

Efecto del consumo de luteína sobre la acumulación de colesterol y perfil de ácidos grasos en hígados de ratas con esteatosis inducida

L. I. Elvira-Torales¹, M. Santaella, R. González-Barrio, I. González-Navarro, J. García-Alonso, G. Martín-Pozuelo y M. J. Periago-Castón¹

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, Campus de Espinardo. Campus de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Murcia, España. E-mail: lauraines.elvira@um.es

ANTECEDENTES

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (HGNA) es una patología muy común en países occidentales, afectando al 20-30% de la población adulta, constituyendo un problema para la salud pública a nivel mundial. El HGNA se define como la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos (superior al 5% del peso del hígado), asociado a la dieta, en ausencia de una ingesta excesiva de alcohol y sin alguna otra causa patológica [1-3]. De acuerdo a lo reportado por Abenavoli *et al.* [1] y Than y Newsome [2] el HGNA se ha encontrado en un 80-90% en personas con obesidad, en un 30-50% en pacientes con diabetes y por encima de un 90% en pacientes con hiperlipidemia. Estudios han estimado que del 2-3% de los pacientes con HGNA desarrollan esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en la cual ya hay presencia de inflamación del hepatocito, y ésta a su vez puede progresar a fibrosis avanzada, cirrosis y en daños más graves, que derivan en hepatocarcinoma [4,5]. En Estados Unidos la EHNA es la tercera causa de trasplantes de hígado, por debajo de la hepatitis C y las enfermedades hepáticas derivadas del alcoholismo; sin embargo, se estima que para el año 2020 al 2025 podría ser la causa número uno, debido al aumento progresivo de personas con obesidad [6].

Los mecanismos involucrados es el progreso de esteatosis a esteatohepatitis aún no son totalmente reconocidos, pero se ha demostrado que el incremento de la adiposidad visceral y la resistencia a la insulina, además de la liberación de los ácidos grasos libres juegan un papel importante en el desarrollo de la esteatosis [7]. Day *et al.* en 1998 [8] propuso el modelo actual del desarrollo de esteatosis, el cual se define en dos preceptos. El primero que se presenta con la acumulación de triglicéridos y ácidos grasos libres en los hepatocitos como consecuencia del aumento del flujo de grasa dietética, la resistencia a la insulina y el incremento de la lipogénesis hepática. En el segundo precepto se involucra la peroxidación de lípidos, pérdida de funcionalidad mitocondrial e inflamación que son resultado del daño en los hepatocitos y el desarrollo de fibrosis hepática.

Dentro de las terapias para el tratamiento del HGNA en estado primario, se incluyen los cambios en el estilo de vida y alimentación, agentes farmacológicos y cirugía bariátrica. La primera terapia mencionada incluye la reducción en la ingesta de grasas saturadas y totales y azúcares refinados y un incremento de frutas y verduras en la dieta diaria, la dieta mediterránea que incluye este tipo de alimentos ha sido sugerida como una terapia efectiva contra la enfermedad de hígado graso, ya que está asociada con la disminución de incidencias en enfermedades como las cardiovasculares, desórdenes metabólicos y

algunos tipos de cáncer [1,2,9]. El efecto protector es atribuido en parte, a la alta concentración de antioxidantes que presenta la dieta. Los vegetales son las fuentes más importantes de compuestos antioxidantes que promueven beneficios a la salud, como ha sido reportado en numerosas ocasiones [10]. A pesar de que los mecanismos exactos de los efectos protectores no están completamente entendidos, se piensa que los carotenoides, el ácido fólico y las fibras tienen un efecto en la prevención del estrés oxidativo [11].

