

La Tomasa reduce parámetros metabólicos e inflamatorios asociados a síndrome metabólico en un modelo murino

BERNARDITA MONSALVE¹, WHITNEY VENTURINI^{1,2}, NELSON BROWN²,
RODRIGO MOORE-CARRASCO^{1*}.

Abstract

In our country, cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of death. Unhealthy eating habits and sedentary lifestyles, among other factors, have contributed to increase the risk for CDV in the population. An alternative to the commonly used pharmacological therapies is the use of validated natural products that can be incorporated in the development of functional foods or supplements. In particular, the tomato has been shown to have a protective role in CVD; its high content of antioxidants, particularly lycopene, provides it with extensively documented beneficial properties. Tomasa, a by-product of the agroindustry, maintains some of the beneficial characteristics of its fruit of origin. Mice fed with a high-fat (hypercaloric) diet increase their body weight and visceral adipose mass, and also display an increase in metabolic and inflammatory parameters. Our results allow us to conclude that the consumption of Tomasa in mice fed a hypercaloric diet reduces the blood levels of cholesterol, glycaemia and pro-inflammatory cytokines. These results support the rationale of using of this by-product in the generation of functional ingredients with proven beneficial effects.

Keywords: *Tomato, Metabolic Syndrome, inflammation.*

1. Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad de Talca, Talca 3460000, Chile-

2. Centro de Investigaciones Médicas, Escuela
de Medicina, Universidad de Talca, Talca-

*Autor de correspondencia:
rmoore@utalca.cl

Fono: 56-71-200491

Fax: 56-71-200488

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte a nivel mundial¹. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 17.9 millones de personas mueren producto a estas enfermedades cada año.

Los ejes fundamentales en la prevención de este tipo de patologías se han centrado en una dieta saludable, rica en frutas y hortalizas, además de aumentar la actividad física y dejar el hábito de fumar. Estudios previos han demostrado que el tomate posee mecanismos protec-

tores contra las ECV, presentando actividades antiplaquetaria²⁻³, protectora del endotelio,⁴ antioxidante⁵⁻⁶ y antiaterogénica.⁷

Uno de los factores que influyen en el desarrollo de estas ECV es la inflamación crónica. Estudios demuestran que niveles elevados de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), se asocian a mayores eventos cardiovasculares y un aumento en la morbimortalidad⁸. Estas moléculas inflamatorias son producidas no solo por las células del sistema inmune, sino también pueden ser secretadas por el tejido adiposo, músculo e intestino, entre otros. Se ha visto que el aumento en la adiposidad visceral podría explicar en parte el aumento del estado inflamatorio basal. El tejido adiposo es un órgano metabólicamente activo,⁹ el cual no solo almacena lípidos, sino que es capaz de secretar numerosos factores o adipoquinas con un efecto en el metabolismo sistémico.¹⁰ Entre los factores secretados se encuentran citoquinas implicadas en la respuesta inmune inflamatoria, tales como TNF- α , IL-1, IL-6⁹, y la proteína quimioatrayente de los monocitos 1 (MCP-1),¹¹ todas con la capacidad de contribuir a un estado inflamatorio crónico. La contribución de cada tejido en este estado inflamatorio crónico es un tema aún no resuelto. En ese sentido nuestro trabajo muestra que el intestino podría ser una de las fuentes importante de inflamación sistémica en individuos con una dieta hipercalórica.

Se han descrito varias propiedades beneficiosas para la salud en el tomate. Parte de estas propiedades podrían estar presentes también en el producto residual industrial del tomate, conocido como Tomasa (residuo agroindustrial del tomate correspondiente a la piel y pepas). En Chile se producen aproximadamente 14 mil toneladas de Tomasa al año, lo que transforma a este producto de bajo costo en un sustrato ideal para el desarrollo de ingredientes funcionales con efecto en la salud humana.

