el gen *ACSM3*, el cual codifica una proteína participante en la síntesis de los ácidos grasos de cadena media, mostrando un incremento del metabolismo de los lípidos. Como se mencionó en un estudio previo, la actividad de esta proteína codificada facilita la oxidación de ácidos grasos de cadena media (C4 a C11), por tal motivo, las ratas alimentadas con carotenoides tuvieron una relación AGS/TAG menor a nivel hepático (Elvira-Torales *et al.*, 2019a), las cuales se pueden observar en la **Figura 5.4.2**. El gen *HNF4A* codifica la proteína del factor de transcripción nuclear que se une al ADN, controlando la expresión de varios genes hepáticos (factor 1 alfa del hepatocito nuclear), regulando así mismo, los genes implicados en el metabolismo de colesterol, ácidos grasos y glucosa (Chen *et al.*, 2014; Babeu *et al.*, 2014).

La ingesta de espinacas y tomate también moduló los genes implicados en la señalización de insulina y apoptosis. Tanto en el grupo BC como en el AC se observó una sobreexpresión del gen *IGFBP1*, el cual codifica una proteína con un dominio N-terminal

de *IGFBP* y un dominio tipo I de tiroglobulina, además es una de las seis *IGFBP* que se une y regula la biodisponibilidad del crecimiento de tipo insulínico (IGF-1) (Firth y Baxter, 2002). Estudios anteriores han demostrado que el licopeno puede inhibir la proliferación de células cancerosas al interferir con el sistema IGF, hallando que el licopeno reduce la señalización del receptor IGF-1 al incrementar las concentraciones de *IGFBP* (Vrieling *et al.*, 2007). Es importante señalar que los genes *NFKB1* y *SOCS3* se sobreexpresaron en el grupo AC, resultando beneficioso para la salud hepática, ya que estos genes contribuyen en la lucha contra los procesos inflamatorios y apoptóticos, actuando de manera puntual en la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática y el carcinoma hepatocelular (CHC) (Luedde y Schwabe 2011, Pasricha *et al.*, 2015). Por otra parte, en el grupo BC se sobreexpresó *PIK3R1*, el cual codifica la subunidad reguladora de 85 kD. Este gen se ve disminuido en algunos tipos de cánceres (próstata, pulmón, vejiga e hígado) en humanos, existiendo la posibilidad de que p85 posea propiedades supresoras de tumores (Taniguchi *et al.*, 2010). Además, en este grupo bajo en carotenoides se expresó al alza el gen *PPARGCIA* que codifica a la proteína PGC-1 α , la cual interactúa con varios receptores nucleares (RNs). Estos RNs regulan diversos genes mitocondriales que mantienen el metabolismo energético, la función mitocondrial y la biogénesis (Handschin y Spiegelman, 2006; Gerhart-Hines *et al.*, 2007; Fernandez-Marcos y Auwerx, 2011). Por lo que la ingesta de espinacas y tomate a través de la dieta conduce a una regulación positiva de los genes involucrados en la señalización de insulina encontrados en este estudio, proporcionando un efecto protector frente a la EHGNA. En este estudio confirmamos que los tratamientos con espinacas y tomate ricos en carotenoides inducen la β -oxidación de los ácidos grasos peroxisomal a través del *ACO1*, regulan la respuesta insulínica a mediante la *IGFBP1*, controlan la homeostasis del colesterol y ácidos grasos por medio de *LXRB*, además, promueven la salida del

colesterol de los tejidos al hígado para su posterior excreción gracias a la *APOA1*. Por lo tanto, estas proteínas son reguladoras importantes involucradas en los efectos anti-lípidos y anti-glucémicos de la mezcla de espinacas y tomate, proponiendo una nueva perspectiva del valor nutricional de los carotenoides dietéticos, procedentes del tomate y de las espinacas en el tratamiento de la EHGNA.

REFERENCIAS

- Alvi SS, Iqbal D, Ahmad S, Khan MS. Molecular rationale delineating the role of lycopene as a potent HMG-CoA reductase inhibitor: in vitro and in silico study. *Nat Prod Res*. 2016; 30(18): 2111–2114.
- Anson NM, Havenaar R, Vaes W, Coulier L, Venema K, Selinheimo E, et al. Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production in vitro and postprandial plasma concentrations in men. *Food Chem*. 2011; 128(2): 404–409.
- AOAC. Official methods of analysis. Official Method 930.15, 954.01, 920.39 y 942.05. 15th ed. Helrich K, editor. Virginia, EE. UU.: Association of Official Analytical Chemists. 1990. p. 70–79.
- Babeu JP, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(1): 22–30.
- Becares N, Gage MC, Voisin M, Shrestha E, Martin-Gutierrez L, Liang N, et al. Impaired LXR α Phosphorylation Attenuates Progression of Fatty Liver Disease. *Cell Rep*. 2019; 26(4): 984–995.e6.
- Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*. 1976; 70(1): 241–250.
- Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014; 7: 221–239.
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M, Periago MJ. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(11): 1870–1881.
- 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(9): 2467–2474.
- Burri L, Berge K, Wibrand K, Berge RK, Barger JL. Differential effects of krill oil and fish oil on the hepatic transcriptome in mice. *Front Genet*. 2011; 2: 45.
- Calzadilla Bertot L, Adams LA. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(5): E774.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(8): 1415–1422.
- Chamberlain SM, Hall JD, Patel J, Lee JR, Marcus DM, Sridhar S, et al. Protective effects of the carotenoid zeaxanthin in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2009; 54(7): 1460–1464.
- Chamberlain SM, Hall JD, Patel J, Lee JR, Marcus DM, Sridhar S, et al. Protective effects of the carotenoid zeaxanthin in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2009; 54(7): 1460–1464.
- Chen KT, Pernelle K, Tsai YH, Wu YH, Hsieh JY, Liao KH, et al. Liver X receptor α (LXR α /NR1H3) regulates differentiation of hepatocyte-like cells via reciprocal regulation of HNF4 α . *J. Hepatol*. 2014; 61(6): 1276–1286.
- de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012; 303(5): G589–G599.

