

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I



TESIS DOCTORAL

Efectos neuro y hepatoprotector del silicio y su aplicación como ingrediente funcional

Neuroprotective and hepatoprotective effects of silicon and its application as functional ingredient

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alba Garcimartín Álvarez

Directores

Francisco J. Sánchez Muniz

Juana Benedí González

Sara Bastida Codina

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Efectos neuro y hepatoprotector del silicio y su
aplicación como ingrediente funcional**

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA

ALBA GARCIMARTÍN ÁLVAREZ

DIRIGIDA POR:

DR. FRANCISCO JOSÉ SÁNCHEZ MUNIZ

DRA. JUANA BENEDÍ GONZÁLEZ

DRA. SARA BASTIDA CODINA

MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Efectos neuro y hepatoprotector del silicio y su
aplicación como ingrediente funcional**

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA

ALBA GARCIMARTÍN ÁLVAREZ

MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Neuroprotective and hepatoprotective effects of silicon
and its application as functional ingredient**

EUROPEAN DOCTORAL THESIS

ALBA GARCIMARTÍN ÁLVAREZ

MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Efectos neuro y hepatoprotector del silicio y su aplicación
como ingrediente funcional**

Trabajo de investigación presentado por Alba Garcimartín Álvarez para optar al grado de
Doctor Europeo por la Universidad Complutense de Madrid

Vº Bº del Director:

Vº Bº de la Directora

Vº Bº de la Directora

Dr. Francisco J. Sánchez
Muniz

Dra. Juana Benedí González

Dra. Sara Bastida Codina

MADRID, 2016

El **Dr. Francisco José Sánchez Muniz**, Catedrático del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, la **Dra. Juana Benedí González**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y la **Dra. Sara Bastida Codina**, Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN que el trabajo de investigación titulado

“Efectos neuro y hepatoprotector del silicio y su aplicación como ingrediente funcional”

constituye la memoria que presenta el Licenciado **Alba Garcimartín Álvarez** para optar al grado de Doctor y ha sido realizado en los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección. Asimismo, en el marco del proceso de evaluación requerido, damos nuestro consentimiento para su presentación y defensa en la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a treinta de octubre de dos mil quince.

Fdo.: Dr. Francisco J. Sánchez
Muniz

Fdo.: Dra. Juana Benedí
González

Fdo.: Dra. Sara Bastida
Codina

El trabajo de investigación que ha dado origen a esta memoria ha sido realizado en el en el *Departamento de Farmacología* y en *Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)* de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, al amparo de los proyectos AGL 2011-29644-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Secretaría de Estado de Investigación; AGL 2014-53207-C2-2-R del Ministerio de Ciencia e Innovación, Secretaría de Estado de Investigación y Artículo 83 de la UCM, contrato 74-2015.

Asimismo, la doctoranda Doña. Alba Garcimartín Álvarez ha disfrutado de una beca FPI, referencia BES-2012-054752.

La doctoranda ha disfrutado de una estancia breve de formación en investigación en 2015 en el Food and Nutritional Science Departament de la Universidad de Reading (reino Unido) bajo la tutoría de la Dra. Julie Lovegrove, Hugh Sinclair Chair in Human Nutrition.

Me gustaría empezar con este humilde consejo a aquellos que decidan comenzar la batalla del doctorado. Por supuesto es una buena costumbre el pensar siempre la hipótesis y objetivos de un trabajo antes de comenzar, pero a la hora de la verdad es fantástico entretenerse de vez en cuando por el camino. Si de algo me he dado cuenta es que para mí la ciencia no es la autovía perfecta que te lleva muy rápido al destino al que vas; sino que más bien es la típica carretera comarcal de doble sentido y muchas curvas, que unas veces te marea sí, pero otras descubres imprevistos que te hacen el viaje mucho más agradable.

Puedo decir ahora que llega el final y es inevitable mirar hacia atrás, que el doctorado es, o para mí ha sido, una etapa fantástica en la que por una parte sabes que necesitas aprender a solucionar los problemas por tu cuenta, pero al mismo tiempo te das cuenta de lo fácil y bonito que es todo cuando encuentras gente que te dedica su tiempo para ayudarte. Y yo de esto, como vais a ver a continuación algo he aprendido, porque he tenido la grandísima suerte de ir encontrando a mi paso personas que han hecho de esta tesis una realidad, y que sin su granito de arena, o playa entera en según qué casos, no habría sido posible. A todos ellos les doy las gracias de antemano porque esta Tesis también es suya.

