



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

**“EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO METANÓLICO DE ESPINACA EN HÍGADOS DE RATAS
HIPERGLUCÉMICAS, ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DE FACTORES ANTIOXIDANTES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN
GASTROENTEROLOGÍA

P R E S E N T A:

Oscar Leonel García Rodas

Dr. José Javier Flores Estrada.
DIRECTOR DE TESIS CLÍNICO

Dra. Scherezada María Isabel Mejía Loza
DIRECTOR DE TESIS METODOLÓGICO

Ciudad de México 2022

NÚMERO DE REGISTRO DEL PROTOCOLO: HJM: 0713 / 19-I



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

**“EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO METANÓLICO DE ESPINACA EN HÍGADOS DE RATAS
HIPERGLUCÉMICAS, ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DE FACTORES ANTIOXIDANTES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN

GASTROENTEROLOGÍA

P R E S E N T A:

Oscar Leonel García Rodas

**Dr. José Javier Flores Estrada.
DIRECTOR DE TESIS CLÍNICO**

**Dra. Scherezada María Isabel Mejía Loza
DIRECTOR DE TESIS METODOLÓGICO**

Ciudad de México 2022

NÚMERO DE REGISTRO DEL PROTOCOLO: HJM: 0713 / 19-I

AUTORIZACIÓN DE TESIS

Título de tesis:

"EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO METANÓLICO DE ESPINACA EN HÍGADOS DE RATAS HIPERGLUCÉMICAS, ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DE FACTORES ANTIOXIDANTES"

Número de registro:

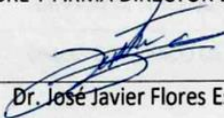
HJM: 0713 / 19-I

1-NOMBRE Y FIRMA DEL TESISISTA



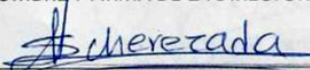
Dr. Oscar Leonel García Rodas

2.- NOMBRE Y FIRMA DIRECTOR DE TESIS CLÍNICO



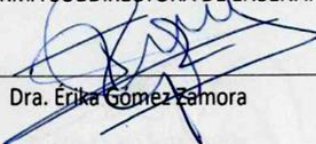
Dr. José Javier Flores Estrada

3.- NOMBRE Y FIRMA DE LA DIRECTORA METODOLÓGICO



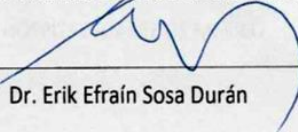
Dra. Scherezada María Isabel Mejía Loza

4.- NOMBRE Y FIRMA SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA H.J.M.



Dra. Erika Gómez Zamora

5.- NOMBRE Y FIRMA JEFE DEL SERVICIO DE POSGRADO.



Dr. Erik Efraín Sosa Durán

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 LA ESPINACA	4
3.1.1 Valor nutricional	4
3.1.2 Composición química y propiedades biológicas.....	4
3.2 DIABETES MELLITUS	6
3.2.1 Definición.....	6
3.2.2 Epidemiología	6
3.2.3 Aspectos fisiopatológicos.....	8
3.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS	9
3.5 FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR HIPERGLUCEMIA	10
3.6 LA VIA NRF2/HO-1	11
3.6.1 Nrf2 y resistencia a la insulina	13
3.7 APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR.....	13
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. PREGUNTA DE INVESTIGACION	16
6. HIPOTESIS	16

7. OBJETIVOS	16
7.1 OBJETIVO GENERAL	16
7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
8. METODOLOGIA.....	17
9.1 Materiales y métodos	17
9.1.1 Preparación del extracto de metanol de espinaca (EME).....	17
9.1.2 Consideraciones éticas.....	17
9.1.3 Inducción de diabetes en las ratas y diseño de estudio.	17
9.1.4 Evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas.....	18
9.1.5 Análisis estadístico	19
9. RESULTADOS	20
9.1 Efecto de EME en la vía Nrf2/HO-1.....	20
9.2 Efecto antioxidante de EME	22
9.3 Efecto de EME en formación de fibras de colágeno.....	23
9.4 Efecto protector de EME en el hígado de ratas diabéticas	24
10. DISCUSIÓN	26
11. CONCLUSION	28
12. FINANCIAMIENTO.....	28
13. CRONOGRAMA.....	28
14. BIBLIOGRAFIAS.....	29

1. RESUMEN

Antecedentes: En la diabetes mellitus (DM), el incremento del estrés oxidativo por hiperglicemia juega un papel importante en el daño hepático. El consumo de la espinaca tiene un efecto hepatoprotector debido a sus propiedades antioxidantes. La translocación nuclear del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) induce la expresión de la hemoxigenasa-1 (HO-1). HO-1 actúa como un mecanismo antioxidante, anti-inflamatorio y antiapoptótico. Sin embargo, se desconoce si la actividad antioxidante de la espinaca se asocia con la activación endógena de Nrf2/HO-1. **Material y métodos** Se utilizaron ratas Wistar macho hiperglicémicas inducidas con estreptozotocina (DM; n=7); DM tratadas con 400mg/kg de extracto metanólico de espinaca (EME) (DM-EME; n=7) y normoglicémicas (nDM; n=7). A las 12 semanas se obtuvo el tejido hepático y se cuantificó el nivel de peroxidación lipídica por la formación de malondialdehído (MDA). En cortes histológicos se detectaron las especies reactivas de oxígeno (ROS; CellRox™), formación de fibras de colágena (rojo sirio), Nrf2 nuclear, HO-1 y muerte celular (ensayo de TUNEL). Las intensidades de tinción para ROS, rojo sirio y HO-1 se evaluaron por el sistema H-score. Mientras que Nrf2 nuclear y apoptosis fue por el porcentaje de células positivas. Este estudio fue aprobado por los comités de ética (CONBIOETICA/09/CEI/002/20190327) y de investigación (HJM0713/19-I). **Resultados:** Encontramos que la distribución de las ROS fue generalizada en todo el tejido; mientras que la fibrosis y la muerte celular fueron principalmente localizadas en la región centrolobular. Nrf2 nuclear y HO-1 se encontraron en los hepatocitos de la zona 3 de rappaport. En DM-EME comparado con DM, los valores de marcadores de estrés oxidativo (ROS Y MDA), fibrosis y apoptosis disminuyeron ($p < 0.05$). Mientras que los valores de la inmunotinción para Nrf2 nuclear y HO-1 incrementaron ($p < 0.05$). En nDM, todos los parámetros estudiados fueron menores comparados a los de DM y DM-EME ($p < 0.05$). **Conclusión:** Por lo tanto, la intervención con EME en ratas diabéticas muestra tener un efecto benéfico disminuyendo la fibrosis hepática y muerte celular asociada a la disminución del estrés oxidativo y a la activación endógena de la vía Nrf2/HO-1. **Palabras clave:** hígado, estrés oxidativo, espinaca, Nrf2/HO-1, apoptosis.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico crónico caracterizado por un aumento en el nivel de glucosa en sangre (hiperglucemia), dislipidemia y resistencia a la insulina. La hiperglucemia crónica puede causar severas lesiones en el hígado. Por ejemplo, se estima que el 80% de los pacientes con lesiones hepáticas presentan alteraciones en el metabolismo, promoviendo la inflamación y fibrosis mediada por el incremento del estrés oxidativo.(Care & Suppl, 2022)

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), es un trastorno crónico caracterizado por destrucción autoinmune de las células β del páncreas, que condiciona ausencia absoluta o relativa de insulina desencadenando estados de hiperglucemia capaces de promover lesión hepática como esteatosis o esteatohepatitis. En la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), inducido por hiperglucemia, las células Kupffer y estrelladas pueden estar bajo el estrés producido por inflamación relacionado a la activación y translocación al núcleo del factor transcripcional κB (NF- κB) mediado el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS). (Care & Suppl, 2022)(Mohamed et al., 2016)

Recientemente se ha descrito que bajo estados de hiperglucemia crónica el fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADPH), a nivel de los hepatocitos y células estrelladas cataliza directamente la síntesis de ROS, los cuales se consideran puntos clave en el desarrollo de muerte celular y fibrosis (Palma-Duran et al., 2018). El incremento en la síntesis de ROS puede ser regulado por vías endógenas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPXs), glutatión reductasa (GR) y glutatión S- transferasa (GSTs). Adicionalmente, el sistema de la vía antioxidante Nrf2/HO-1 juega un rol importante en la protección hepática del daño inducido por hiperglucemia. Nrf2 puede generar un ciclo de retroalimentación positiva al inducir la transcripción de genes impulsados por elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Hamden et al., 2008). Sin embargo, el papel del sistema Nrf2-Keap1 en el desarrollo del daño hepático inducido por la diabetes y, en particular, en la protección mediada por antioxidantes exógenos no está claro y merece una investigación intensiva. La

expresión de la proteína Nrf2 regula significativamente los genes citoprotectores como HO-1. (Mohamed et al., 2016)(David et al., 2017)

Debido a que el aumento del estrés oxidativo es importante para el daño hepático, se estudian estrategias quimiopreventivas para evitarlo. Recientemente se ha demostrado que una mayor ingesta habitual de flavonoides de frutas y verduras durante la adolescencia es relevante para la prevención de factores de riesgo de diabetes tipo 2 con efecto hepatoprotector presumiblemente mediado por sus capacidades antioxidantes de sus fitoquímicos. La espinaca (*Spinacia oleracea* L.) es una hortaliza de hoja verde altamente consumida en la población mundial; y debido a sus altos niveles de fitoquímicos contenidos en ella, se ha recomendado para prevenir enfermedades crónicas relacionadas al estrés oxidativo (Marhuenda Berenguer & García Vergara, 2016).