den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013; 54(9): 2325–2340.

Dore MP, Vidili G, Marras G, Assy S, Pes GM. Inverse association between glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19(4): 1069–1073.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Safety and efficacy of lutein and lutein/zeaxanthin extracts from *Tagetes erecta* for poultry for fattening and laying (except turkeys). *The EFSA Journal.* 2019; 17(5): 5698.

Elvira-Torales LI, Martín-Pozuelo G, González-Barrio R, Navarro-González I, Pallarés FJ, Santaella M, et al. Ameliorative effect of spinach on non-alcoholic fatty liver disease induced in rats by a high-fat diet. *Int J Mol Sci.* 2019a; 20(7): 1662.

Elvira-Torales LI, Navarro-González I, González-Barrio R, Martín-Pozuelo G, Doménech G, Seva J, et al. Tomato juice supplementation influences the gene expression related to steatosis in rats. *Nutrients.* 2018; 10(9): 1215.

Elvira-Torales LI, Periago MJ, González-Barrio R, Hidalgo N, Navarro-González I, Gómez-Gallego C, et al. Spinach consumption ameliorates the gut microbiota and dislipaemia in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Food Funct.* 2019b; 10(4): 2148–2160.

Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(4): 884S–890S.

Ferramosca A, Zara V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(7): 1746–1755.

Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002; 23(6): 824–854.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497–509.

Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011; 141(5): 1572–1585.

Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* 2007; 26(7): 1913–1923.

Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?. *Free Radic Res.* 2000;33(6): 819–830.

Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* 2006; 27(7): 728–735.

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(7): 344–349.

Hijona E, Hijona L, Larzabal M, Sarasqueta C, Aldazabal P, Arenas J, Bujanda L. Biochemical determination of lipid content in hepatic steatosis by the Soxtec method. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(12): 1495–1499.

Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(1): 38–50.

Hwang D, Koh JH, Lee J, Kim Y, Lim YH. Cherry tomato supplementation increases the area of the

intestinal mucosa and the number of muscle layers in rats. *Food Res Int.* 2014; 64: 298–304.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9(6): 515–540.

Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica (Cairo).* 2016; 2016: 5029414.

Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018; 68(5): 1063–1075.

Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10180–10188.

Juárez-Hernández E, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Barbero-Becerra VJ. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr J.* 2016; 15(1): 72.

Karavia EA, Papachristou DJ, Liopeta K, Triantaphyllidou IE, Dimitrakopoulos O, Kypreos KE. Apolipoprotein A-I modulates processes associated with diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Mol Med.* 2012; 18: 901–912.

Kavanaugh CJ, Trumbo PR, Ellwood KC. The U.S. Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(14): 1075–1085.

Kim JE, Clark RM, Park Y, Lee J, Fernandez ML. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *Nutr Res Pract.* 2012; 6(2): 113–119.

Kim JS, Ha TY, Kim S, Lee SJ, Ahn J. Red paprika (*Capsicum annuum* L.) and its main carotenoid capsanthin ameliorate impaired lipid metabolism in the liver and adipose tissue of high-fat diet-induced obese mice. *J Funct Foods.* 2017; 31: 131–140.

Kusano C, Ferrari B. Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology.* 2008; 7(1): 1–15.

Lan QY, Zhang YJ, Liao GC, Zhou RF, Zhou ZG, Chen YM, Zhu HL. The association between dietary vitamin A and carotenes and the risk of primary liver cancer: A case-control study. *Nutrients.* 2016; 8(10): E624.

Latief U, Ahmad R. Role of dietary carotenoids in different etiologies of chronic liver diseases. In: Valero Díaz A, García-Gimeno RM, editors. *Descriptive food science.* London, United Kingdom: IntechOpen; 2018. p. 93–112.

Lee J, Kim MS. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77(Suppl 1): S49–S57.

León-Goñi A.C, 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 Electron. Vet.* 2011; 12(11): 1–10.

Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3 Suppl): 517S–520S.

Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8(2): 108–18.

Lusis AJ, Rajavashisth TB, Klisak I, Heinzmann C, Mohandas T, Sparkes RS. Mapping of the gene for CNBP, a finger protein, to human chromosome 3q13.3-q24. *Genomics.* 1990; 8(2): 411–414.

Luvizotto Rde A, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br J Nutr.* 2013; 110(10): 1803–1809.

Lyu Y, Wu L, Wang F, Shen X, Lin D. Carotenoid supplementation and retinoic acid in immunoglobulin A regulation of the gut microbiota dysbiosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018; 243(7): 613–620.