Materiales y métodos

Animales

Los ratones fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura a 22°C y ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El estudio se realizó con una muestra de 24 ratones C57BL/6. Estos se randomizaron en 3 grupos de 8 animales cada grupo. Los grupos fueron sometidos a las siguientes condiciones experimentales por un periodo de 21 semanas: 1) dieta normal, dieta base comercial con un 4% de grasa, 2) dieta grasa, preparada en nuestro laboratorio y que contenía un 25% de grasa, y 3) dieta grasa más Tomasa, la dieta grasa suplementada con un 20% p/p de Tomasa. Al término del periodo experimental, los animales fueron sedados, anestesiados, y sometidos a eutanasia por dislocación cervical. Posterior a la muerte, se extrajo sangre (desde la aorta abdominal) y tejidos, los que fueron almacenados a -80°C hasta su eventual uso.

Parámetros bioquímicos

Las determinaciones de glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido úrico se realizaron en un analizador automático de química clínica Roche Hitachi 902, con reactivos de la misma empresa.

Ensayo para cuantificación de Insulina, IL-6, MCP-1 y TNF- α

Para cuantificar los niveles plasmáticos de insulina, IL-6, MCP-1 y TNF- α , se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA, Invitrogen) para la determinación de IL-6, MCP-1 y TNF- α de origen murino. Para la determinación de insulina se utilizó el kit de Merck-Millipore. Los métodos fueron realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis Histología Intestino Delgado

Los estudios anatomopatológicos se realizaron por Métodos Convencionales y tinción de Hematoxilina-eosina.¹²

Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 5. Se comprobó que las variables poseían una distribución normal dentro de la muestra estudiada. Los datos se expresaron como medidas de tendencia central y de dispersión (media \pm desviación estándar). Se aceptó como significativa toda diferencia con valor $p \leq 0,05$. La prueba empleada para las variables cuantitativas fue ANOVA.

Consideraciones éticas

Los experimentos se llevaron a cabo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca, considerando los requisitos de bienestar para animales de experimentación, rigiéndose bajo las normas sanitarias y de bioética exigidas. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo al Manual de Procedimientos de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) y aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Talca.

Resultados

En la tabla 1 se muestra la variación de peso de ratones y sus órganos, según el peso inicial y el obtenido al final del experimento, después de 21 semanas. Se puede observar un incremento de peso de aproximadamente 16 gramos en los ratones alimentados con dieta alta en grasa, en comparación con los ratones del grupo control y del grupo tratado con Tomasa, en los que el incremento de peso fue de 8 gramos y 11.5 gramos, respectivamente.

En la tabla 2 se muestran los valores plasmáticos de colesterol y triglicéridos determinados en ratones pertenecientes a los grupos control y experimental, después de 21 semanas de tratamiento. Los animales que consumieron dieta rica en grasas presentaron una tendencia al alza en los niveles de colesterol y glucosa en comparación con el grupo control. Aunque no estadísticamente significativo, los valores obtenidos de glicemia y colesterol en ratones alimentados con la dieta grasa suplementada con Tomasa fueron menores que los obtenidos en ratones alimentados solo con una dieta rica en grasa.

Notablemente, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles plasmáticos de ácido úrico entre los grupos de ratones alimentados con dieta rica en grasa y aquellos alimentados con la misma dieta más Tomasa, apreciándose una disminución en los niveles plasmáticos de ácido úrico en los animales suplementados con Tomasa.

Finalmente, se determinaron las concentraciones plasmáticas de IL-6, TNF- α y MCP-1 en ratones correspondientes a cada grupo estudiado, obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 1.

Los niveles plasmáticos de IL-6 en ratones mantenidos en con una dieta rica en grasa (71.2 ± 75.7 pg/mL) fueron mayores que aquellos determinados en los ratones del grupo control (29.3 ± 14.7 pg/mL). De manera notable, en ratones alimentados con una dieta rica en grasa suplementada con Tomasa se observó una reducción en los niveles de IL-6 (19.2 ± 10.8 pg/mL). Mientras que un claro aumento de 2.5 veces en los niveles de IL-6 en el grupo alimentado con dieta rica en grasas versus el grupo Control fue observado, la suplementación con Tomasa condujo a una disminución en los niveles de IL-6 incluso por debajo de los valores del grupo Control. No obstante, estas tendencias no fueron estadísticamente significativas ($p < 0.093$).