Estudios en animales revelan que los fitoquímicos de la espinaca previenen el daño hepático inducido por diversos estímulos, disminuyendo las concentraciones séricas de marcadores de daño oxidativo, hiperglucemia y la hipertrigliceridemia. En ratas alimentadas con alto contenido de grasas, se mostró que el consumo de espinaca puede prevenir y tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico al mejorar los perfiles de glucosa, lípidos, aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina, incluyendo algunas características histológicas (L. I. Elvira-Torales et al., 2019).

Aunque la espinaca o sus fitoquímicos purificados sugieren tener propiedades antioxidantes con efectos benéficos en la diabetes, síndrome metabólico y en lesiones hepáticas, se desconoce si la planta atenúa el incremento del estrés oxidativo mediante la activación de la vía Nrf2/HO-1. El presente estudio fue diseñado para investigar si el extracto metanólico de espinaca posee un efecto hepatoprotector mediado por la activación de enzimas antioxidantes y activación de la vía Nrf2/HO-1.

3. ANTECEDENTES

3.1 LA ESPINACA

La espinaca (*Spinacea oleracea* L y sus variedades) es un alimento con múltiples propiedades, es bajo en grasas, calorías y buen aportador de fibra y micronutrientes como vitamina C, vitamina A y minerales, especialmente hierro.

Es una hortaliza de hojas comestibles de cosecha anual que se consume de diversas maneras. El primer registro de esta planta fue en China en el siglo VII; desde Persia fue introducida a España alrededor de siglo XI y de ahí se extendió al continente americano en la colonización (Morelock & Correll, 2003).

3.1.1 Valor nutricional

Cien gramos de espinaca contiene 23 calorías, 2% de carbohidratos, 3% de proteínas y 91% de agua, esta hortaliza tiene un alto contenido de proteínas (comparado con otros vegetales) y aporta una cantidad apreciable de fibra (soluble e insoluble), contiene vitamina A, C, E, K, B2, B6, B9 y proporciona minerales como hierro, calcio, magnesio, fósforo, potasio, manganeso, cobre y zinc, los cuales le otorgan su alto valor nutricional, especialmente fresca (Roberts & Moreau, 2016).

3.1.2 Composición química y propiedades biológicas

La espinaca se compone principalmente de agua (91,4%) además de pequeñas cantidades de proteínas (2,9%), carbohidratos (3,6%) y grasas (0,4%). La fracción lipídica se compone principalmente de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (como el ácido linolénico alfa72, ácido linoleico, ácido oleico) y ácidos grasos saturados (como Ácido cáprico, ácido mirístico, ácido esteárico) (Morelock & Correll, 2003) (Fabián Pighín & Lía Rossi de, 2010).

Una ración de 100g de espinaca, contiene 2,2 g de fibra, lo que equivale al 8,8% de la cantidad diaria recomendada para una dieta de 2000 kcal. Además, contiene altos

niveles de magnesio, potasio y hierro que cumplen con el 20%, 16% y 15%, respectivamente, de su cantidad diaria. La misma ración de 100gr; contiene suficientes vitaminas para alcanzar o superar parcialmente su dosis diaria recomendada, incluida la vitamina K (604%), vitamina A (188%), ácido fólico (49%) y vitamina C (47%) (Marhuenda Berenguer & García Vergara, 2016) (Roberts & Moreau, 2016).

Esta hortaliza de hoja verde es considerada como una de las fuentes más ricas de carotenos (estos son pigmentos naturales que participan en la captación de luz en la fotosíntesis, son estabilizadores de proteínas y lípidos, además de eliminar especies reactivas de oxígeno). Uno de los principales carotenos es la luteína, que se ha reportado tener propiedades preventivas para la degeneración macular y cataratas (Fabián Pighín & Lía Rossi de, 2010).

También alberga componentes fenólicos, que se producen en respuesta al estrés del medio externo, por ejemplo: bajas temperaturas, radiación ultravioleta, deficiencia de nutrientes y patógenos. Los fenoles son antioxidantes con propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales. Estos se clasifican en 4 grupos según su estructura química: Ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides. Entre los flavonoides se encuentran la quercetina, kaempferol, patuletina, espinacetina, espinatosida, jaceidina y flavona (FIGURA 1). La espinaca, junto con el brócoli, tiene el mayor contenido de ácido fenólico total entre las verduras de hoja verde, los principales ácidos fenólicos encontrados son; el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. En cuanto a los lignanos, estos son metabolizados por la microflora intestinal en fitoestrógenos biológicamente activos, enterolactona y enterodiol. Los principales lignanos que se encuentran en las espinacas son lariciresinol, secoisolariciresinol y pinoresinol (Roberts & Moreau, 2016)

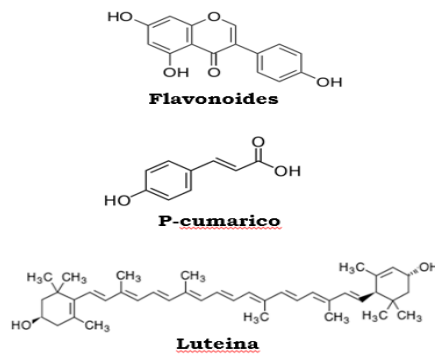


Figura 1. Adaptada de Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct.* 2016;7(8):3337–53.

3.2 DIABETES MELLITUS

3.2.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia resultada de la deficiencia parcial o total de insulina. Se puede definir como una enfermedad crónica que involucra un grupo heterogéneo de desórdenes que alteran la producción y utilización de la insulina por el organismo. La DM tipo 1, se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, produciendo una deficiencia absoluta de insulina, generalmente afecta a poblaciones infantiles y adolescentes. La DM tipo 2 es caracterizada por alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y esta representa el 90% de todos los casos de DM (Care & Suppl, 2022) (DeFronzo et al., 2015).

3.2.2 Epidemiología

La DM tipo 2 se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial (FIGURA 2). La Federación Internacional de Diabetes estimó que, en el año 2013, 382 millones de personas de 20 a 70 años a nivel mundial eran diabéticas. Las proyecciones para el año 2035 se estiman en 592 millones (Stefan & Cusi, 2022). El incremento en los factores de riesgo como la obesidad, el sedentarismo, antecedentes familiares y estilos de vida y alimentación inadecuados se encuentran en gran parte de la población mundial (DeFronzo et al., 2015).

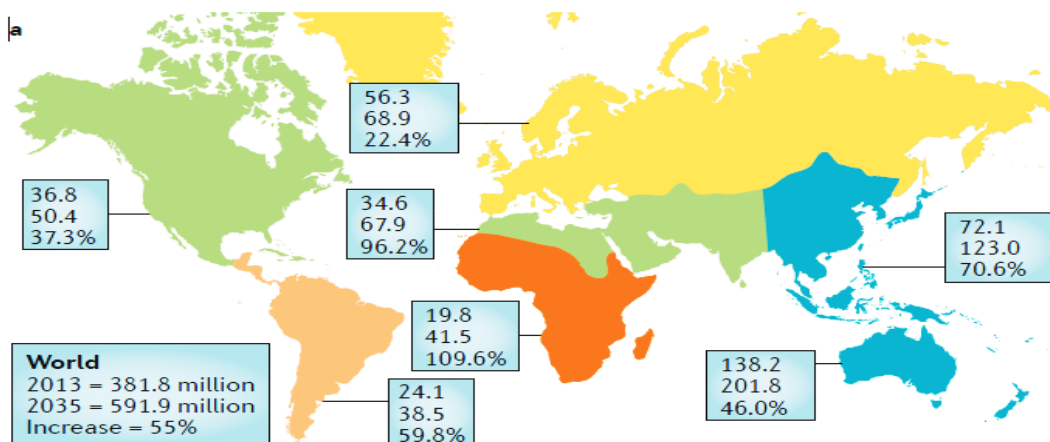


Figura 2. Adaptado de Stefan N, Cusi K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022;10(4):284–96

En México la DM tipo 2 es una epidemia que va en ascenso acelerado. Entre las enfermedades crónico-degenerativas, ha mostrado el incremento más significativo en los últimos años. En un estudio realizado en 2010 se reportó una prevalencia del 14.42% casos, y por cada caso previamente diagnosticado se identificó otro nuevo caso. La edad promedio en la que murieron las personas con diabetes en 2010 fue alrededor de los 65 años. La esperanza de vida de las personas con diabetes disminuye entre 5 y 10 años. Por otro lado, en la ENSANUT 2012 se señala que la prevalencia de diabetes, por diagnóstico previo, es del 9.17% (6.4 millones de personas) y se estima que en el 2025 será del 12.3%. En el área urbana se observó una prevalencia del 9.7%, y en la rural del 7%. Las mujeres presentaron una prevalencia del 9.67% (3.5 millones) y los hombres del 8.6% (2.8 millones), y la edad más frecuente fue entre 50 y 69 años (63.9%) (Moreno-Altamirano et al., 2014).