Por otro lado, los carotenoides se acumulan mayoritariamente en el hígado, esto produce un efecto positivo en el metabolismo del hepatocito, regulando el estrés oxidativo celular y en consecuencia, equilibra la disponibilidad y eliminación de los lípidos, lo que se deriva en patologías hepáticas. Todo lo anterior se debe, a la alteración de la β -oxidación de ácidos grasos y la secreción de lipoproteínas [12]. La β -oxidación de lípidos en la mitocondria se reduce, contribuyendo a la acumulación de ácidos grasos, fomentando la aparición de especies reactivas al oxígeno, favoreciendo la apoptosis del hepatocito, que conlleva a las lesiones irreversibles del hígado [12-14]. Por ello es importante, establecer la acción de los carotenoides, sobre la β -oxidación de ácidos grasos, la regulación del transporte de lípidos por las lipoproteínas y la regulación de enzimas involucradas en dichos procesos metabólicos como la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), ya que podría utilizarse durante el tratamiento dietético de la enfermedad. Estudios previos realizados en el grupo de investigación [15-17] han puesto de manifiesto que el licopeno del tomate puede tener un efecto regulador sobre el metabolismo lipídico en ratas con esteatosis inducida. Por tal motivo, el objetivo general de este trabajo ha sido evaluar el efecto del consumo de los carotenoides de las espinacas (β -caroteno y luteína, mayoritariamente), en la acumulación y metabolismo de colesterol y en el contenido de los ácidos grasos presentes en hígados de ratas con esteatosis inducida.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo experimental de este trabajo ha sido 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). Para lograr los objetivos, se emplearon ratas macho adultas Sprague-Dawley (8 semanas), las cuales se agruparon ($n= 6$ ratas/grupo) en 6 grupos experimentales: NC (dieta estándar), HC (dieta grasa), NA (dieta estándar + 5% de espinacas), HA (dieta grasa + 5% de espinacas), NB (dieta estándar + 2.5% de espinacas) y HB (dieta grasa + 2.5% de espinacas). Para inducir la esteatosis, durante dos semanas se administró la dieta grasa (Atherogenic rodent diet TD-02028; Harland Laboratories) (sin carotenoides), y tras este lapso se inició el periodo experimental de cinco semanas de acuerdo a los 6 grupos establecidos. Al finalizar el tiempo de ensayo las ratas fueron sacrificadas, obteniéndose las muestras biológicas de hígado las cuales fueron tomadas para determinar el contenido de carotenoides, de ácidos grasos y de colesterol empleando un kit de extracción y preparación (MAK 174 y MAK 175, Sigma Aldrich) para su posterior análisis mediante GC-FID. También se determinó la actividad de la enzima HMGCoA reductasa según la metodología descrita por Venugopala y Ramakishnan [18]. Los resultados fueron evaluados mediante análisis estadístico ($p < 0.05$) empleando el software Minitab 17.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios anteriores [19] demostraron que las espinacas tienen un contenido mayoritario de luteína como principal carotenoide ($943.8 \pm 28.4 \mu\text{g/g}$) y siendo este carotenoide el de mayor concentración en la dieta administrada, con un consumo promedio diario de $65.5 \mu\text{g}$ para el grupo NA, $20.63 \mu\text{g}$ para NB, $53.21 \mu\text{g}$ para HA y por último, $20.63 \mu\text{g}$ para el grupo HB. Con los consumos anteriores, se alcanzó una acumulación de carotenoides en hígado de $1.45 \mu\text{g/g}$ para el grupo HA, $0.29 \mu\text{g/g}$ para el grupo HB, y $0.20 \mu\text{g/g}$ para el grupo NA, para el grupo NB no se detectó presencia de carotenoides. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos H y N, en el contenido de carotenoides acumulado en el hígado, hecho que estaría asociado con la presencia de grasa en la dieta como ya ha sido reportado por Doring y Harrison [20] y Reboul *et al.* [21], y también, con la concentración de carotenoides presentes en la dieta. Sin embargo, la luteína tuvo mayor acumulación en el bazo ($0.6 \mu\text{g/g}$) siendo el carotenoide mayoritario en este órgano (84.5% del total de carotenoides) para el grupo H y sin detección de carotenoides para el grupo N.

El contenido de colesterol en los hígados de las ratas se presenta en la Tabla 1, observando un mayor contenido de éste en el grupo H. No obstante, la influencia de la presencia de carotenoides sobre el contenido de colesterol del hígado fue positiva, notando reducciones significativas ($p < 0.05$) con respecto al control. La reducción fue del 93% para el grupo HB vs HC y del 97.5% para el grupo HA vs HC, observando en el grupo HA concentraciones similares a las del grupo N. Estos resultados sugieren que los carotenoides en la dieta podrían estimular la transformación del exceso de colesterol en el hígado a sales biliares y su consecuente excreción vía intestinal [22], ya que se encontró que los niveles de lipoproteínas y colesterol séricos no tenían diferencia entre los grupos y se mantuvieron dentro de los rangos normales séricos [19,23].