Maiani G, Periago Castón MJ, Catasta G, Toti E, Cambrodón IG, Bysted A, et al. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(2): S194–S218.

Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, Targher G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2018; 41(2): 372–382.

Martín-Pozuelo G, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J, Hidalgo N, et al. The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur J Nutr.* 2015; 54(6): 933–944.

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(1): 76–82.

Matsuura B, Miyake T, Yamamoto S, Furukawa S, Hiasa Y. Usefulness of Beta-cryptoxanthin for nonalcoholic fatty liver diseases. *J Food Nutr Disord.* 2016; 5:3.

Mencin AA, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Current Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14(2): 151–157.

Müller L, Caris-Veyrat C, Lowe G, Böhm V. Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases—a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56(11): 1868–1879.

Murillo AG, DiMarco DM, Fernandez ML. The potential of non-provitamin A carotenoids for the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Biology.* 2016; 5(4): 42.

Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015; 18(5): 515–520.

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): 1–26.

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.

Noureddin M, Rinella ME. Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes, obesity, and hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis.* 2015; 19(2): 361–379.

Ozidal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients.* 2016; 8(2): 78.

Ozturk F, Gul M, Ates B, Ozturk IC, Cetin A, Vardi N, Otlu A, Yilmaz I. Protective effect of apricot (*Prunus armeniaca* L.) on hepatic steatosis and damage induced by carbon tetrachloride in Wistar rats. *Br J Nutr.* 2009; 102(12): 1767–1775.

Palozza P, Simone RE, Catalano A, Mele MC. Tomato lycopene and lung cancer prevention: from experimental to human studies. *Cancers (Basel).* 2011; 3(2): 2333–2357.

Pardo V, Gonzalez-Rodriguez A, Muntane J, Kozma SC, Valverde AM. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem. Toxicol.* 2015; 80: 298–309.

Pasinetti GM, Singh R, Westfall S, Herman F, Faith J, Ho L. The role of the gut microbiota in the metabolism of polyphenols as characterized by gnotobiotic mice. *J Alzheimers Dis.* 2018; 63(2) :409–421.

Pasricha S, Kenney-Hunt J, Anderson K, Jafari N, Hall RA, Lammert F, et al. Identification of eQTLs for hepatic Xbp1s and Socs3 gene expression in mice fed a high-fat, high-caloric diet. *G3 (Bethesda).* 2015; 5(4): 487–496.

Periago MJ, Martín-Pozuelo G, Gonzalez-Barrio R, Santaella M, Gómez V, Vazquez N, et al. Effect of tomato juice consumption on the plasmatic lipid profile, hepatic HMGR activity, and fecal short chain fatty acids content of rats. *Food Funct.* 2016; 7(10): 4460–4467.

Piña-Zentella RM, Rosado JL, Gallegos-Corona MA, Madrigal-Pérez LA, García OP, Ramos-Gomez M. Lycopene improves diet-mediated recuperation in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Food.* 2016; 19(6): 607–614.

Pirayesh Islamian J, Mehrali H. Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview. *Cell J.* 2015; 16(4): 386–391.

Porrás D, Nistal E, Martínez-Flórez S, González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S. Intestinal microbiota modulation in obesity-related non-alcoholic fatty liver disease. *Front Physiol.* 2018; 9: 1813.

Prior RL, Hoang HA, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance

capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(11): 3273–3279.

Prosky L, Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF. Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985; 68(4): 677–679.

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.

Reyes-Quiroz ME, Alba G, Saenz J, Santa-María C, Geniz I, Jiménez J, et al. Oleic acid modulates mRNA expression of liver X receptor (LXR) and its target genes ABCA1 and SREBP1c in human neutrophils. *Eur. J. Nutr.* 2014; 53(8): 1707–1717.

Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc.* 1996; 96(7), 693–702.

Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. Use of lycopene as a food colour. *The EFSA Journal.* 2008; 674: 1–66.

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(23): 7005–7010.

Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K, Khanin M, Salman H, Veprik A, Danilenko M, Levy J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016; 56(2): 259–269.

Shimizu F, Ogawa M, Fukuba H. Accumulation and excretion of carotenoids after regular ingestion of carrot juice with a lycopene-free diet. *J Home Econ Jpn.* 2006; 57(3): 151–157.