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, en 2013 en México existían 8.7 millones de casos de diabetes, y la prevalencia en personas de 20-79 años era del 11.77%¹. A partir del 2003, se han registrado alrededor de 400 mil casos nuevos de diabetes anualmente (FIGURA 3). En este sentido, es importante subrayar que el diagnóstico de la enfermedad se realiza cuando esta lleva entre 7 y 10 años de evolución. Durante el periodo de 2002 a 2011, la incidencia de diabetes (no ajustada por edad) pasó de una tasa de 308.6 a 391.07 por 100,000 habitantes,

lo que significa que ha continuado aumentando paulatinamente (Moreno-Altamirano et al., 2014).

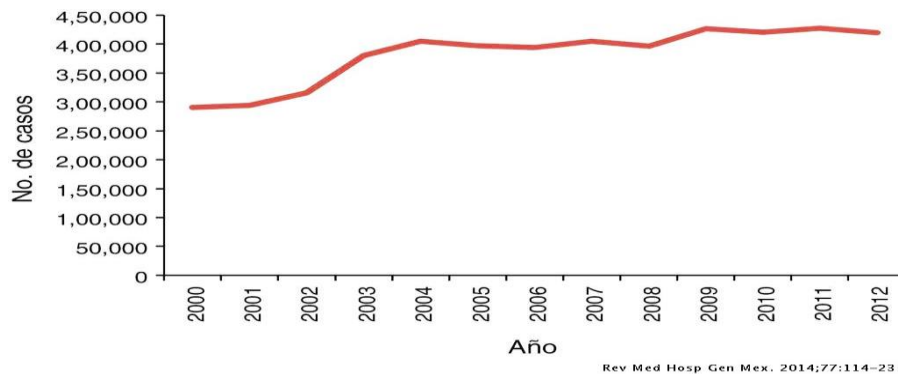


Figura 3. Adaptado de Rev Med Hosp Gen Mex 2014;77:114

3.2.3 Aspectos fisiopatológicos

La insulina es sintetizada y liberada por el páncreas en respuesta al estímulo de hiperglucemia, permitiendo así el uso de glucosa en tejidos periféricos. En el músculo esquelético y el tejido adiposo, la insulina estimula la captación de glucosa mediante la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la superficie celular (DeFronzo et al., 2015).

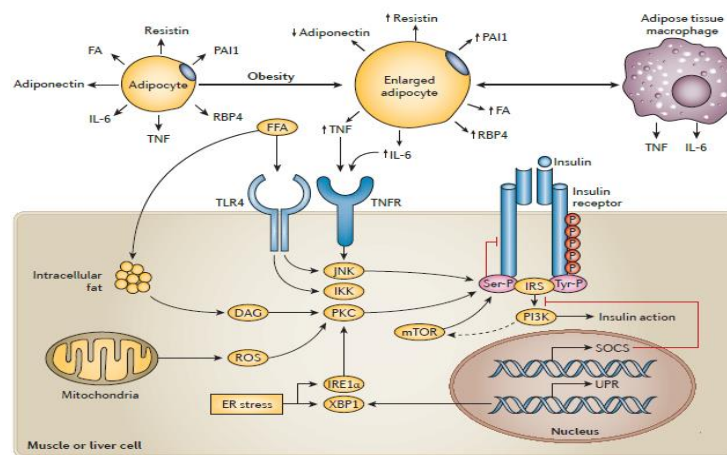
En el hígado, la insulina también disminuye la gluconeogénesis hepática, evitando la entrada de más glucosa en el torrente sanguíneo. Teniendo como resultado final, el incremento de la absorción de la glucosa, reduciendo sus niveles séricos. La RI sucede cuando existe un descenso de la capacidad de respuesta a la insulina en el tejido periférico como el adiposo, músculo esquelético o el hígado.

La unión de la insulina con su receptor tirosina quinasa, produce la fosforilación de tirosina y la activación de dos vías paralelas; la vía de la proteína-quinasa activada por mitocondrias (MAP) y la vía de la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K), esta última vía es responsable de muchos de los efectos descritos de la insulina, a nivel endotelial activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y bloquea la activación de la vía de las caspasa-9, evitando la inducción de apoptosis prematura en el tejido (DeFronzo et al., 2015) (Huang, 2009).

La vía MAP, regula la producción de endotelina-1, produciendo vasoconstricción, expresión de las moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y E-Selectina; teniendo como resultado una fuerte interrelación leucocito-endotelio, aumento de factores de crecimiento y mitogenesis en células de musculo liso de la pared vascular (Byrne & Targher, 2015).

En condiciones patológicas la vía PI3K se ve afectada, mientras que la vía MAP quinasa no. Produciendo un desequilibrio entre estas dos vías, como una disminución en la producción de eNOS, desencadenando disfunción endotelial y reducción de la translocación GLUT-4. Al continuar la vía MAP quinasa, continua la producción de factores proinflamatorios estresando así al endotelio vascular, factor clave para el desarrollo de aterosclerosis (FIGURA 4) (Byrne & Targher, 2015).

Figura 4. Adaptado de Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. J Hepatol.



2015;62(S1):S47-64.

3.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS

El estrés oxidativo ocurre cuando la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante endógena de neutralizar estos compuestos químicos altamente reactivos. El daño celular resultante, como el entrecruzamiento del ADN y la apoptosis, es un sello distintivo del estrés oxidativo y es un proceso patológico fundamental en el cáncer, el envejecimiento y una variedad de enfermedades crónicas. En la diabetes mellitus, se sabe desde hace mucho tiempo que la pérdida

homeostasis redox desempeña un papel en la patogenia de la enfermedad y sus complicaciones a través de una variedad de mecanismos, y se ha demostrado que los pacientes diabéticos poseen niveles celulares aumentados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ROS- daño inducido al ADN (Bonnardel et al., 2019). Se ha demostrado que el aumento de la carga glucémica en la diabetes abruma el ciclo de Krebs, lo que resulta en la inhibición de la transferencia de electrones dentro de la membrana mitocondrial y la acumulación de radicales libres. En particular, estos radicales libres incluyen los compuestos superóxido e hidroxilo altamente reactivos. A medida que aumenta la producción de ROS, se produce una regulación positiva de cuatro vías bioquímicas. Estas perturbaciones dan como resultado una variedad de efectos posteriores que se sabe que subyacen a la patogénesis y progresión de la diabetes mellitus, incluido el agotamiento de las moléculas antioxidantes naturales y el daño a las células vasculares, así como alteraciones en la expresión de genes y proteínas, el flujo sanguíneo y la permeabilidad de las células endoteliales (Targher et al., 2021).

3.5 FIBROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR HIPERGLUCEMIA

La hiperglucemia crónica sostenida, induce una serie de daños a nivel sistemático, como lo es disfunción de la microcirculación, resistencia a la insulina, estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo y aumento de la expresión de factores inflamatorios a nivel hepático, desencadenando así enfermedad de hígado graso no alcohólico con progresión a fibrosis hepática y la consecuente cirrosis.

El factor de necrosis tumoral α es una citocina inflamatoria, involucrada en el daño hepático. Las células estrelladas juegan un papel importante durante el desarrollo de fibrosis hepática, incrementado hasta 10 veces la producción de proteínas de la matriz extracelular, principalmente fibras de colágeno, acumulándose en el espacio perisinosoidal obstruyendo así el flujo bidireccional de intercambio de macronutrientes entre el hepatocito y el espacio sinusoidal. Las células estrelladas activadas se denominan miofibroblastos, los cuales se forman en respuesta a múltiples eventos inflamatorios, siendo el TNF- α uno de los que tiene un papel más

importante. Recientemente se ha descrito un efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de espinaca sobre esta vía inflamatoria. Los macrófagos o células de Kupffer, otras células implicadas en el desarrollo de fibrosis activan vías de señalización como la NK-kB mediada por el TNF- α e IL-1, provocando muerte prematura del hepatocito, evento inicial que provoca inflamación y fibrosis (FIGURA 5) (Fernando et al., 2019).

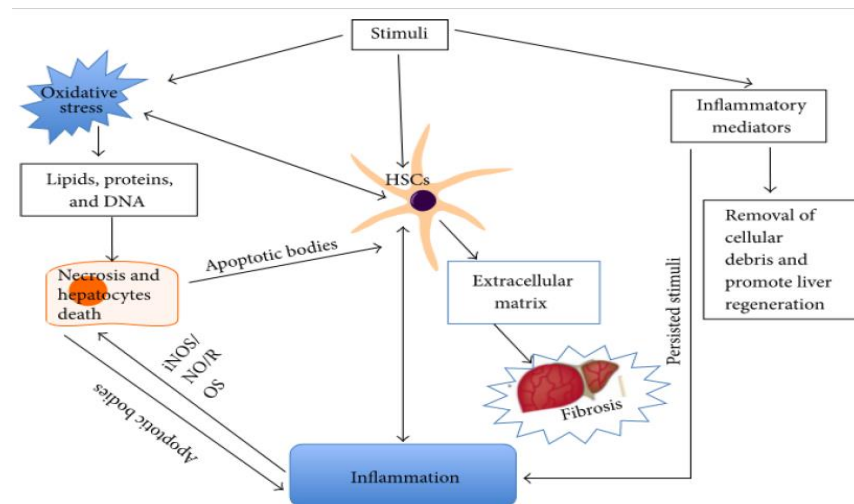


Figura 5. Adaptado de Fernando DH, Forbes JM, Angus PW, Herath CB. Development and progression of non-alcoholic fatty liver disease: The role of advanced glycation end products. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20).