Tabla 1. Contenido de colesterol (mg/100 g) en muestras de hígado de los grupos experimentales analizados al final del periodo de intervención

Dieta	Contenido de carotenoides		
	Control (C)	Alto (A)	Bajo (B)
Normal (N)	223.9 ± 46.3 ab*	192.5 ± 45 b	275.0 ± 48.5 a*
Hipercolesterolemica (H)	6048 ± 2801 a*	233.4 ± 50 b	647.8 ± 229.0 c*

Los valores se presentan como promedio \pm desvest. Las letras diferentes muestran diferencia significativa estadística entre los grupos C, A y B, después de llevar a cabo un ANOVA ($p < 0.05$)

* Diferencia significativa estadística después de realizar una prueba *t* entre los grupos N y H ($p < 0.05$)

En cuanto al contenido de ácidos grasos en el hígado (Tabla 2), se aprecia que la presencia de carotenoides en la dieta favorece la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en los grupos N, aumentando el contenido en un 62.5% para el grupo NA y 61.85% para el NB, hecho que se correspondió con la disminución del contenido de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, favoreciéndose la vía desaturasa en el metabolismo de ácidos grasos. Además, se observa que los carotenoides influyen en el

tipo de ácidos grasos poliinsaturados aumentando la síntesis de los ácidos grasos EPA y DHA, lo que disminuye la relación ω -6/ ω -3 para el grupo NA. En el caso de los animales con esteatosis (grupos H), se observa la misma tendencia de aumento de ácidos grasos poliinsaturados y disminución de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, aunque los cambios de concentración son muy pequeños debido al alto contenido de lípidos de la dieta. También se observó, cambios en la relación ω -6/ ω -3 en el grupo HA constatando el cambio en el metabolismo de los lípidos en el hígado.

Tabla 2. Contenido total de grasa y concentración de ácidos grasos de las muestras de hígado de los grupos experimentales analizados al final del periodo de intervención

Ácidos grasos (mg/g)	NC	NA	NB	HC	HA	HB
AGS	38.19 ± 23.73 a	13.38 ± 2.60 b *	13.22 ± 1.56 b *	26.23 ± 4.94	31.52 ± 6.15 *	33.54 ± 12.24 *
AGM	18.56 ± 17.92 *	4.73 ± 1.82 *	4.69 ± 0.92 *	35.48 ± 3.81 *	46.29 ± 9.82 *	48.43 ± 12.53 *
AGP	19.23 ± 8.12	15.46 ± 2.81 *	15.34 ± 2.26 *	20.92 ± 1.95 b	30.16 ± 7.43 a *	29.62 ± 5.16 ab *
AGT	76.0 ± 47.2	33.56 ± 7.06 *	33.25 ± 4.5 *	82.63 ± 9.75	107.97 ± 20.15 *	111.6 ± 29.1 *
Total ω -3	1.95 ± 0.97	1.99 ± 0.28 *	1.45 ± 0.18 *	1.48 ± 0.32 c	2.97 ± 0.58 a *	2.38 ± 0.32 b *
Total ω -6	17.28 ± 7.21	13.47 ± 2.56 *	13.88 ± 2.09 *	19.44 ± 1.68	27.19 ± 7.18 *	27.24 ± 4.96 *
AGS/AGT (%)	50.13 ± 6.22 a *	39.99 ± 1.72 b *	39.84 ± 1.14 b *	31.58 ± 2.67 *	29.24 ± 2.07 *	29.63 ± 2.58 *
AGM/AGS (%)	43.64 ± 16.65 *	34.52 ± 6.05 *	35.43 ± 4.66 *	137.42 ± 18.38 *	146.75 ± 10.77 *	147.56 ± 15.79 *
AGP/AGT (%)	28.47 ± 7.85 b	46.26 ± 1.95 a *	46.08 ± 1.17 a *	25.38 ± 0.88	27.93 ± 4.66 *	26.96 ± 2.38 *
ω -6/ ω -3 (%)	9.10 ± 1.63 a *	6.77 ± 0.58 b *	9.54 ± 0.54 a *	13.41 ± 1.81 a *	9.29 ± 2.60 b *	11.48 ± 1.68 ab *

Los valores se expresan como media \pm desvest. Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre los grupos C, A y B, después de realizar un ANOVA de una vía y aplicar los test Tukey y Games-Howell de separación de medias ($p < 0.05$).

* Diferencia significativa estadística después de realizar prueba t entre los grupos NC vs HC, NA vs HA y NB vs HB.

Abreviaturas: AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados; AGP, ácidos grasos poliinsaturados; AGT, ácidos grasos totales; ω -3, ácidos grasos insaturados ω -3; ω -6, ácidos grasos insaturados ω -6.