Quiero expresar mi gratitud a mis directores, los Drs. Francisco J. Sánchez Muniz, Juana Benedí y Sara Bastida, por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo y de formar parte de su equipo. Agradezco especialmente la confianza, que me han demostrado en infinidad de ocasiones, y la libertad que han sabido darme a la hora de tomar decisiones. A Paco por guiarme en mis inicios, por transmitirme su tesón por las cosas bien hechas y la importancia de esos pequeños detalles que nunca se le escapan. Porque has sabido escucharme y respetarme aunque mi forma de hacer las cosas sea un tanto peculiar. En esta última semana más que tutor has sido un padre. A Sara por ofrecerme siempre su ayuda, por sus ánimos y su cariño en los momentos más difíciles. Y a Juana por abrirme las puertas del Departamento de Farmacología, por su capacidad para mediar y apaciguarnos cuando saltan chispas, y por cuidarme y aconsejarme siempre para sacar lo mejor de mí. Por último daros las gracias por este último sprint, porque creo que solo vosotros podéis corregir una Tesis y sacarla adelante en tan poco tiempo y además haciéndolo con agrado e intentando ayudar en todo momento.

Aunque no figuran como tutoras a nivel de papeleo han hecho méritos de sobra para que yo les considere como tal. La Dra. Pilar González (Pili), gracias de corazón por tu generosidad y dedicación, por compartir tanto conocimiento conmigo y enseñarme con una paciencia infinita. Por esas discusiones sobre ciencia que tanto disfrutamos las dos, y por esos momentos en el laboratorio interpretando resultados desde el primer minuto de la cinética. La Dra. Elvira López-Oliva, mi Elvi, que lo que empezó siendo una colaboración puntual no ha terminado después de dos años y espero que no lo haga nunca. Gracias por hacer de lo difícil algo fácil, por estar siempre pendiente de mí, preocupándote como una mamá porque

todo salga bien, y por saber apaciguarme y serenarme cuando saco este genio mío a pasear. Porque somos dos loquitas que nos entendemos bien.

La parte experimental recogida en esta Tesis la he podido llevar a cabo gracias a la colaboración de investigadores, profesores y compañeros de diferentes instituciones:

- Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, mi casa en estos años. Agradezco a todos los profesores su buena acogida y apoyo. En especial a la Dra. Paloma Bermejo por todo lo que me ha enseñado en las prácticas de Farmacología general, y su disposición para ayudarme siempre con la dudas del día a día en el laboratorio. Gracias también a Rosa, Nieves, Jesús y Azucena por hacernos la rutina de los experimentos más divertida, por escucharme en momentos de angustia y sacarme siempre una sonrisa.

Como no agradecer a todos los compañeros de faena que he conocido en estos años y que me han ayudado a sobrevivir en estos años. A los compis del módulo y grupo de investigación a Laura, Miguel, Eva, Adriana, Raúl, M^a Ángeles, Patricia, Catia, Pinar con los que compartí los primeros años; y los que todavía me acompañan, a Jorge que mantiene el laboratorio impoluto y ordenado facilitando mucho el trabajo, a Pablo por la tranquilidad que desprende y sus incansables ganas de agradar, a Giulia por su sonrisa y su locura contagiosa, y a Adri por dejarme revivir mis inicios con su TFM, por su confianza y su alegría. No me puedo olvidar de Paloma, porque me ha demostrado que la amistad no entiende de edad. Desde que nos conocimos en el master has estado siempre a mi lado. Gracias por ser mi pañito de lágrimas cuando algo se tuerce, por animarme siempre y contar conmigo. Vales mucho más de que crees y espero que el tiempo te dé la oportunidad de demostrarlo de verdad. Gracias también a todos los demás compis del departamento Elenita, Carlos, Ana, Manal, Juanki, Irene, los Tarek, Andrea, Izaskun, María, Karim, etc. etc. por vuestra ayuda desinteresada y por todo lo que hemos vivido juntos.

- Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Gracias a todos los profesores y al personal no docente Pilar, Carmen, Paquito y Maica; y a Ángela que ha llegado con fuerza y con ganas como debe ser.
- Universidad de Alcalá de Henares. Quiero dar las gracias a la Dra. María José González, Pepa, en primer lugar por los estudios que había realizado anteriormente con cerveza y silicio, que sirvieron de base para este proyecto y que me han servido de guía en todo momento. Además agradecer su participación en los estudios *in vivo* con los bichitos. Y porque eres un sol y nos lo pasamos fenomenal contigo siempre. Gracias al personal del animalario, especialmente a José María, Montse y María José, por todo el trabajo realizado con los animales y por intentar facilitar y simplificar todo lo posible el proceso.

- Instituto Pluridisciplinar de la UCM. en el que estuve tres meses aprendiendo y realizando experimentos. Gracias a Luis y a Mercedes por darme la oportunidad de estar allí y enseñarme nuevas técnicas, y por supuesto a Rubén, Pablo y Ahmed por alegrarme la estancia y ayudarme con mis experimentos.
- Instituto Cajal (CSIC) donde realicé una estancia de seis meses. Quiero expresar mi gratitud a la Dra. María López de Ceballos por brindarme la oportunidad de unirme a su equipo, por la confianza que ha depositado en mí y por enseñarme tantas técnicas y trucos en el laboratorio. Allí he conocido a gente estupenda con la que he tenido la oportunidad de disfrutar la última parte del doctorado. Dani, Kerry, Ana, Simo, Marta, María, gracias por todos los momentos en los cafés, comidas (con o sin brócoli), campana de cultivo, animalario... y por haberme salvado la vida con las ratitas. En especial quiero agradecer a mis niñas del laboratorio Sonia y Clara (mi pequeña Siri) que me acogieron desde el primer día, porque me han dado su apoyo incondicional (técnico y moral) en todo momento y porque con ellas las risas siempre están garantizadas.
- Food and Nutritional Science Departament de la Universidad de Reading dónde realice una estancia de tres meses. Mi gratitud a la Dra. Julie Lovegrove por abrirme las puertas de su laboratorio y por dejarme participar en el proyecto RESET. A Kim por su paciencia con mi inglés, por su buen humor y tranquilidad y por todo lo que me ha enseñado. Por supuesto gracias de nuevo a los compañeros y amigos que conocí (Flo, Elena, Andrea, Faidy, Silvia, Drinalda, Simon, Ale, Holly, Roberta, Dafni, Oonagh...) que me hicieron sentir como en casa a pesar de estar tan lejos.
- ICTAN (CSIC). Agradezco a los Drs. Francisco Jimenez Colmenero y Susana Cofrades con los que he llevado a cabo varias colaboraciones, entre ellas el artículo de revisión que forma parte de esta memoria. Gracias por todo lo que me habéis enseñado sobre emulsiones simples, dobles, gelificadas y todos esos sistemas tan interesantes con los que trabajais. También a Ricard, Joaquín y María por toda su ayuda.
- Otros muchos profesores e investigadores que me han ayudado y aconsejado. En especial agradezco a la Dra. Rosa Ana García su ayuda con la histología del hígado, por su disponibilidad, y por tener siempre una sonrisa y una palabra agradable. Y por enseñarme la palabra workholic con la que las dos nos sentimos tan identificadas.

No me puedo olvidar de mis amigos que han estado siempre animándome y que han sabido sacarme de la rutina y dedicación plena que supone la investigación. A mis chicas de toda la vida Nerea, Albita, Tamara, Susana, Marta y Lucía, porque hemos crecido juntas y nos queremos a pesar de haber seguido caminos muy diferentes. Al grupo de la uni Vega, Javi, Ana, Marisa, Pili, Alba y Laura porque a pesar de

no vemos todo lo que nos gustaría siempre estamos a gusto cuando nos juntamos. En especial a Ana y a Vega, mis doctoras guerreras, por su complicidad en estos años de doctorado juntas. Y a Javi, que desde el primer día que nos juntamos no nos hemos separado. Eres un terremoto que revoluciona todo lo que toca. Gracias por tu amistad, tu cariño y confianza. A Bego porque siempre has sido un ejemplo para mí, como investigadora y como persona. A mi Lorenita, porque desde el primer momento supe que ibas a ser importante. Gracias por esa sonrisa que transmite tanta felicidad, por tu carácter, tu confianza y tus palabras de ánimo que me han ayudado tanto en esta recta final. A Juliana, esa hermana que me ha dado el internado y que es una parte fundamental de mi vida. Gracias Yuli por tu paciencia, por aguantarme tantos años a pesar de mi desorden, por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, por ser como eres, y por supuesto porque me vas a dar los sobrinos más guapos del mundo mundial, espero que pronto...