3.6 LA VIA NRF2/HO-1

La regulación de la homeostasis redox celular tanto en condiciones estresadas como no estresadas ocurre principalmente a nivel transcripcional, y la vía HO-1 / Nrf2 es el mediador principal de esta respuesta. Esta vía de señalización regula la expresión de más de 100 genes y funciones relacionadas con el estrés oxidativo y la supervivencia celular, incluidas las proteínas antioxidantes directas, las enzimas de desintoxicación de electrófilos de fase I y II, el transporte de solutos tóxicos, el metabolismo de los radicales libres, la inhibición de la inflamación, la homeostasis del glutatión, la función del proteasoma y el reconocimiento del daño del ADN.

El principal mediador de esta respuesta es el factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2), un factor de transcripción maestro. Nrf2 desencadena la inducción transcripcional de múltiples enzimas desintoxicantes. En condiciones no

estresadas, la actividad de Nrf2 es suprimida por su represor nativo Kelch-like ECH-like protein 1 (Keap1), a través de interacciones con el extremo C del sitio de fosforilación del dominio homólogo Nrf2-ECH (Neh2) en Nrf2. Keap1 es una proteína adaptadora citoplasmática asociada al citoesqueleto de actina del complejo E3-ligasa basado en Cullin3- (Cul3-), que marca Nrf2 para ubiquitinación y posterior degradación proteosómica dentro del citoplasma. Esta vía de señalización se ha establecido como el principal mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo, tanto fisiológicamente como en una amplia gama de modelos de enfermedades. Se entiende que la modificación de los residuos de cisteína en la estructura primaria de Keap1, que actúan como sensores celulares para inductores de estrés ambiental, por especies químicas reactivas al tiol durante estados de exceso de estrés oxidativo o electrofílico da como resultado la interrupción del Nrf2-Keap1. dímero y estabilización de Nrf2. Con la ayuda de una secuencia de localización nuclear, el heterodímero Nrf2 puede translocarse rápidamente al núcleo y unirse al ARE, lo que resulta en el reclutamiento de elementos necesarios para la activación transcripcional de una variedad de genes como la glutatión S-transferasa A2 (GSTA2). NADPH quinona oxidorreductasa (NQO-1), superóxido dismutasa (SOD1) y hemo oxigenasa-1 (Ho-1). HO-1 regulado por Nrf2 es una enzima presente en el hígado que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Estas enzimas antioxidantes funcionan para transformar los radicales libres en sustancias menos tóxicas a través de cuatro mecanismos principales: (1) reacciones de oxidación y reducción, en las que se exponen grupos funcionales de moléculas hidrófobas, (2) procesos de atrapamiento nucleofílico, (3) salida del transportador de metabolitos tóxicos. y (4) mantenimiento de condiciones reducidas por moléculas que contienen tiol. Este mecanismo de reconocimiento de estrés protector de Keap1 asegura la supresión de Nrf2 durante condiciones no estresadas y una respuesta antioxidante adecuada durante períodos de estrés celular excesivo (Mohamed et al., 2016) (David et al., 2017) (U. E. Lee & Friedman, 2011).

3.6.1 Nrf2 y resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina en una amplia gama de tejidos es un sello distintivo de la diabetes mellitus, lo que produce niveles elevados de glucosa en sangre y exacerbación del daño pancreático al intentar compensar la hipoglucemia percibida. En modelos murinos de sobreexpresión de Nrf2 a través de la eliminación genética de Keap1 y la inducción farmacológica sugieren que la activación de Nrf2 puede mejorar la sensibilidad a la insulina en la diabetes y anular la diabetes y la obesidad en ratones. Otros estudios demostraron que la inducción de Nrf2 en ratones también suprimió la gluconeogénesis, debido a la represión transcripcional de una variedad de enzimas, incluida la enzima gluconeogénica glucosa-6-fosfatasa (G-6-P). *In vitro* los estudios que utilizan hepatocitos murinos confirmaron que Nrf2 atenúa la expresión de G-6-P en estas células, a pesar de la estimulación de la gluconeogénesis utilizando un análogo de cAMP. Además de su efecto inhibitorio sobre G-6-P, se demostró que Nrf2 disminuye la expresión de otros genes relacionados con la gluconeogénesis, así como aumenta la sensibilidad a la insulina en una prueba de tolerancia a la insulina (Ko et al., 2014) (Sultana & Anwar, 2008).

3.7 APOPTOSIS Y MUERTE CELULAR

La apoptosis un modo controlado de muerte celular programada, caracterizado por cambios estructurales en la célula, como lo son ampollas en la membrana celular, cromatina nuclear condensada y ADN cromosómico fragmentado (Ko et al., 2014)(Bonnardel et al., 2019).

Los modos no controlados de muerte celular incluyen necrosis, necroptosis, autofagia y carnificación. Esta muerte celular no controlada induce respuesta inflamatoria, lisis celular y problemas de salud. Alteraciones en la regulación de la apoptosis puede también causar alteraciones como neogénesis, enfermedades autoinmunes, desordenes neurodegenerativos etc (Bilal et al., 2016)(Kohl et al., 2013).

La apoptosis puede ser activada por inducción negativa o inducción positiva. La inducción negativa puede ser a través de pérdida de factores de crecimiento, pérdida de actividad supresora, etc. La inducción positiva es la consecuencia de la unión de ligando con receptor activando vías de señalización. Los receptores se ubican en la membrana citoplasmática, y estos se pueden clasificar en dos grupos: Los receptores cuya activación inducen muerte celular llamados receptores de muerte (FAS y Receptores de TNF- α) y los receptores que normalmente cumplen funciones de homeostasis, sin embargo, la sobreactivación induce muerte (receptores de trombina, glutamato y canales iónicos dependientes de voltaje).

Los receptores de muerte se encuentran transmembrana, con un dominio extracelular abundante en cisteína y un dominio intracelular conocido como dominio de la muerte. La proteína Fas, en su porción intracelular se une con FADD (factor associated death domain) activando las caspasas 8 y 10.

El TNRF se enlaza con complejos como el TRADD (TNFR-associated death domain) este complejo actúa como una plataforma para reclutar moléculas de señalización y activar factores de transcripción como NF- κ B y el JNK/AP-1). Existe una diferencia entre la activación de receptores Fas y TNFR, este último no siempre desencadena el proceso de apoptosis, por existencia de factores celulares que suprimen los estímulos apoptóticos generados por el TNF- α (Huang, 2009).

4. JUSTIFICACIÓN

Los factores de riesgo de la población mexicana para el desarrollo de diabetes mellitus fue evidenciado en el año 2016 por medio de la encuesta nacional de salud y nutrición, en donde estableció que la prevalencia de diabetes mellitus ha incrementado en casi un 10% con respecto al año 2012 y las proyecciones a futuro según la organización mundial de la salud consideran que para el año 2025 8.5% de las personas a nivel mundial presentaran esta entidad. La formación de especies reactivas de oxígeno conduce a un rápido desarrollo de estados inflamatorios a nivel sistémico. En el hígado, ROS inducen la muerte celular y fibrogénesis. La vía de la Nrf2/HO-1 juega un rol importante para mantener una homeostasis redox. Los fitoquímicos contenidos en la espinaca han sido estudiados por sus mecanismos antioxidantes, sin embargo, es poco conocido el efecto que puede tener sobre la atenuación del daño inducido por hiperglucemia basándose en la disminución del estrés oxidativo mediante la activación de la vía Nrf2/HO-1. Por este motivo, el presente estudio se centra en investigar si dentro de las propiedades benéficas de la espinaca se encuentra un mecanismo activador de la vía HO-1/Nrf2 que condicione reducción del estrés oxidativo en ratas hiperglucémicas.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La espinaca podrá evitar el daño hepático, asociado a la activación de la vía Nrf2/HO-1 en ratas con hiperglicemia?

6. HIPOTESIS

Los fitoquímicos contenidos en el extracto metanólico de espinaca posee propiedades antioxidantes con efectos protectores en hígados de ratas hiperglucémicas asociado a la activación de la vía Nrf2/HO-1.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante de los fitoquímicos contenidos en el extracto de espinaca sobre el daño hepático inducido por hiperglucemia en ratas.

7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la actividad nuclear de Nrf2 en el tejido de hepático de ratas diabéticas tratadas con extracto metanólico de espinaca (EME).

Evaluar la actividad de HO-1 en el tejido hepático de ratas diabéticas tratadas con EME.

Determinar el daño hepático inducido por estrés oxidativo por medio de la determinación de MDA y ROS.

Determinar la lesión del parénquima hepático inducido por estrés oxidativo por medio de la medición de la formación de fibras de colágeno y apoptosis celular.