- Stevenson L, Phillips F, O'Sullivan K, Walton J. Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *Int J Food Sci Nutr*. 2012; 63(8): 1001–1013.
- Sugiura M, Ogawa K, Yano M. Absorption, storage and distribution of β -cryptoxanthin in rat after chronic administration of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* MARC.) juice. *Biol Pharm Bull*. 2013; 36(1): 147–151.
- Sugiura M, Ogawa K, Yano M. Comparison of bioavailability between beta-cryptoxanthin and beta-carotene and tissue distribution in its intact form in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014; 78(2): 307–310.
- Taniguchi CM, Winnay J, Kondo T, Bronson RT, Guimaraes AR, Alemán JO, et al. The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85 α can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer Res*. 2010; 70(13): 5305–5315.
- Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Mañán D, et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- α upregulation and NF- κ B DNA binding abrogation. *Mol Nutr Food Res*. 2014; 58(6): 1333–1341.
- Thorpe C, Kim JJ. Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J*. 1995; 9(9): 718–725.
- Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001; 344(18): 1343–1350.
- Vinué Á, Herrero-Cervera A, González-Navarro H. Understanding the impact of dietary cholesterol on chronic metabolic diseases through studies in rodent models. *Nutrients*. 2018; 10(7): E939.
- Vrieling A, Voskuil DW, Bonfrer JM, Korse CM, van Doorn J, Cats A, et al. Lycopene supplementation elevates circulating insulin-like growth factor–binding protein-1 and -2 concentrations in persons at greater risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86: 1456–1462.
- Wang L, Ding C, Zeng F, Zhu H. Low Levels of Serum β -Carotene and β -Carotene/Retinol Ratio Are Associated with Histological Severity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Ann Nutr Metab*. 2019; 74: 156–164.
- Xiao J, Liong EC, Ching YP, Chang RCC, et al. Lycium barbarum polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury. *Nutr Diabetes*. 2013; 3(7): e81.
- Xiao J, Liong EC, Ching YP, Chang RCC, Fung ML, Xu AM, et al. Lycium barbarum polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis-induced injury. *Nutr Diabetes*. 2013; 3(7): e81.
- Yilmaz B, Sahin K, Bilen H, Bahcecioglu IH, Bilir B, Ashraf S, et al. Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015; 4(3):161–171.
- Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 15(1): 11–20.
- Zabetian-Targhi F, Mahmoudi MJ, Rezaei N, Mahmoudi M. Retinol binding protein 4 in relation to diet, inflammation, immunity, and cardiovascular diseases. *Adv Nutr*. 2015; 6(6): 748–762.
- Zeng H, Lazarova DL, Bordonaro M. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World J Gastrointest Oncol*. 2014; 6(2): 41–51.
- Zhang M, Zhao Y1, Li Z, Wang C. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 mediates lipogenesis and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic

steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 495(1): 582–586.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados en la presente Tesis Doctoral nos han llevado a obtener la siguiente conclusión general:

El aporte de carotenoides dietéticos, a partir de alimentos ricos en licopeno, luteína, zeaxantina y β -caroteno, conduce a una acumulación de los mismos en el hígado donde actúan como antioxidantes hepáticos, a la vez que intervienen en otras funciones como la modulación de genes involucrados en rutas de señalización celular y rutas metabólicas, lo que se traduce en una disminución de diferentes biomarcadores relacionados con la prevención y tratamiento de la esteatosis. Además, el aporte de carotenoides en el formato de alimento constituye una forma saludable y segura, a la vez que se incorporan en la dieta otros compuestos que influyen en la microbiota intestinal, la cual se encuentra alterada en la esteatosis.

Teniendo en cuenta los objetivos específicos marcados en los diferentes estudios, hemos obtenido las siguientes conclusiones parciales:

Primera: El consumo de zumo de tomate mejora la expresión de los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos, reduciendo así la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol, evitando su acumulación y modulando la progresión de la esteatosis. Además, el licopeno acumulado en el hígado actúa como un antioxidante hepático, mejorando el equilibrio redox en ratas sanas. Aunque no se observaron cambios en los biomarcadores del estrés oxidativo en animales con esteatosis que habían consumido zumo de tomate, la acumulación de licopeno parece mejorar los niveles de algunos aminoácidos relacionados con los mecanismos antioxidantes y modular la

expresión de los factores nucleares responsables de la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis celular, como *FXR* y *HNF4A*. Por lo tanto, según los resultados obtenidos, los tomates y los productos derivados del tomate se pueden considerar como parte de una estrategia dietética en el control y tratamiento de la EHGNA, como fuentes naturales y seguras de licopeno.

Segunda: El consumo de espinacas y la acumulación de carotenoides en el hígado redujo el contenido de AGS, la relación de ácidos grasos ω -6/ ω -3 y el colesterol, y aumentó el nivel de AGM y AGP. Estos cambios se vieron acompañados una modulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y colesterol, principalmente a través de la sobreexpresión de PPARs, así como la de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.

Tercera: El estado de esteatosis causó una alteración de la microbiota intestinal, el patrón de ácidos grasos volátiles de cadena corta y el contenido de catabolitos fenólicos de origen microbiano, debido al exceso de grasa en la dieta. La suplementación con espinacas mejoró parcialmente algunas de estas alteraciones, aumentando el número de *Lactobacillus*, reduciendo la glucosa en ayunas y el colesterol total y LDL y previniendo el exceso de la acumulación de colesterol en el hígado. Los efectos sugieren una acción combinada de los diferentes componentes proporcionados por las dietas (carotenoides, fibra, compuestos fenólicos), así como de productos del metabolismo microbiano, como catabolitos fenólicos (por ejemplo, ácido 4-hidroxibenzoico) y ácidos grasos volátiles de cadena corta, por lo que la administración de los carotenoides a modo de alimento puede tener mejores efectos que cuando se administran en formato nutracéutico.