A mi familia, porque si pudiera elegirlos volvería a elegir de nuevo a vosotros. Por interesaros siempre por mi investigación y por saber que estáis ahí para lo que necesite. En especial a mis abuelos, que siempre me han sabido demostrar lo orgullosos que han estado de mí, y han sabido perdonar las épocas en las que apenas les he podido dedicar tiempo. También a mi otra familia Ana, José Luis y Anita porque me habéis animado durante todo el camino y me habéis prestado vuestra ayuda siempre que lo he necesitado.

El mayor agradecimiento para las tres personas más importantes de mi vida. Mis padres por su amor infinito y sincero, por haberme sabido educar con dureza pero a la vez con confianza y cariño, enseñándome la mayor parte de cosas que me hacen ser lo que soy. Por vuestra generosidad y vuestra forma de hacer favores sin que parezca que lo son y por hacerme sentir tan querida. Y Gonzalo, al que tuve la suerte de encontrar tan pronto y que me ha dado la seguridad y estabilidad para enfrentarme a la carrera primero y al doctorado después; sin ti nunca lo habría conseguido. Gracias por poner orden en mi vida, por llenarla de alegría y saber quitarme del trabajo que tanto me absorbe. Por saber aguantar los momentos de agobio y la distancia durante la estancia. Gracias por demostrarme lo que significa para ti. Porque da igual lo difícil que haya sido el día si cuando me voy a dormir te tengo a mi lado. Te quiero. Esta tesis sin duda es tan vuestra como mía porque sin vosotros no lo habría conseguido.

Índice

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	18
1. Envejecimiento	19
2. Enfermedades neurodegenerativas	20
2.1. Enfermedad de Alzheimer (EA).....	20
2.1.1. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes en la Enfermedad de Alzheimer	21
2.1.2. Mecanismos de muerte celular y su implicación en la enfermedad de Alzheimer.....	22
2.1.2.1. Apoptosis.....	23
2.1.2.2. Necrosis.....	24
2.1.2.3. Muerte celular en la Enfermedad de Alzheimer.....	24
2.1.3. Sistema colinérgico y su importancia en la enfermedad de Alzheimer.....	25
2.1.3.1. Acetilcolinesterasa	25
2.1.3.2. Alteraciones de la acetilcolinesterasa en la Enfermedad de Alzheimer	26
3. Síndrome metabólico	27
3.1. Síndrome Metabólico y Obesidad	28
3.2. Síndrome metabólico (SM) y Diabetes Mellitus tipo 2.....	29
3.2.1. Importancia de la hiperglucemia postprandial	29
3.2.2. Tratamiento no farmacológico de la DM2	30
3.3. Síndrome Metabólico (SM) y Dislipemias.....	31
3.4. Hígado graso no alcohólico.....	35
3.4.1. Prevalencia de NAFLD	35
3.4.2. Mecanismos implicados en NAFLD y NASH	36
3.4.3. Lipotoxicidad y lipoapoptosis como aspectos importantes del hígado graso no alcohólico.....	37
3.4.4. Hígado graso no alcohólico, estrés oxidativo y estado antioxidante.....	38
3.4.5. Hígado graso no alcohólico y colesterol	38
3.4.6. Metabolismo lipoproteico e hígado graso no alcohólico.....	39
3.4.7. Modelos de NAFLD/NASH.....	39
3.4.8. Métodos de diagnóstico.....	40
3.4.9. Biopsia hepática	41
3.4.10. Tratamiento del hígado graso no alcohólico	41