8. METODOLOGIA

9.1 Materiales y métodos

9.1.1 Preparación del extracto de metanol de espinaca (EME)

Las hojas frescas de espinaca (*S. oleracea* L.) fueron cosechadas en la temporada otoño-invierno en un campo agrícola del estado de Puebla, México, El espécimen fue identificado y registrado con el número 4532 en el herbario del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para la extracción de los componentes polares, las hojas fueron deshidratadas y molidas finamente. Por cada 5 kg de la planta, se añadieron 5 litros de metanol (50% v / v) y se incubaron dos veces a temperatura ambiente por 4 horas usando un evaporador de vacío rotativo (BUCHI Rotavapor R-200, Suiza) y luego el EME fue filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa con tamaño del poro de 8 μ M (Whatman®). Posteriormente, para eliminar los residuos de metanol, EME fue de nuevo incubado en el evaporador a 45 ° C por 8 horas, obteniendo un material viscoso de 19.0 g / L. El EME se almacenó en la oscuridad a 4 ° C hasta su uso.

9.1.2 Consideraciones éticas.

Ratas macho de la cepa Wistar fueron donadas por el bioterio del INCar, con la previa aceptación del protocolo por su Comité de Ética en Investigación (CONBIOETICA/09/CEI/002/20190327) y por el comité de investigación del Hospital Juárez de México (HJM0713/19-1).

Durante la experimentación, El cuidado y manejo de los animales estuvo bajo la responsabilidad del encargado del bioterio de la unidad de cirugía experimental del HJM, siguiendo las especificaciones descritas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas se mantuvieron en un rango de temperatura de 18 a 26°C, con humedad relativa del 40-70% y un ciclo alternante luz/oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron con dieta estándar (LabDiet 5001®, PMI Nutrition INT'L., LLC) y agua *ad libitum*. Los desechos biológicos y materiales punzo cortantes se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, así como la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.

9.1.3 Inducción de diabetes en las ratas y diseño de estudio.

Las ratas macho con un peso de 280 ± 10 gr se pusieron en ayuno durante 8 horas. La inducción de la diabetes se realizó administrando por vía intraperitoneal, una dosis de estreptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA.) a 60 mg/kg, preparada en una solución amortiguadora de citratos (10 mM, pH 4.5) (Akbarzadeh et al., 2007). Tres días después de la inducción se cuantificaron los niveles de glucosa plasmática usando un glucómetro (One touch ultra mini; Roche diagnostic, GmbH). Las ratas con niveles glucémicos superiores a 200 mg/dL-1 se reclutaron para el estudio (Kohl et al., 2013).

Los animales diabético (DM) se dividieron aleatoriamente en 3 grupos ($n = 7$): 1, DM tratado intragástricamente con 2 ml de agua potable (DM); 2, DM tratado con 400 mg/kg de EME (DM-EME). Además, se incluyeron ratas no diabéticas tratadas con vehículo (nDM; $n=7$). Todas las dosis se administraron cada 24 horas (9:00 a.m.) hasta los 45 días de experimentación.

El régimen de dosificación de EME se basó en que: 1.- Siete gramos del extracto es equivalente a un consumo diario de 100 g de espinaca cruda por persona (70 kg de peso promedio), lo que corresponde a 100 mg de EME/kg; 2.- Debido al metabolismo acelerado de las ratas, el consumo de EME se incrementó cuatro veces más, es decir, 400mg/kg. En cuanto a la dosis de AG (50 mg/kg), se fundamentó por estudios previos en ratas diabéticas.

9.1.4 Evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas

Previo al sacrificio, los animales fueron preanestesiados y quirúrgicamente se insertó una cánula en la vena cava, administrando una sobredosis de pentobarbital [210 mg/kg]. Los órganos fueron inmediatamente perfundidos con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X; 100mM, pH 7.4), mezclada con heparina [10 UI/ mL] y luego el hígado fue diseccionado.

Secciones de hígado se fijaron en formalina neutra, deshidratados en alcoholes graduales y embebidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 2 μ m de espesor y montados en laminillas electrocargadas (Micro Slide, Cristal Cruz Santa Cruz, biotechnology, Inc.). Para determinar el grado de daño morfológico y formación de fibras de colágeno, se realizaron tinciones con rojo sirius.

Otras secciones histológicas se desparafinaron y se rehidrataron en alcoholes graduales hasta una solución de recuperación antigénica (ImmunoDNA Retriever 20X con citrato; BioSB). Luego, las laminillas se montaron en una cámara húmeda (Shandon sequenza; Thermo Fisher Scientific, Inc) y se incubaron con bloqueador universal por una hora a 25°C (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, EE. UU.). Se cuantificó el nivel de peroxidación lipídica por la formación de malonaldehído (MDA). En cortes histológicos se detectaron las especies reactivas de oxígeno (ERO; CellRox™), formación de fibras de colágena (rojo sirio), Nrf2 nuclear, HO-1 y muerte celular (ensayo de TUNEL).

Las intensidades de tinción para ERO, rojo sirio y HO-1 se evaluaron por el sistema H-score. Mientras que Nrf2 nuclear y apoptosis fue por el porcentaje de células positivas.

Para la observación histológica y la captura de imágenes se usó un microscopio Axio Imager.A2 con una cámara integrada (axiocam ICc5; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania). Para medir el porcentaje de células inmunomarcadas y las intensidades de tinción, se tomaron micrografías del tejido hepático (10 campos por sección a 200X de magnitud). Las imágenes se analizaron con el software Image-Pro-Plus versión 6.0. Los resultados de inmunohistoquímica se evaluaron un sistema de puntaje, H Score ($H\text{ Score} = (\% \text{ células de tinción débil} \times 1) + (\% \text{ células de tinción intermedia} \times 2) + (\% \text{ células de tinción intenso} \times 3)$)ⁱ.

9.1.5 Análisis estadístico

Utilizamos el software GraphPad Prism (La Jolla, CA, EE. UU.; Versión 5.0). Para 40 mediciones por grupo, se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Los valores son mostrados con la media y su desviación estándar (media \pm DE). En el porcentaje de tinción de las inmunotinciones se realizaron con una prueba ANOVA unidireccional seguida de la prueba de Tukey. Los niveles de formación de MDA fueron analizados por Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn. Los datos histológicos se analizaron por ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey. $p < 0.05$ fue considerado significativo.

9. RESULTADOS

9.1 Efecto de EME en la vía Nrf2/HO-1

Para determinar el efecto benéfico del extracto metanólico de las hojas de espinaca (EME) en hígados de ratas diabéticas, relacionado a la activación de la vía antioxidante del factor nuclear eritroide 2/ hemooxigenasa 1 (Nrf2/HO-1), se evaluaron las tinciones en núcleo y la tinción citoplasmática, respectivamente.

La figura 6 A-C, muestra la tinción nuclear de Nrf2 localizadas principalmente en los hepatocitos de los grupos de ratas no diabéticas (A: nDM), diabéticas inducidas con estreptozotocina (B; DM) y ratas diabéticas tratadas con extracto metanólico de espinaca (C; DM-EME). La figura 6D muestra la gráfica de cajas y bigotes de los porcentajes de tinción nuclear de Nrf2. Comparado con nDM (28.32 ± 3.0), las ratas DM (21.84 ± 2.70) muestran menor porcentaje en la tinción ($p < 0.05$). Mientras que el marcaje en los hepatocitos de las ratas DM-EME (40.51 ± 3.48) presentaron un incremento comparado con el grupo nDM y DM ($p < 0.01$, respectivamente).

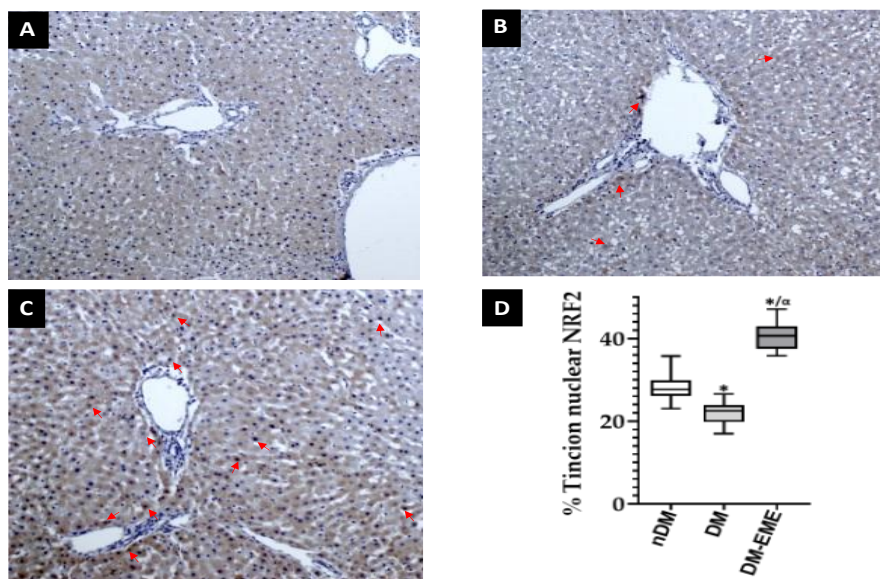


Figura 6. Imágenes representativas del efecto del extracto metanólico de espinaca (EME) sobre la tinción nuclear de Nrf2 en hígados de los grupos estudiados. En A, ratas no diabéticas (nDM); B, ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (DM) y en C, DM tratadas con EME (DM-EME). Las flechas rojas indican la tinción nuclear de Nrf2. En D muestra el porcentaje y su significancia de tinción de Nrf2 nuclear entre los grupos. * $p < 0.05$ comparado el grupo nDM. # $p < 0.01$ comparado el grupo DM.