Cuarta: La administración de espinacas y tomate, como fuente de carotenoides dietéticos, mejoran los biomarcadores de esteatosis, disminuyendo considerablemente los niveles sanguíneos de glucosa, colesterol total, VLDL, TG, ALT, AST, aliviando a nivel hepático las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, AGS, aumentando los niveles de AGM y AGP. Estos cambios están parcialmente explicados por la modulación de genes relacionados con el metabolismo lipídico y otras rutas metabólicas de la enfermedad de hígado graso, incrementando las proteínas involucradas en la β -oxidación, metabolismo de colesterol y señalización de insulina, principalmente a través de la sobreexpresión de *ACOX1*, *APOA1*, *NR1H2 (LXR)* e *IGFBP1*. Además, los carotenoides al acumularse en el hígado desarrollaron un efecto antioxidante, reduciendo la peroxidación lipídica en el plasma, hígado y orina, con una disminución del MDA como biomarcador de estrés oxidativo, e incrementando la capacidad antioxidante en el plasma. Otro de los cambios estuvo relacionado con los procesos de formación de ácidos grasos volátiles de cadena corta, ya la presencia de espinacas y tomate en la dieta se relacionó con un incremento de estos metabolitos, tanto en heces como en contenido intestinal, aumentando el ratio Ac:Pr lo que se asocia a una disminución del riesgo cardiometabólico, asociado a la presencia de otros componentes nutricionales, principalmente fibra.

7. RESUMEN/ABSTRACT

7. RESUMEN/ABSTRACT

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), considerada actualmente como una de las patologías hepáticas crónicas más frecuentes en el mundo, representa un problema clínico grave y en aumento en los países desarrollados y en vías de desarrollo. En la presente Tesis Doctoral, se diseñaron tres estudios experimentales con el objetivo de evaluar la funcionalidad de los carotenoides dietéticos, proporcionados por el tomate y las espinacas, en la prevención y tratamiento de la esteatosis.

En el estudio 1 se utilizaron 24 ratas macho de 8 semanas de edad, que se agruparon en cuatro grupos experimentales ($n=6$), alimentándolas durante 5 semanas con diferentes dietas y bebidas: NA (dieta estándar y agua), NL (dieta estándar y zumo de tomate), HA (dieta gras y agua) y HL (dieta grasa y zumo de tomate). Después del periodo experimental, se procedió al sacrificio, recolectando las muestras biológicas, en las que se analizaron los parámetros bioquímicos, los biomarcadores de estrés oxidativo, los metabolitos hepáticos y la expresión génica. Los carotenoides se acumularon en los animales que ingirieron el zumo de tomate, siendo mayor la acumulación al tomarlo con grasa. A pesar de que la dieta grasa provocó dislipidemia relacionada con la esteatosis, no se observaron cambios en los isoprostanos urinarios ni en el contenido de malondialdehído (MDA) en el hígado. Además, la alteración en la expresión génica del grupo HA se debió al alto consumo de la dieta rica en grasas, mientras que la ingesta de zumo de tomate tuvo efectos diferentes dependiendo la dieta empleada (estándar o grasa). En las ratas del grupo NL se observaron cambios en los genes involucrados con la β -oxidación, y tanto en el grupo NL como en el HL mostraron una mayor expresión relativa del *CD36* y una menor expresión relativa de los genes *APOB* y *LPL* involucrados en el transporte y metabolismo del colesterol y lípidos. Así mismo, la acumulación de licopeno en el hígado de las ratas del grupo HL sobreexpresó los genes *FXR* y *HNF4A*,

relacionados con la prevención de la esteatosis hepática. En relación con el estudio metabolómico, se estimuló la biosíntesis del glutatión y los aminoácidos de la vía de transulfuración tras la ingesta de zumo de tomate, incrementando la concentración de los metabolitos vinculados con la respuesta antioxidante.

En el estudio 2, se emplearon 44 ratas macho de 8 semanas de edad y se agruparon en seis grupos experimentales ($n=8$), alimentándolas durante 5 semanas con diferentes dietas: dieta estándar (NC), dieta grasa (HC), dieta estándar + 5% de espinacas (N5), dieta estándar + 2.5% de espinacas (N2.5), dieta grasa +5% de espinacas (H5) y dieta grasa + 2.5% de espinacas (H2.5). Tras el periodo experimental, se sacrificaron las ratas y se analizaron las muestras biológicas, junto con orina y heces al inicio y final del periodo experimental. Si bien las ratas que consumieron dieta alta en grasa (H) acumularon grasa en los hepatocitos, no presentaron cambios en las concentraciones plasmáticas de biomarcadores de inflamación (adiponectina y TNF- α) y de estrés oxidativos (ORAC en plasma y los isoprostanos urinarios) en comparación con las ratas que consumieron dieta estándar (N). La acumulación de α y β -caroteno y luteína en el tejido hepático tuvo una correlación inversamente proporcional con el colesterol total y la glucosa en plasma, así como del contenido de colesterol en hígado, incrementando los niveles de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y disminuyendo eficazmente el colesterol hepático en los grupos H5 y H2.5. Con respecto a la expresión génica, que se estudió solo en los animales que tomaron la concentración de 5% de espinacas, se observó un aumento en la sobreexpresión de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs): *PPAR- α* y *PPAR- γ* se sobreexpresaron en los grupos N5 y H5, y *PPAR- δ* solo en el grupo N5, estos PPARs están implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y colesterol. Además, la sobreexpresión del gen *NR1H4* (*FXR*) en los grupos sanos que tomaron espinacas estaría relacionado con una