4. Silicio	42
4.1. Características generales	43
4.1.1. Distribución y prevalencia en la naturaleza	43
4.1.2. Ciclo biogeoquímico del Silicio	45
4.1.3. Consumo de Silicio	47
4.1.4. La dieta como fuente de silicio.....	48
4.1.5. Biodisponibilidad de las diferentes formas de Silicio	49
4.1.6. Niveles de Silicio en los tejidos	50
4.1.7. Efectos tóxicos	51
4.2. El silicio y sus beneficios potenciales sobre la salud	52
4.2.1. Mineralización y salud ósea	52
4.2.2. Neuroprotección con especial implicación en la Enfermedad de Alzheimer	53
4.2.3. Reducción del riesgo de aterosclerosis, enfermedades vasculares y Diabetes Mellitus.....	55
4.2.4. Efecto antioxidante del Silicio	56
5. Importancia de la dieta en las enfermedades crónicas	56
5.1. Alimentos funcionales.....	57
5.2. La carne como matriz para el diseño de alimentos funcionales	58
5.3. Evaluación de los alimentos funcionales.....	59
5.4. El silicio como ingrediente funcional.....	60
INTERÉS DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS	61
RESULTADOS	64
Expresión de resultados.	65
Capítulo 1	65
Introducción	66
Objetivos	66
Diseño experimental del capítulo 1:	66
Artículo 1	68
<i>BMC complementary and alternative medicine (2014)</i>	68
Artículo 2	71
<i>Chemosphere (2015)</i>	71
Artículo 3	74
<i>PloS one (En revisión)</i>	74

Artículo 4	78
Capítulo 2	80
Introducción	81
Objetivos	81
Diseño experimental del capítulo 2:	82
Artículo 5	84
<i>LWT -Food Science and Technology (2015)</i>	84
Artículo 6	87
<i>Food Research International</i>	87
Artículo 7	90
<i>Journal of Nutrition</i>	90
Artículo 8	93
<i>PloS one</i>	93
Artículo 9	97
<i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity (en revisión)</i>	97
Capítulo 3	100
Introducción	101
Objetivos	101
Diseño experimental del capítulo 2:	102
Artículo 10	103
<i>Journal of Functional foods (en revisión)</i>	103
DISCUSIÓN	106
RESUMEN Y CONCLUSIONES	119
SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	122
BIBLIOGRAFÍA.....	125

ABREVIATURAS

A β	β -amiloide
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
AGS	Ácidos grasos saturados
AIF	Factor inductor de apoptosis
ALT	Alanina aminotransferasa
Apo	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferasa
CAT	Catalasa
CETP	Proteína transferidora de esteres de colesterol
ChAT	Colin-acetiltransferasa
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECV	Enfermedad cardiovascular
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
FDA	Food and Drug Administration
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IDF	Internacional Diabetes Federation
IDL	Proteínas de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
IL-6	Interleuquina 6
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HTA	Hipertensión arterial
LDL	Proteínas de baja densidad

LDLr	Receptor de LDL
LPO	Lipoperóxidos
LRP	Receptor de lipoproteínas
NAFLD	Hígado graso no alcohólico
NAS	Marcador de actividad NAFLD
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NCEP ATPIII	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NK	Células natural killer
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
PON1	Paraoxonasa 1
QM	Quilomicrones
QMr	Quilomicrones remanentes
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
VLDL	Proteínas de muy baja densidad

INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno propio de los organismos pluricelulares, caracterizado por un declive progresivo de la eficacia de los procesos fisiológicos (Quiles Morales y cols., 2010). El envejecimiento tiene una gran importancia social ya que la esperanza de vida de los países desarrollados ha aumentado mucho en el último siglo y es muy elevado el número de personas que tienen actualmente más de 65 años o incluso de 80 años. El principal problema del envejecimiento de la población es que la edad es el un importante factor de riesgo de las enfermedades crónico-degenerativas más comunes: las metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas y tumorales (Patridge, 2014). Por todo ello la biología del envejecimiento es una de las áreas de investigación más importante (Cencioni y cols., 2013). Una limitación en el estudio y comprensión de las características fisiológicas del proceso de envejecimiento es precisamente la dificultad para separar el propio proceso de las enfermedades que derivan del mismo. Además, el envejecimiento está condicionado tanto por el entorno como por el estilo de vida, y esto hace que varíe mucho de unos individuos a otros, incluso dentro de la misma especie.