En relación a los niveles de MCP-1, la concentración media en el grupo control fue de 107.7 ± 17.6 pg/mL, en el grupo alimentado con dieta rica en grasa fue de 105.7 ± 29.5 pg/mL, y en el grupo alimentado con una dieta rica en grasa suplementada con Tomasa fue de 104.2 ± 17.3 pg/mL. Por lo tanto, no se presentaron variaciones significativas en los niveles de MCP-1 entre los distintos grupos. Por último, el nivel plasmático promedio de TNF- α en el grupo Control fue de 18.3 ± 4.7 pg/mL, en el grupo tratado con dieta rica en grasa fue de 27.1 ± 6.3 pg/mL, y en el grupo tratado con dieta rica en grasa suplementada con Tomasa fue de 21.5 ± 2.6 pg/mL. Si bien hubo una tendencia a reproducir los hallazgos observados para IL-6, tampoco hubo diferencias significativas entre grupos.

Discusión

Similar a lo que ocurre en humanos, la administración de una dieta con alto contenido en grasas induce obesidad en ratones¹³. Esta respuesta biológica nos ha permitido evaluar el impacto de la dieta en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV), particularmente evaluar cómo la inclusión de ingredientes funcionales en los alimentos puede mejorar parámetros metabólicos alterados. Para determinar el efecto de la Tomasa en los parámetros antropométricos y metabólicos de ratones, estos fueron sometidos a una dieta hipercalórica (25% grasa) suplementada con un 20% de Tomasa. Se evaluó el peso corporal y el peso de los tejidos; también se midieron parámetros bioquímicos (colesterol, triglicéridos, entre otros). Los resultados, que se muestran en las Tablas 1 y 2, nos permiten confirmar la alteración metabólica que sufren los animales sometidos a una dieta alta en grasa. La concentración de colesterol total presenta un aumento significativo en el grupo de ratones sometidos a una dieta rica en grasa, aumento que es revertido en parte por el consu-

mo de Tomasa. Los triglicéridos, por su parte, muestran un pequeño aumento en el grupo de ratones sometidos a una dieta rica en grasa. Sin embargo, no fue posible encontrar diferencias significativas entre los grupos analizados. Por lo tanto, si bien estudios recientes son consistentes en afirmar que diversos extractos del tomate (pulpa, semillas) logran disminuir el colesterol total sérico, triglicéridos e incluso colesterol LDL^{14, 15}, nuestros estudios son consistentes con un rol de la Tomasa preferentemente en el metabolismo del colesterol. Alternativamente, las diferencias en los resultados se podrían explicar por diferencias en el tipo de extracto, la proporción de estos en los alimentos y el tiempo de exposición a una dieta hipercalórica con Tomasa. Es importante considerar la necesidad de introducir un cuarto grupo (dieta normal + Tomasa), ante la posibilidad de que los ratones no estén comiendo (no les guste la Tomasa). Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias en la ingesta diaria de los diferentes grupos (datos no mostrados).

Además de los parámetros que definen el síndrome metabólico, existen otras alteraciones que lo pueden acompañar, una de ellas es el incremento en las concentraciones del ácido úrico. El estudio muestra una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de ácido úrico, encontrándose una reducción en el grupo de ratones sometidos a una dieta rica en grasa suplementada con Tomasa (en comparación al grupo de ratones sometidos a una dieta rica en grasa solamente). Estas observaciones son concordantes con Ruggiero et al. (2007), quienes observaron una relación inversa entre los niveles de ácido úrico y antioxidantes en sangre. Esto le otorga al tomate un rol protector de las funciones corporales, debido a la gran cantidad y diversidad de antioxidantes que contiene¹⁶.