disminución del colesterol hepático. En cuanto a los metabolitos hepáticos, las ratas que consumieron una dieta alta en grasa (H) presentaron hipoaminoacidemia, en especial para los aminoácidos glucogénicos. En este mismo estudio, se realizó un estudio por qPCR de la microbiota colónica para evaluar los cambios asociados a la esteatosis e ingesta de espinacas. Paralelamente, se analizaron diferentes metabolitos bacterianos: por CG los AGCC mayoritarios (acetato, propionato y butiratos) y los minoritarios presentes en heces, y por UPLC-ESI-MS/MS se analizaron los catabolitos fenólicos en muestras de orina, plasma e hígado. La ingesta de espinacas mejoró de manera parcial algunas alteraciones inducidas por una dieta grasa, incrementando el número de *Lactobacillus*, los niveles de acetato y propionato, y la concentración de metabolitos fenólicos, reduciendo así mismo el colesterol total y colesterol-LDL en plasma, ayudando a prevenir el depósito excesivo de colesterol hepático y así mejorar los biomarcadores de esteatosis y riesgo cardiometabólico.

En el estudio 3, se evaluó el efecto de los carotenoides en el tratamiento de la EHGNA. Se emplearon 24 ratas macho de 6 semanas de edad, a las que se indujo la esteatosis y posteriormente se agruparon en tres grupos experimentales ($n=8$), que se alimentaron durante 5 semanas con las siguientes dietas: CD (dieta estándar), BC (dieta estándar + 12.75% de mezcla de polvo de espinacas y tomate), AC (dieta estándar + 25.5% de mezcla de polvo de espinacas y tomate). Al final del periodo experimental se sacrificaron los animales y se obtuvieron las muestras de plasma, contenido intestinal e hígado. Además, se recogieron las muestras de heces y orina al inicio y final del estudio. Las ratas alimentadas con la mezcla de espinacas y tomate, tras inducir la esteatosis, mejoraron el perfil lipídico en plasma, disminuyendo los niveles de glucosa, colesterol total, VLDL TG, proteínas, ALT y AST. Así mismo, se observó una disminución del estrés oxidativo con reducción de MDA en plasma, hígado y orina, y un aumento de la

capacidad antioxidante (ORAC) en el plasma. Además, la ingesta de estos vegetales llevó a una acumulación de carotenoides en el hígado de estos animales, correlacionándolo inversamente con el contenido de grasa total, colesterol total y triglicéridos hepáticos, incrementando las concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (AGM y AGP). Paralelamente, se observó un aumento de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces y contenido intestinal de las ratas. Estos cambios están parcialmente explicados por la modulación de genes relacionados con el metabolismo lipídico y otras rutas metabólicas de la enfermedad de hígado graso, incrementando las proteínas involucradas en la β -oxidación, metabolismo de colesterol y señalización de insulina, principalmente a través de la sobreexpresión de *ACOX1*, *APOA1*, *NR1H2 (LXR)* e *IGFBP1*. Los resultados de este estudio sugieren que los carotenoides dietéticos, procedentes de espinacas y tomate, ayudan en el tratamiento dietético de la enfermedad al revertir los biomarcadores de enfermedad.

ABSTRACT

The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is used as one of the most frequent chronic liver diseases in the world, represents a serious clinical problem and an increase in the countries, and in the development pathways. In the present Doctoral Thesis, three experimental studies were designed with the objective of evaluating the functionality of dietary carotenoids, provided by tomato and spinach, in the prevention and treatment of steatosis.

In study 1, 24 male 8-week-old rats were used, which were grouped into four experimental groups (n = 6), feeding them for 5 weeks with different diets and drinks: NA (standard diet and water), NL (standard diet) and tomato juice), HA (fatty diet and water) and HL (fat diet and tomato juice). After the experimental period, we proceeded to the sacrifice, collecting the biological samples, in which the biochemical parameters, the biomarkers of oxidative stress, the hepatic metabolites and the gene expression were analyzed. The carotenoids accumulated in the animals that ingested the tomato juice, being greater the accumulation when taking it with fat. Although the fatty diet caused dyslipidemia related to steatosis, no change was observed in urinary isoprostanes or malondialdehyde content (MDA) in the liver. In addition, the alteration in the gene expression of the HA group was due to the high consumption of the diet rich in fats, while the intake of tomato juice had different effects depending on the diet used (standard or fat). In the rats of the NL group, changes were observed in the genes involved with β -oxidation, and both in the NL group and in the HL showed a higher relative expression of *CD36* and a lower relative expression of the *APOB* and *LPL* genes involved in the transport and metabolism of cholesterol and lipids. Likewise, the accumulation of lycopene in the liver of rats of the HL group overexpressed the *FXR* and *HNF4A* genes, related to the prevention of hepatic steatosis. In relation to the metabolomic study, the

biosynthesis of glutathione and the amino acids of the transulphurisation pathway were stimulated after the intake of tomato juice, increasing the concentration of the metabolites linked to the antioxidant response.