Con la edad se producen una serie de cambios graduales, progresivos y de velocidad variable que provocan diferentes grados de afectación sobre la funcionalidad normal. Las teorías sobre el envejecimiento, son muchas y se clasifican en dos grandes grupos. El primero de ellos engloba las teorías genético-evolucionistas que definen el envejecimiento como un fenómeno de desarrollo continuo, controlado y programado genéticamente. El segundo es el de las teorías estocásticas que se basan en daños al azar en diferentes moléculas biológicas que se van acumulando hasta producir el declive biológico. Dentro de las teorías estocásticas, la más importante es la que se basa en el estrés oxidativo y el daño mitocondrial. Ambas alteraciones están muy relacionadas entre sí ya que la mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) de la célula, y por ello es además la que más sufre sus efectos nocivos (Quiles Morales y cols., 2010). La acumulación de radicales libres y la disfunción mitocondrial sería responsable tanto del proceso fisiológico de envejecimiento como de las alteraciones que dan lugar posteriormente a las patologías crónico-degenerativas asociadas al mismo (Cencioni y cols., 2013).

El envejecimiento y la longevidad se ven afectados mayoritariamente por los genes. No obstante, debemos señalar que los seres vivos estamos programados para sobrevivir durante un periodo de tiempo próximo a los 100 años, aunque esta programación no es perfecta. Se han definido distintas vías e interacciones con genes que regulan diferentes aspectos del envejecimiento. Entre ellos destacan los hábitos de vida y las influencias epigenómicas. Por ello se buscan sustancias que retrasen la aparición del envejecimiento o frenen sus efectos deletéreos. Entre estos *genoprotectores* se hallan ciertos nutrientes, aunque a veces el exceso de los mismos, en particular de grasa, se considera clave para acelerar el envejecimiento (Quiles Morales y cols., 2010). No obstante, aunque en esta tesis se han utilizado animales adultos, maduros, con una edad extrapolable a un ser humano de 65 años, y se ha estudiado algunos

mecanismos mediante los que actúan los ingredientes funcionales como amortiguadores de los efectos lesivos de los ROS, el objetivo de esta Tesis Doctoral no es estudiar el envejecimiento o los mecanismos que conducen a él, sino investigar los mecanismos protectores de ciertos compuestos nutricionales o ingredientes de los mismos, en animales proclives al daño mitocondrial. Por ello no insistiremos más en este apartado.

2. Enfermedades neurodegenerativas

El término enfermedades neurodegenerativas engloba a un grupo de patologías crónicas con afectación neuronal que están relacionadas con el envejecimiento y pueden ser de diversa etiología e importancia clínica (Rao y Balachandan, 2002). Todas ellas cursan con un deterioro progresivo a nivel de sistema nervioso central (SNC). Algunos de los trastornos neurodegenerativos más prevalentes son la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Velázquez 2014). En las dos últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios bioquímicos, histológicos y de caracterización de proteínas y genes con el objetivo de identificar el factor desencadenante de estas patologías (Golde, 2009). En general, las enfermedades neurodegenerativas comienzan con una fase inicial o prodrómica en la que aparecen afectados algunos biomarcadores propios de la enfermedad, pero el paciente se encuentra asintomático. Esta fase puede durar años o incluso décadas. Cuando los síntomas se manifiestan, el daño producido es elevado con distrofia y pérdida masiva de neuronas. Por ello, los tratamientos empleados mejoran los síntomas de dichas patologías, aunque su eficacia frente la progresión de la enfermedad es limitada, ya que cuando se inician, el tejido está demasiado dañado (Golde, 2009). Para cada enfermedad neurodegenerativa existen diferentes hipótesis en relación a los mecanismos que conducen a la disfunción y muerte neuronal. En muchos casos dichos mecanismos son comunes a muchas de estas patologías y están relacionados con procesos de inflamación, disfunción mitocondrial, déficits en el transporte axonal y estrés oxidativo (Golde, 2009).

2.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es una patología multifactorial que se caracteriza por una pérdida progresiva de memoria y funciones cognitivas acompañadas de un deterioro emocional y social y finalmente la muerte (Rao y Balachandran, 2002). La prevalencia de EA a nivel mundial ha aumentado a nivel exponencial en las últimas décadas (Ballenger, 2006) siendo la principal causa de demencia en personas adultas (Kumar y Singh, 2015). Por ello existe la necesidad creciente de encontrar un tratamiento efectivo para prevenir, paliar o curar estas patologías.