La aterosclerosis se asocia con elevados niveles de citoquinas en plasma^{17, 18}. De hecho, el proceso aterosclerótico se acompaña de

manifestaciones inflamatorias tanto locales como sistémicas. Revertir este estado a través del consumo de productos bioactivos podría ser una alternativa de prevención viable. Los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF- α son considerados buenos indicadores de la presencia de un estado inflamatorio sistémico. Como se pudo apreciar en el presente estudio, si bien las diferencias entre los niveles plasmáticos de estas citoquinas no fueron estadísticamente significativas, es posible observar una tendencia al alza en el grupo alimentado con dieta hipercalórica y una tendencia a la normalización cuando la dicha dieta rica en grasa fue suplementada con Tomasa. Particularmente, observamos un aumento de 1.4 veces en la concentración plasmática de TNF- α en ratones sometidos a dieta rica en grasas en comparación al grupo control, y una reversión cuando Tomasa fue incluida en la dieta. Hay que considerar que TNF- α es un potente estimulante de la reacción inflamatoria¹⁹. El aumento sistémico de mediadores proinflamatorios, tales como IL-6 y TNF- α ha sido relacionado con diferentes patologías, entre ellas diabetes mellitus, resistencia a la insulina, estrés, enfermedades cardiovasculares, entre otras (20). MCP-1 es una quimioquina clave en la inflamación aterosclerótica, jugando un rol importante en la etiología de infarto de miocardio,²¹⁻²². No obstante, en animales sometidos a dieta rica en grasa no se observaron niveles plasmáticos diferentes a los animales pertenecientes a los otros grupos estudiados. Es posible que al ser una molécula que actúa localmente, su aumento sistémico sea difícil de detectar.

La inflamación es un pilar clave en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, desarrollar estrategias terapéuticas tendientes a reducir la producción de mediadores inflamatorios claves podría contribuir a reducir el riesgo cardiovascular. IL-6 y TNF- α son los principales mediadores inflamatorios liberados por el tejido adiposo, estas ci-

toquinas tienen efectos sistémicos diversos.²³ IL-6 es una citoquina que actúa como un mediador en respuestas inflamatorias y respuesta a estrés, estimándose que la tercera parte circulante proviene del tejido adiposo.²⁴ Asimismo, TNF- α se ha visto también elevado en la obesidad.²³⁻²⁵ La incorporación de Tomasa en la dieta muestra una clara tendencia a reducir estos mediadores inflamatorios en animales.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que una dieta alta en grasa por un periodo de 21 semanas en ratones reproduce, al menos en parte, las alteraciones propias de individuos con Síndrome Metabólico, por lo que representa un modelo animal adecuado para el estudio de esta entidad fisiopatológica. Las principales alteraciones observadas en ratones alimentados con una dieta rica en grasas fueron un aumento del peso corporal, un aumento del peso del tejido adiposo, hiperglicemia, hipercolesterolemia y un perfil inflamatorio alterado. La suplementación de la dieta grasa con un 20% de Tomasa mostró un efecto global positivo, reduciendo parcialmente algunos de los parámetros metabólicos e inflamatorios.

Bibliografía

1. Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Williams J, Rayner M, Townsend N. The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. *Heart*. 2015;101(15):1182-9.
2. Palomo G I, Fuentes Q E, Carrasco S G, González R D, Moore-Carrasco R. Actividad antioxidante, hipolipemiante y antiplaquetaria del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y el efecto de su procesamiento y almacenamiento. *Revista Chilena de Nutrición*. 2010;37(4):524-33.
3. Concha-Meyer A, Palomo I, Plaza A, Gadioli Tarone A, Marostica Junior MR, Sayago-Ayerdi SG, et al. Platelet Anti-Aggregant