En la figura 7 A-C se muestran los efectos del EME en la expresión de HO-1 a nivel citoplasmático de los grupos estudiados. Ratas no diabéticas (A: nDM), diabéticas inducidas con estreptozotocina (B; DM) y ratas diabéticas tratadas con extracto metanólico de espinaca (C; DM-EME). La figura 7D muestra la gráfica de cajas y bigotes de los porcentajes de unidad de intensidad relativa (% UIR). Comparado con nDM (28.08 ± 2.54), las ratas DM (21.56 ± 2.49) muestran menor porcentaje en la tinción ($p < 0.05$). Mientras que el marcaje en los hepatocitos de las ratas DM-EME (39.6 ± 2.31) presentaron un incremento comparado con el grupo nDM y DM ($p < 0.01$, respectivamente).

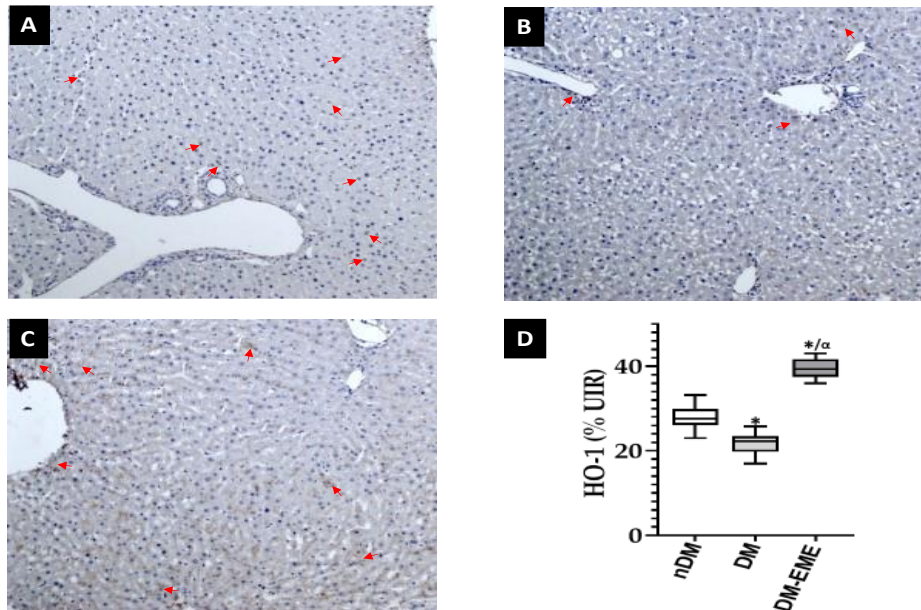


Figura 7. Imágenes representativas del efecto del EME sobre la tinción citoplasmática de hemooxigenasa-1 (HO-1) en hígados de los grupos estudiados. En A, nDM; B, DM y en C, DM-EME. Las flechas rojas indican la tinción citoplasmática de HO-1. En D muestra los porcentajes de unidad de intensidad relativa (% UIR). * $p < 0.05$ comparado el grupo nDM. $^{\alpha}p < 0.01$ comparado el grupo DM.

9.2 Efecto antioxidante de EME

En la figura 8 A-C se muestra la distribución de marcadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el parénquima hepático de los tejidos estudiados (nDM, DM y DM-EME). En la figura 8D muestra que los niveles de intensidad de tinción ROS en DM (42.41 ± 4.28) es incrementada comparada con el grupo nDM (14.32 ± 2.44 ; $p < 0.01$) y DM-EME (21.03 ± 4.17 ; $p < 0.05$)

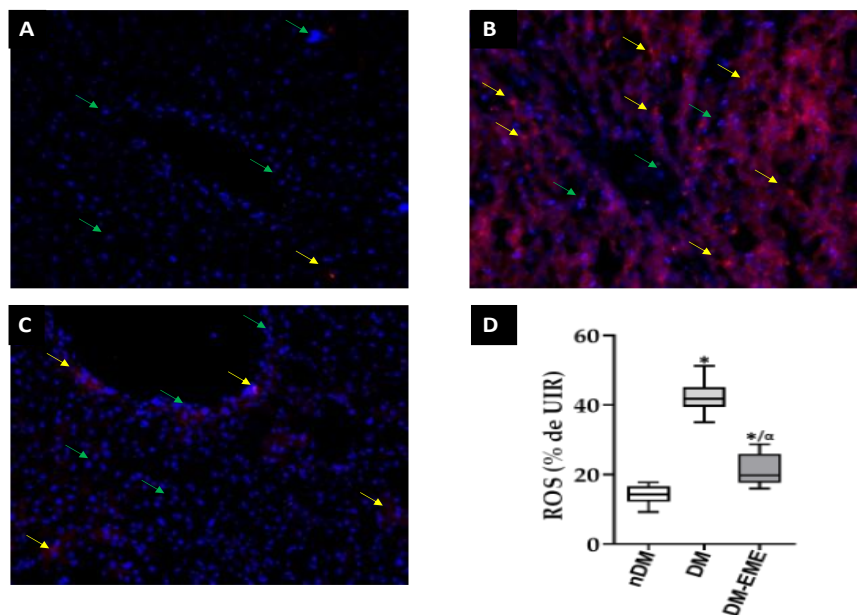
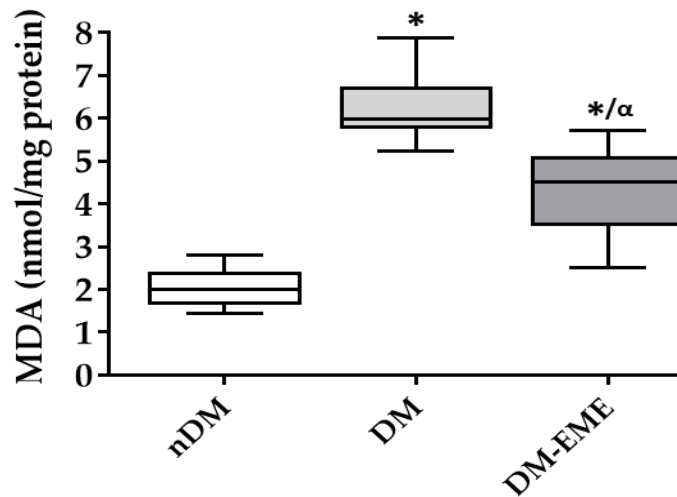


Figura 8. Imágenes representativas del efecto del EME sobre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el parénquima hepático de los grupos estudiados. En A, nDM; B, DM y en C, DM-EME. Las flechas amarillas indican la distribución celular de radicales libres de oxígeno y las flechas verdes núcleos teñidos con 4'6, diamidino-2-fenilindol (DAPI). En D muestra los porcentajes de unidad de intensidad relativa (% UIR). * $p < 0.05$ comparado el grupo nDM. ^a $p < 0.01$ comparado el grupo DM.

El efecto antioxidante fue determinado por el ensayo de peroxidación lipídica usando los niveles de formación de malondialdehído (MDA) en nmol/mg de proteína. En la gráfica 1 muestra que los niveles de MDA en el grupo de DM-EME (4.34 ± 0.98) disminuye significativamente comparado con el grupo DM (6.29 ± 0.76 ; $p < 0.05$). En nDM, el nivel de MDA (2.07 ± 0.42) fue menor comparado con los grupos diabéticos ($p < 0.01$)



Gráfica 1. Efecto antioxidante de EME en hígado de ratas diabéticas determinado por la formación de malondialdehído (MDA) en los grupos nDM, DM y DM-EME. Los niveles son mostrados en gráficas de cajas y bigotes. *p < 0.01 comparado el grupo nDM. ^αp < 0.05 comparado el grupo DM.

9.3 Efecto de EME en formación de fibras de colágeno

Para determinar si EME modifica la fibrosis hepática en ratas diabéticas, se evaluó la formación de fibras de colágeno utilizando la tinción de Rojo Sirius (figura 9A-C). Por microscopia se muestra que en DM (B) (25.17 ± 3.62) existe un incremento en la formación de colágeno en la zona 3 de rappaport (periportal) comparado con los grupos nDM (12.32 ± 2.07 ; $p < 0.01$) y DM-EME (17.55 ± 1.37 ; $p < 0.01$). Los niveles de formación de colágeno son menores que en DM (figura 9D).