In study 2, 44 male 8-week-old rats were used and grouped into six experimental groups (n = 8), feeding them for 5 weeks with different diets: standard diet (NC), fat diet (HC), standard diet + 5% spinach (N5), standard diet + 2.5% spinach (N2.5), fat diet + 5% spinach (H5) and fat diet + 2.5% spinach (H2.5). After the experimental period, the rats were sacrificed and the biological samples were analyzed, along with urine and faeces at the beginning and end of the experimental period. Although the rats that consumed high-fat diet (H) accumulated fat in the hepatocytes, they did not present changes in the plasma concentrations of inflammation biomarkers (adiponectin and TNF- α) and oxidative stress (ORAC in plasma and urinary isoprostanes) compared to rats that consumed standard diet (N). The accumulation of α and β -carotene and lutein in the liver tissue had an inversely proportional correlation with total cholesterol and plasma glucose, as well as the cholesterol content in the liver, increasing the levels of monounsaturated fatty acids (MFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), and effectively lowering liver cholesterol in groups H5 and H2.5. With respect to gene expression, which was studied only in animals that took the 5% concentration of spinach, an increase in overexpression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) was observed: *PPAR- α* and *PPAR- γ* they were overexpressed in groups N5 and H5, and *PPAR- δ* only in group N5, these PPARs are involved in the metabolism of fatty acids and cholesterol. In addition, overexpression of the *NR1H4 (FXR)* gene in healthy groups that took spinach would be related to a decrease in liver cholesterol. Regarding hepatic metabolites, rats that consumed a high-fat (H) diet had hypoaminoacidemia, especially for glucogenic amino acids. In this same study, a qPCR study of the colonic microbiota was performed

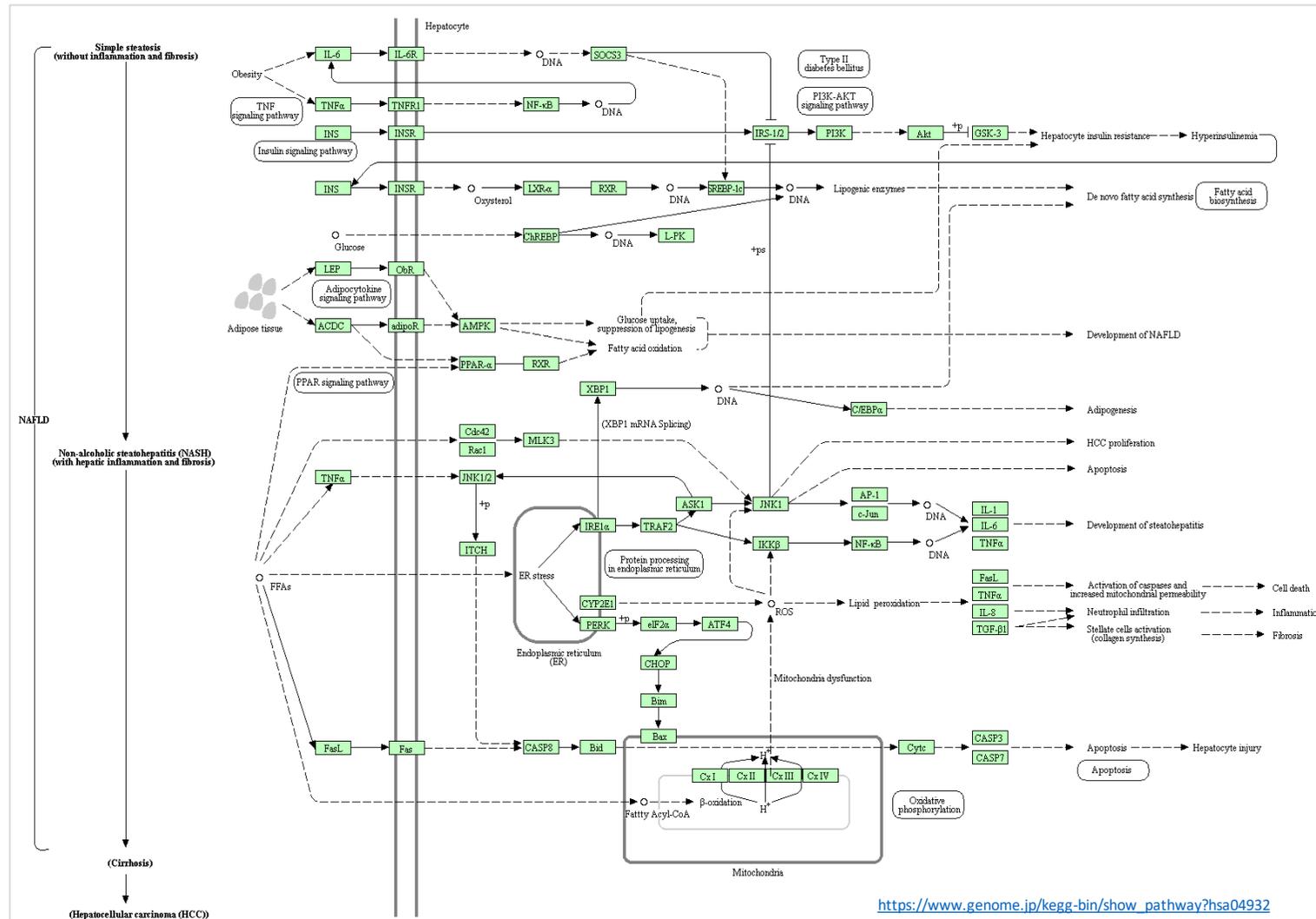
to evaluate the changes associated with steatosis and spinach intake. In parallel, different bacterial metabolites were analyzed: CG SCFA majority (acetate, propionate and butyrate) and minority present in feces, and by UPLC-ESI-MS / MS phenolic catabolites were analyzed in urine, plasma and liver. Intake spinach improved partially some induced by fat diet changes, increasing the number of *Lactobacillus*, levels of acetate and propionate, and the concentration of phenolic metabolites, also reducing total cholesterol and LDL cholesterol in plasma, helping to prevent the excessive deposition of hepatic cholesterol and thus improve the biomarkers of steatosis and cardiometabolic risk.