- Activity and Bioactive Compounds of Ultrasound-Assisted Extracts from Whole and Seedless Tomato Pomace. *Foods*. 2020;9(11).
4. Palomo G I, Fuentes Q E, Moore-Carrasco R, González DR, Rojas R A, Padro T, et al. El consumo de frutas y hortalizas ayuda a prevenir el daño endotelial. *Revista chilena de nutrición*. 2011;38(3):343-55.
 5. Cruz Bojórquez RM, González Gallego J, Sánchez Collado P. Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalaria*. 2013;28(1):6-15.
 6. Takeoka GR, Dao L, Flessa S, Gillespie DM, Jewell WT, Huebner B, et al. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J Agric Food Chem*. 2001;49(8):3713-7.
 7. Palomo I, Moore-Carrasco R, Carrasco G, Villalobos P, Guzmán L. El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Idesia (Arica)*. 2010;28(3):121-9.
 8. Greig D, Castro P, Gabrielli L, Miranda R, Verdejo H, Alcaino H, et al. Inflammation and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. *Revista Médica de Chile*. 2008;136(6):687-93.
 9. Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairet C, Maldonado M, et al. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 2006;4(1):15-21.
 10. Baudrand B R, Arteaga U E, Moreno G M. Adipose tissue as an endocrine modulator: Hormonal changes associated with obesity. *Revista Médica de Chile*. 2010;138(10):1294-301.
 11. Manzur F, Alvear C, Alayón AN. Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*. 2010;17(5):207-13.
 12. Estay Freire A, Parra Lara R, Benitez Caceres H. Conventional and Microwave Histological Processing: A Histological, Histochemical and Immunohistochemical Comparison. *International Journal of Morphology*. 2008;26(2):317-24.
 13. Moore-Carrasco R, Aranguéz-Arellano C, Razmilic I, Toloza L, Morales E, Argiles JM, et al. A high fat diet in CF-1 mice: An experimental model for metabolic syndrome. *Mol Med Rep*. 2008;1(3):401-5.
 14. Shao D, Bartley GE, Yokoyama W, Pan Z, Zhang H, Zhang A. Plasma and hepatic cholesterol-lowering effects of tomato pomace, tomato seed oil and defatted tomato seed in hamsters fed with high-fat diets. *Food Chem*. 2013;139(1-4):589-96.
 15. Khayat Nouri MH, Namvaran Abbas Abad A. Comparative study of tomato and tomato paste supplementation on the level of serum lipids and lipoproteins levels in rats fed with high cholesterol. *Iran Red Crescent Med J*. 2013;15(4):287-91.
 16. Ruggiero C, Cherubini A, Guralnik J, Semba RD, Maggio M, Ling SM, et al. The interplay between uric acid and antioxidants in relation to physical function in older persons. *J Am Geriatr Soc*. 2007;55(8):1206-15.
 17. Elsenberg E., Sels J., Hillaert MA, Schoneveld AH, van den Dungen N., van Holten TC, et al. Increased cytokine response after toll-like receptor stimulation in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2013;231(2):346-51.
 18. Tyrrell DJ, Goldstein DR. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(1):58-68.
 19. Miranda-Díaz AG, Hermosillo-Sandoval JM, Huerta-Rosas G, López-Guillén GG, Cardona-Munoz EG, Garcia-Iglesias T, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels among patients suffering a bile duct injury during cholecystectomy. *Revista Médica de Chile*. 2010;138(10):1259-63.
 20. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol*. 2018;9:586.

21. Mao B, Zhang J, Zhuo F. MCP-1-2518A > G Polymorphism and Myocardial Infarction Risk: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2013;17(12):857-63.
22. Zhang YH, Zhang YH, Dong XF, Hao QQ, Zhou XM, Yu QT, et al. ACE2 and Ang-(1-7) protect endothelial cell function and prevent early atherosclerosis by inhibiting inflammatory response. *Inflamm Res*. 2015;64(3-4):253-60.
23. Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. Inflammatory biomarkers: The link between obesity and associated pathologies. *Nutricion Hospitalaria*. 2007;22(5):511-27.
24. Pérez-Bravo F, Soto M F, López A P, Eyzaguirre C F, Codner E. -174 G/C polymorphism of interleukin 6 gene in women with type 1 diabetes. *Revista Médica de Chile*. 2011;139(2):158-64.
25. Viridis A, Colucci R, Bernardini N, Blandizzi C, Taddei S, Masi S. Microvascular Endothelial Dysfunction in Human Obesity: Role of TNF-alpha. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(2):341-8.