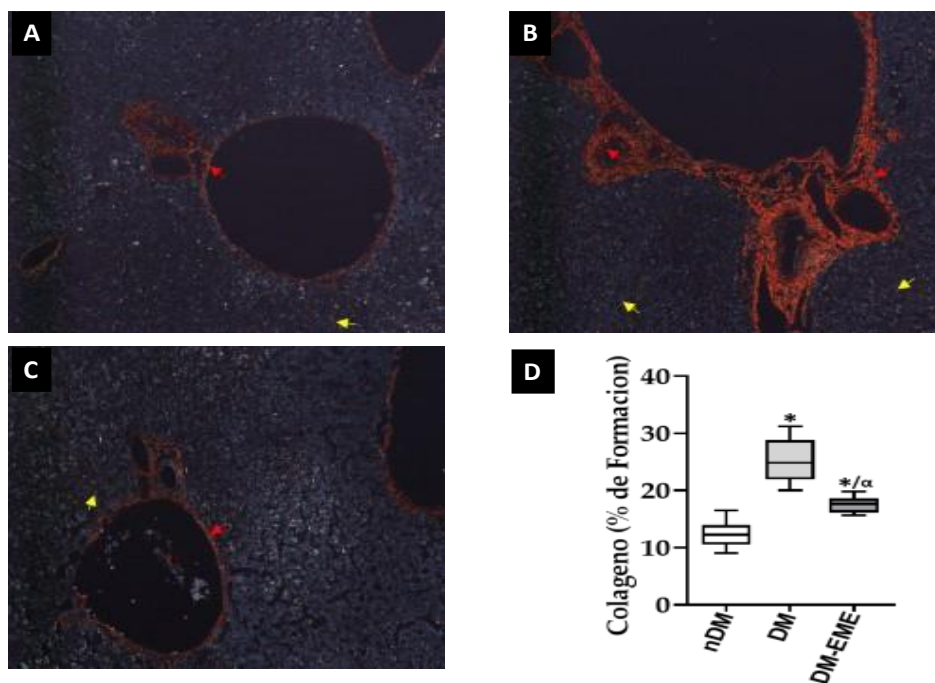


Figura 9. Imágenes representativas del efecto del EME en la formación de fibras de colágeno en el parénquima hepático de los grupos estudiados. En A, nDM; B, DM y en C, DM-EME. Las flechas rojas indican los valores en pixeles de la intensidad mínima y las flechas amarillas la intensidad máxima. En D muestra los porcentajes de formación. * $p < 0.01$ comparado el grupo nDM. $^{\alpha}p < 0.01$ comparado el grupo DM.

9.4 Efecto protector de EME en el hígado de ratas diabéticas

El efecto protector de EME en el hígado de ratas diabéticas fue evaluado por la muerte celular la cual fue determinada por TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay). La figura 10 A-C se observa la distribución de núcleos positivos. Sin embargo, en B existe un mayor número de núcleos positivos en el parénquima hepático, principalmente en la zona 3 de rapport (periportal) comparado con los demás grupos. La figura 10D muestra una gráfica de cajas y bigotes que expresa el porcentaje de núcleos positivos. En DM el porcentaje de núcleos positivos fue de 48.84 ± 6.89 , mayor que en nDM 19.20 ± 3.76 ($p < 0.01$) y que en DM-EME 29.19 ± 3.21 ($p < 0.01$).

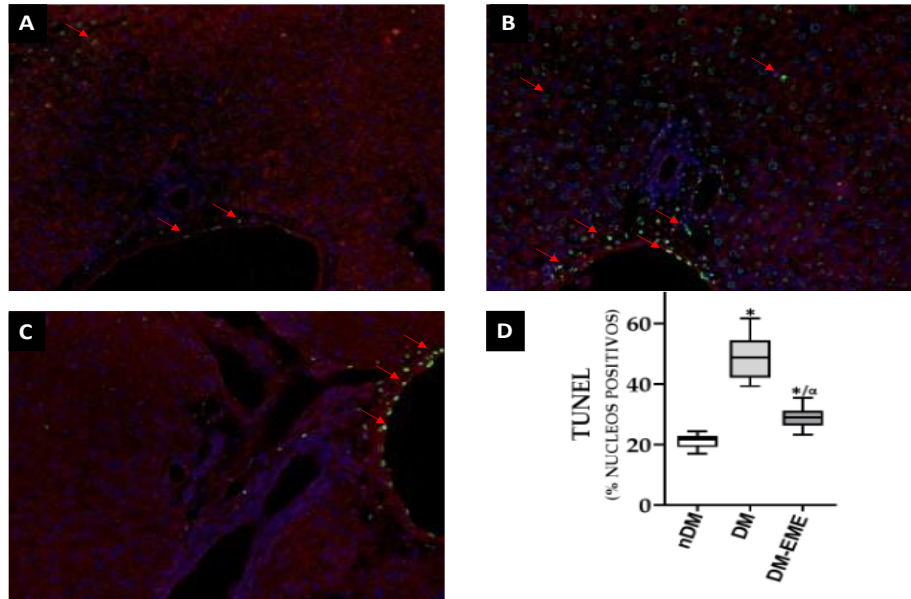


Figura 10. Imágenes representativas del efecto protector del EME en hígados de ratas diabéticas determinado por la muerte celular (TUNEL) en el parénquima hepático. En A, nDM; B, DM y en C, DM-EME. Las flechas rojas indican núcleos celulares positivos. En D muestra los porcentajes de núcleos positivos y la significancia. * $p < 0.01$ comparado el grupo nDM. ^a $p < 0.01$ comparado el grupo DM.

10. DISCUSIÓN

La DM es una enfermedad con un crecimiento exponencial en las últimas décadas (DeFronzo et al., 2015). La hiperglucemia resultante ocasiona lesión celular en diversos sistemas y órganos del cuerpo asociado a la activación de diversas vías de señalización de tipo oxidativas, muerte celular por apoptosis e inflamatorias (Mohamed et al., 2016). La lesión hepática causada por el descontrol glucémico ha sido tema de interés en los últimos años, por lo que recientes investigaciones se han enfocado a desarrollar terapias quimiopreventivas que eviten la fibrogénesis hepática, relacionada con la atenuación del estrés oxidativo.

En la presente investigación evaluamos el efecto de un extracto metanólico obtenido de las hojas de espinaca en el tejido hepático de ratas diabéticas, debido a que en estudios previos se atribuyen las propiedades de esta hortaliza a sus compuestos como β -carotenos, flavonoides, luteína, ácido linoleico y trilacoides (J. Lee et al., 2002), confiriéndoles acciones hipoglicemiantes, hipolipemiantes, antioxidantes y antiinflamatorias (Amirinejad et al., 2021).

Se ha documentado en pacientes con esteatosis hepática secundaria diversas patologías como síndrome metabólico, diabetes mellitus y hepatopatía alcohólica, que el incremento de las fibras de colágeno se asocia a daño hepatocelular por estrés oxidativo. (D'Amico et al., 2010). En estudios de modelos animales se ha establecido que los extractos de espinaca disminuyen la fibrosis hepática al reducir las especies reactivas de oxígeno mediante la activación de enzimas antioxidantes endógenas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) (Amirinejad et al., 2020). (Ko et al., 2014). (Panda et al., 2017).

Recientemente la vía citoprotectora Nrf2/HO-1 ha sido motivo de estudio como blanco terapéutico para la disminución del daño hepatocelular por estrés oxidativo (David et al., 2017). En ratas diabéticas se ha documentado que existe un incremento en la actividad de Nrf2 con diversos fitoquímicos purificados

(flavonoides, luteína), lo que conduce a mayor expresión de HO-1 y reducción de ROS (Ko et al., 2014). Sin embargo, los mecanismos de acción antioxidantes son poco conocidos y su aplicabilidad clínica es controversial (Laura Inés Elvira-Torales et al., 2019).

Nuestros hallazgos demuestran que la suplementación con fitoquímicos contenidos en las hojas de espinaca en ratas diabéticas atenúa el daño hepatocelular inducido por un incremento del estrés oxidativo demostrado por aumento de ROS y de MDA en grupo sin intervención con EME. La reducción del estrés oxidativo podría estar asociada a la migración de Nrf2 al núcleo de los hepatocitos promoviendo la expresión de HO-1, SOD, GPX y CAT. Estas enzimas poseen la capacidad de transformar los radicales libres de oxígeno en sustancias menos tóxicas a través de cuatro mecanismos principales: (1) reacciones de oxido-reducción, (2) procesos de atrapamiento nucleofílico, (3) salida del transportador de metabolitos tóxicos y (4) mantenimiento de condiciones reducidas por moléculas que contienen grupos tiol (David et al., 2017). En el presente estudio no se logró determinar la actividad enzimática de la vía Nrf2/Keap1, pero se estableció que en el grupo DM-EME existe el marcaje de Nrf2 en el núcleo de los hepatocitos, así como la expresión citoplasmática de HO-1, SOD, GPX y CAT, lo cual se ve reflejado en una menor formación de fibras de colágeno y muerte celular por apoptosis. Diversos estudios publicados acerca del efecto de Nrf2 y su actividad antioxidante en enfermedades hepáticas establecen que existe una reducción de esteatosis hepática con mejoría de las pruebas de función hepática y prevención de la fibrosis avanzada (Galicia-moreno et al., 2020).

11. CONCLUSION

El presente trabajo demuestra que los fitoquímicos contenidos en el EME poseen una acción benéfica en la atenuación del daño hepatocelular causado por el incremento del estrés oxidativo el cual fue inducido por hiperglucemia. A una dosis de EME a 400mg/kg/día administrado por doce semanas de forma intragástrica confiere un efecto hepatoprotector mediado por la activación de la vía Nrf2/HO-1, reduciendo los niveles de formación de marcadores de estrés oxidativo (ROS, MDA), fibrosis y apoptosis celular.