Los principales signos histopatológicos son: a) pérdida de sinapsis; b) pérdida de neuronas sobre todo en la corteza cerebral, hipocampo y amígdala; c) depósitos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) con la consiguiente formación de placas seniles; y d) precipitación intracelular de proteína Tau hiperfosforilada adoptando forma de ovillo (Behl, 2000).

El mecanismo exacto de esta patogénesis no se ha descrito todavía, aunque para desarrollar nuevos tratamientos se tienen en cuenta varias hipótesis. A continuación, se van a explicar los tres factores implicados en la EA que están relacionados con la presente tesis.

2.1.1. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes en la Enfermedad de Alzheimer

El estrés oxidativo es una alteración metabólica en la que se produce un desequilibrio entre los ROS y los mecanismos antioxidantes presentes en el organismo. La acumulación de ROS puede dar lugar a la oxidación de enzimas, proteínas y lípidos de membrana y del ácido desoxirribonucleico (ADN), generando toxicidad y daño tisular (Yuan y Kitts, 1997; Mataix y cols., 2001; Martínez Cayuela, 2010).

Las células regulan la respuesta al estrés oxidativo en función de la intensidad del desequilibrio y de su duración. En la activación de los genes implicados participan muchos factores de transcripción que responden a cambios en el estado redox. Entre ellos destaca el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) cuya función se basa en proteger a las células frente a la carcinogénesis asociada al estrés oxidativo y la inflamación (Surh y cols., 2008; Acharya y cols., 2010). En presencia de estrés oxidativo el Nrf2 se transloca al núcleo y se une a secuencias del ADN que codifican para enzimas con funciones antioxidantes y detoxificantes. Además, favorece un aumento de la síntesis y regeneración del glutatión y puede ejercer un efecto anti inflamatorio. El sistema antioxidante endógeno está formado por enzimas que neutralizan los diferentes ROS como por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT). Participan también en los mecanismos de defensa intracelulares algunas moléculas con capacidad antioxidante como el sistema de glutatión. La **Figura 1** muestra un esquema de los principales mecanismos del sistema antioxidante endógeno.

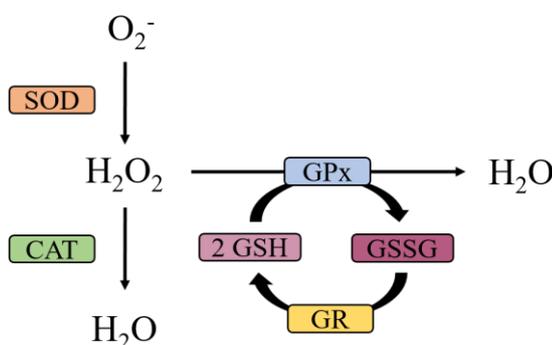


Figura 1. Sistema antioxidante endógeno. CAT, Catalasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; SOD, Superóxido dismutasa.

El estrés oxidativo se considera crucial en el desarrollo de la EA (Christen, 2000). La llamada “hipótesis alternativa” defiende que, si bien el péptido A β está relacionado con la patogénesis de la EA, no es el primer evento sino más bien secundario (Pimplikar, 2009; Jomova y cols., 2010). Si bien en un principio se pensaba que el estrés oxidativo era una consecuencia de la acumulación de A β , existen cada vez más evidencias de que actúa como precursor de la enfermedad. En la etapa prodrómica se produciría una acumulación gradual de ROS que precede al resto de alteraciones y que conduce hacia la etapa patológica del EA con sus síntomas característicos (Bonda y cols., 2010).

El cerebro es un órgano especialmente vulnerable al estrés oxidativo (Andersen, 2004). Algunas de las características que explican esa mayor susceptibilidad (**Fig. 2**) son: el elevado consumo de oxígeno, contenido alto de hierro que participa en muchas reacciones que generan ROS, proporción de ácidos grasos insaturados fácilmente oxidables, y producción de ROS por la microglía entre otras. Además, las defensas antioxidantes del cerebro son bajas en comparación con otros órganos, especialmente la actividad catalasa y glutatión peroxidasa (Mariani y cols., 2005).