In study 3, the effect of carotenoids in the treatment of NAFLD was evaluated. Twenty-four male 6-week-old rats were used, to which steatosis was induced and subsequently grouped into three experimental groups (n = 8), which were fed for 5 weeks with the following diets: CD (standard diet), BC (standard diet + 12.75% mix of spinach and tomato powder), AC (standard diet + 25.5% mix of spinach and tomato powder). At the end of the experimental period the animals were sacrificed, and the samples of plasma, intestinal content and liver were obtained. In addition, stool and urine samples were collected at the beginning and end of the study. Rats fed the spinach and tomato mixture, after inducing steatosis, improved the lipid profile in plasma, decreasing glucose levels, total cholesterol, VLDL TG, proteins, ALT and AST. Likewise, a decrease in oxidative stress was observed with reduction of MDA in plasma, liver and urine, and an increase in antioxidant capacity (ORAC) in plasma. In addition, the intake of these vegetables led to an accumulation of carotenoids in the liver of these animals, inversely correlated with the content of total fat, total cholesterol and hepatic triglycerides, increasing the concentrations of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (AGM and AGP). In parallel, an increase in short-chain fatty acids (SCFA) in feces and intestinal content of rats was observed. These changes are partially explained by the modulation of genes

related to lipid metabolism and other metabolic pathways of fatty liver disease, increasing the proteins involved in β -oxidation, cholesterol metabolism and insulin signaling, mainly through overexpression of *ACO1*, *APOA1*, *NR1H2 (LXR)* and *IGFBP1*. The results of this study suggest that dietary carotenoids, from spinach and tomato, help in the dietary treatment of the disease by reversing the biomarkers of disease.

ANEXOS

Anexo 1. Ruta KEGG para la EHGNA (hsa04932).



Anexo 2. Lista de 84 genes clave implicados en los mecanismos de la EHGNA y la resistencia a la insulina hepática (PARN-157ZD-24).

Señalización de insulina

Akt1, Foxa2 (Hnf3b), Gsk3b, Igf1, Igfbp1, Insr, Irs1, Mapk1 (Erk2), Mapk8 (Jnk1), Mtor, Pik3ca (p110-alpha), Pik3r1 (PI3KA), Pklr, Ppargc1a (Ppargc1), Prkaa1 (Ampk), Ptpn1 (Ptp), Slc2a4 (Glut4), Socs3, Srebf1.

Señalización de adiposquina

Adipor1, Adipor2, Akt1, Cd36, Irs1, Lepr, Mapk8 (Jnk1), Mtor, Nfkb1, Ppara, Ppargc1a (Ppargc1), Prkaa1 (Ampk), Rxra, Serpine1 (PAI-1), Slc2a1, Slc2a4 (Glut4), Socs3, Stat3, Tnf.

Diabetes mellitus no insulino dependiente

Gck, Insr, Irs1, Mapk1 (Erk2), Mapk8 (Jnk1), Mtor, Pik3ca (p110-alpha), Pik3r1 (PI3KA), Pklr, Slc2a2, Slc2a4 (Glut4), Socs3, Tnf, Xbp1.

Vías metabólicas

Metabolismo de carbohidratos

Acly, G6pc, G6pd, Gck, Gsk3b, Mlxipl, Pck2, Pdk4, Pklr, Rbp4.

β-oxidación

Acadl, Acox1, Akt1, Cpt1a, Cpt2, Fabp1, Irs1, Mtor, Ppara.

Transporte y metabolismo de colesterol

Abca1, Abcg1, Apoa1, Apob, Apoc3, Apoe, Cd36, Cnbp, Cyp2e1, Cyp7a1, Hmgcr, Ldlr, Lepr, Nr1h2, Nr1h3, Nr1h4, Ppara, Ppard, Pparg, Prkaa1 (Ampk), Rxra, Srebf1, Srebf2.

Transporte y metabolismo de otros lípidos

Acaca, Acsl5, Acsm3, Dgat2, Fabp3, Fabp5, Fasn, Gk, Hnf4a, Lpl, Ppa1, Scd1, Slc27a5.

Fosforilación oxidativa

Atp5c1, Ndufb6, Ppa1.

Respuesta inflamatoria

Cebpb, Fas (Tnfrsf6), Ifng, Il10, Il1b, Il6, Nfkb1, Rxra, Tnf.

Apoptosis

Akt1, Casp3, Cebpb, Fas (Tnfrsf6), Mapk1 (Erk2), Mapk8 (Jnk1), Nfkb1, Pik3ca (p110-alpha), Pparg, Prkaa1 (Ampk), Rxra, Serpine1 (PAI-1), Socs3, Tnf.