12. FINANCIAMIENTO

Parte de los recursos para la realización de esta investigación fueron otorgados por el presupuesto federal para el Hospital Juárez de México para el protocolo número HJM 0713/19-I.

13. CRONOGRAMA

	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul
Registro de protocolo	■									
Aceptación protocolo	■									
Producción de animales	■	■	■	■						
Inducción de modelo animal		■	■	■	■					
Sacrificio y toma de muestra					■	■	■	■		
Pruebas inmunohistoquímicas						■	■	■	■	
Análisis de Resultados								■	■	
Edición de la tesis									■	■
Entrega de tesis										■

14. BIBLIOGRAFIAS

- Amirinejad, A., Hekmatdoost, A., Ebrahimi, A., Ranjbaran, F., & Shidfar, F. (2020). The effects of hydroalcoholic extract of spinach on prevention and treatment of some metabolic and histologic features in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(4), 1787–1796. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10215>
- Amirinejad, A., Totmaj, A. S., Mardali, F., Hekmatdoost, A., Emamat, H., Safa, M., & Shidfar, F. (2021). Administration of hydro-alcoholic extract of spinach improves oxidative stress and inflammation in high-fat diet-induced NAFLD rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *21*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03396-x>
- Bilal, H. M., Riaz, F., Munir, K., Saqib, A., & Sarwar, M. R. (2016). Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Medicine*, *3*(1), 1275415. <https://doi.org/10.1080/2331205x.2016.1275415>
- Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C. L., Martens, L., Vanneste, B., De Prijck, S., Nedospasov, S. A., Kremer, A., Van Hamme, E., Borghgraef, P., Toussaint, W., De Bleser, P., Mannaerts, I., Beschin, A., van Grunsven, L. A., Lambrecht, B. N., Taghon, T., ... Guilliams, M. (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity*, *51*(4), 638-654.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.017>
- Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, *62*(S1), S47–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>
- Care, D., & Suppl, S. S. (2022). Classification and Diagnosis of Diabetes : Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care*, *45*(Suppl), 17–38.
- D'Amico, F., Consolo, M., Amoroso, A., Skarmoutsou, E., Mauceri, B., Stivala, F.,

- Malaponte, G., Bertino, G., Neri, S., & Mazzarino, M. C. (2010). Liver immunolocalization and plasma levels of MMP-9 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatitis C infection. *Acta Histochemica*, *112*(5), 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.05.005>
- David, J. A., Rifkin, W. J., Rabbani, P. S., & Ceradini, D. J. (2017). The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/4826724>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*(July), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Elvira-Torales, L. I., Periago, M. J., González-Barrio, R., Hidalgo, N., Navarro-González, I., Gómez-Gallego, C., Masuero, D., Soini, E., Vrhovsek, U., & García-Alonso, F. J. (2019). Spinach consumption ameliorates the gut microbiota and dislipaemia in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Food and Function*, *10*(4), 2148–2160. <https://doi.org/10.1039/c8fo01630e>
- Elvira-Torales, Laura Inés, Martín-Pozuelo, G., González-Barrio, R., Navarro-González, I., Pallarés, F. J., Santaella, M., García-Alonso, J., Sevilla, Á., & Periago-Castón, M. J. (2019). Ameliorative effect of spinach on non-alcoholic fatty liver disease induced in rats by a high-fat diet. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071662>
- Fabián Pighín, A., & Lía Rossi de, A. (2010). Espinaca Fresca, Supercongelada Y En Conserva: Contenido De Vitamina C Pre Y Post Cocción Fresh, Frozen and Canned Spinach: Vitamin C Content Before and After Cooking. *Rev Chil Nutr*, *37*(9), 201–207.
- Fernando, D. H., Forbes, J. M., Angus, P. W., & Herath, C. B. (2019). Development and progression of non-alcoholic fatty liver disease: The role of advanced glycation end products. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205037>

- Galicia-moreno, M., Lucano-landeros, S., Monroy-ramirez, H. C., Silva-gomez, J., Gutierrez-cuevas, J., Santos, A., & Armendariz-borunda, J. (2020). Roles of NRF2 in liver diseases: Molecular, pharmacological, and epigenetic aspects. *Antioxidants*, *9*(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox9100980>
- Hamden, K., Carreau, S., Boujbiha, M. A., Lajmi, S., Aloulou, D., Kchaou, D., & Elfeki, A. (2008). Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: Protective effect of 17 β -estradiol. *Steroids*, *73*(5), 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.026>
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *2*(5–6), 231–237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- Ko, S. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Lee, S. W., Chun, S. S., & Park, E. (2014). Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, *19*(1), 19–26. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.1.019>
- Kohl, T., Gehrke, N., Schad, A., Nagel, M., Wörns, M. A., Sprinzl, M. F., Zimmermann, T., He, Y. W., Galle, P. R., Schuchmann, M., & Schattenberg, J. M. (2013). Diabetic liver injury from streptozotocin is regulated through the caspase-8 homolog cFLIP involving activation of JNK2 and intrahepatic immunocompetent cells. *Cell Death and Disease*, *4*(7). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.228>
- Lee, J., Lee, S., Lee, H., Park, K., & Choe, E. (2002). Spinach (*Spinacia oleracea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep-fat-fried products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(20), 5664–5669. <https://doi.org/10.1021/jf011618a>
- Lee, U. E., & Friedman, S. L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, *25*(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.005>
- Marhuenda Berenguer, J. A., & García Vergara, J. (2016). Espinaca. *Serie Agricultura*, 289–301. <https://www.publicacionescajamar.es/uploads/cultivos->

- hortícolas-al-aire-libre/12-cultivos-hortícolas-al-aire-libre.pdf%0Ahttps://www.publicacionescajamar.es/uploads/cultivos-hortícolas-al-aire-libre/12-cultivos-hortícolas-al-aire-libre.pdf%0Ahttp://www.pu
- Mohamed, J., Nazratun Nafizah, A. H., Zariyantey, A. H., & Budin, S. B. (2016). Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 16(2), e132–e141. <https://doi.org/10.18295/squmj.2016.16.02.002>
- Morelock, T. E., & Correll, J. C. (2003). *Spinach*. 2001.
- Moreno-Altamirano, L., García-García, J. J., Soto-Estrada, G., Capraro, S., & Limón-Cruz, D. (2014). Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista Médica Del Hospital General De México*, 77(3), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2014.07.002>
- Palma-Duran, S. A., Kontogianni, M. D., Vlassopoulos, A., Zhao, S., Margariti, A., Georgoulis, M., Papatheodoridis, G., & Combet, E. (2018). Serum levels of advanced glycation end-products (AGEs) and the decoy soluble receptor for AGEs (sRAGE) can identify non-alcoholic fatty liver disease in age-, sex- and BMI-matched normo-glycemic adults. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 83, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.023>
- Panda, V., Mistry, K., Sudhamani, S., Nandave, M., & Ojha, S. K. (2017). Amelioration of Abnormalities Associated with the Metabolic Syndrome by *Spinacia oleracea* (Spinach) Consumption and Aerobic Exercise in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2359389>
- Roberts, J. L., & Moreau, R. (2016). Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food and Function*, 7(8), 3337–3353. <https://doi.org/10.1039/c6fo00051g>
- Stefan, N., & Cusi, K. (2022). A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 10(4), 284–296. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00003-1)
- Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*,

108(3), 879–884. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053>


Targher, G., Corey, K. E., Byrne, C. D., & Roden, M. (2021). The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus — mechanisms and treatments. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(9), 599–612. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00448-y>



Lista de Cotejo de Validación de Tesis de Especialidades Médicas

Fecha	30	06	2022
	día	mes	año

INFORMACIÓN GENERAL (Para ser llenada por el área de Posgrado)				
No. de Registro del área de protocolos	Si	X	No	Número de Registro
EFFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO METANOLICO DE ESPINACA EN HÍGADOS DE RATAS HIPERGLUCÉMICAS, ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DE FACTORES ANTIOXIDANTES				
Nombre Residente	García Rodas Oscar Leonel			
Director de tesis	Dr. José Javier Flores Estrada			
Director metodológico	Dra. Scherezada María Isabel Mejía Loza			
Ciclo escolar que pertenece	2021-2022	ESPECIALIDAD	GASTROENTEROLOGÍA	
INFORMACIÓN SOBRE PROTOCOLO/TESIS (Para ser validado por la División de Investigación/SURPROTEM)				
VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD	HERRAMIENTA	PLAGIOSCAM	PORCENTAJE	4%
COINCIDE TÍTULO DE PROYECTO CON TESIS	SI	X	NO	
COINCIDEN OBJETIVOS PLANTEADOS CON LOS REALIZADOS	SI	X	NO	
RESPONDE PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	SI	X	NO	
RESULTADOS DE ACUERDO A ANÁLISIS PLANTEADO	SI	X	NO	
CONCLUSIONES RESPONDEN PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	SI	X	NO	
PRETENDE PUBLICAR SUS RESULTADOS	SI	X	NO	
VALIDACIÓN (Para ser llenada por el área de Posgrado)				
Si	X	Comentarios		
No				


VoBo. SURPROTEM/DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