En cuanto a la actividad de la enzima HMGCoA reductasa, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de experimentación obteniéndose una relación media HMG-Mevalonato de 2.65. Lo que indica que los compuestos bioactivos presentes en las espinacas no influyen sobre la enzima responsable de la síntesis del colesterol en el hígado, por lo que los mecanismos del efecto hipocolesterolemico estarían regulados a través de otras rutas metabólicas.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por lo proyectos MINECO/FEDER-EU BIO2012-38103 y CONSOLIDER Fun-C-Food CSD2007.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Abenavoli L., Milic N., Peta V., Alfieri F., De Lorenzo A., Bellentani S. (2014). Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: Mediterranean diet. *World J Gastroenterol*; 20(45):16831-16840.
- [2] Than N.N., Newsome P.N. (2015). A concise review of non-alcoholic fatty liver disease, *Atherosclerosis*; 239(1):192-202.
- [3] Nascimbeni F., Pais R., Bellentani S., Day C.P., Ratzu V., Loria P., Lonardo A. (2013). From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol*; 59:859-871.
- [4] Bedogni G., Miglioli L., Masutti F., Tiribelli C., Marchesini G., Bellentani S. (2005). Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*; 42:44-52.
- [5] Margariti E., Deutsch M., Manolakopoulos S., Papatheodoridis G.V. (2012). Non-alcoholic fatty liver disease may develop in individuals with normal body mass index. *Ann Gastroenterol*; 25:45-51.
- [6] Milić S., Stimac D. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis*; 30:158-162.

- [7] Stanković, M.N. (2014). Time-dependent changes and association between liver free fatty acids, serum lipid profile and histological features in mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Arch Med Res*; 45(2):116-124.
- [8] Day, C.P., James O.F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterol*; 114(4):842-5.
- [9] Martín-Pozuelo G., Navarro-González I., González-Barrio R., Santaella M., García-Alonso J., Hidalgo N., Gómez-Gallego C., Ros G., Periago M.J. (2014). The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur J Nutr*; 54(6):933-44.
- [10] Tyrovolas S., Panagiotakos D.B. (2010). The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: a systematic review. *Maturitas*; 65:122-130.
- [11] Azzini E., Polito A., Fumagalli A., Intorre F., Venneria E., Durazzo A., *et al.* (2011). Mediterranean diet effect: an italian picture. *Nutr J*; 10:125.
- [12] Musso G., Gambino R., Cassader M. (2009). Recent insight into lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progr Lipid Res*; 48:1.
- [13] Wei Y., Rector R.S., Thyfault P., Ibdah J. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*; 14(2):193.
- [14] Cazanave S.C., Gores G.J. (2010). Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clin Lipidol*; 5:71.
- [15] Martín-Pozuelo G., Navarro-González I., González-Barrio R., Santaella M., García-Alonso J., Hidalgo N., Gómez-Gallego C., Ros G., Periago M.J. (2014). The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur J Nutr*; 54:933-944.
- [16] Bernal C., Martín-Pozuelo G., Lozano A.B., Sevilla A., García-Alonso J., Canovas M., Periago M.J. (2013). Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem*; 24:1870–1881.
- [17] Navarro-González I., Pérez Sánchez H., Martín-Pozuelo G., García Alonso J., Periago M.J. (2014). The inhibitory effects of bioactive compounds of tomato juice binding to hepatic HMGCR: *in vivo* study and molecular modeling. *Plos One*; 9:e83968.
- [18] Venugopala R.A., Ramakishnan S. (1975). Indirect assessment of Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity in liver Tissue. *Clin Chem*; 21:1523-1525.
- [19] Elvira-Torales L.I., Periago-Castón M.J. (2015). Efecto del consumo de luteína y zeaxantina presentes en espinacas sobre los marcadores de la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Estudio metabólico y molecular. Memorias de congreso I Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. Murcia, España.
- [20] During A., Harrison E.H. (2004). Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys*; 430:77.
- [21] Reboul E., Thap S., Tourniaire F., André M., Juhel C., Morange S., Amiot M.J., Borel P. (2007). Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoides, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Brit J Nutr*; 9:440.
- [22] Cofan-Pujol M. (2014). Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clin Invest Arterioscl*; 26(1):41-47.
- [23] León-Goñi A.C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B.O., Arteaga M.E., *et al* (2011). Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CEN-PALAB, Cenp: SPRD. *Rev Electron Vet*; 12:1-10.