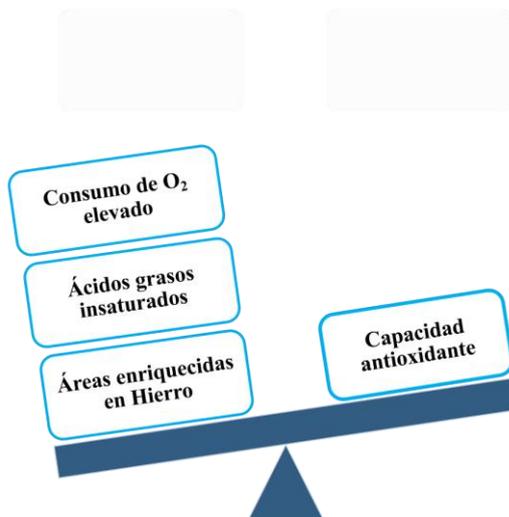


Figura 2. Vulnerabilidad del cerebro al daño oxidativo. Adaptada de Floyd y Hensley (2002).

Dado que el estrés oxidativo puede ser la primera alteración en los pacientes de EA (Zhu y cols., 2004, 2007), cada vez más estudios defienden que los antioxidantes pueden ser efectivos en la prevención y tratamiento temprano de la EA (Bonda y cols., 2010).

2.1.2. Mecanismos de muerte celular y su implicación en la enfermedad de Alzheimer

Existen dos mecanismos de muerte celular bien diferenciados tanto por aspectos morfológicos como bioquímicos. Son la apoptosis y la necrosis (**Fig. 3**). Aunque normalmente suelen ser procesos divergentes en ocasiones pueden solaparse, y una célula que había iniciado la cascada de la apoptosis acaba finalmente destruyéndose con rasgos necróticos típicos (Behl, 2000).

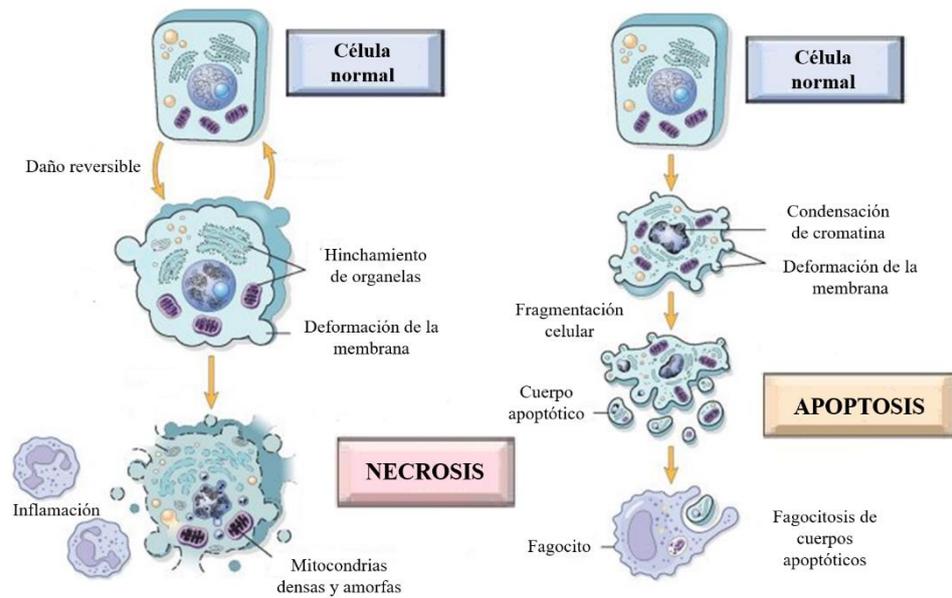


Figura 3. Mecanismos de muerte celular. Adaptado de Kumar y cols. (2014).

2.1.2.1. Apoptosis

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, es un proceso fisiológico bien regulado, fundamental durante el desarrollo y necesario posteriormente para mantener el equilibrio entre la división y muerte celular y controlar el número de células que hay en los diferentes tejidos. Es un proceso que comienza con la activación de una serie de genes a causa de estímulos externos de diferente naturaleza y que da lugar a una cascada ordenada de señales. Las células durante el proceso de apoptosis van perdiendo tamaño y forman los llamados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células vecinas y macrófagos, evitando así una respuesta inflamatoria mayor.

El proceso de apoptosis se divide en dos tipos (Wang, 2013; Flores Balcázar, 2015): caspasa-dependiente y caspasa independiente (**Fig. 4**).

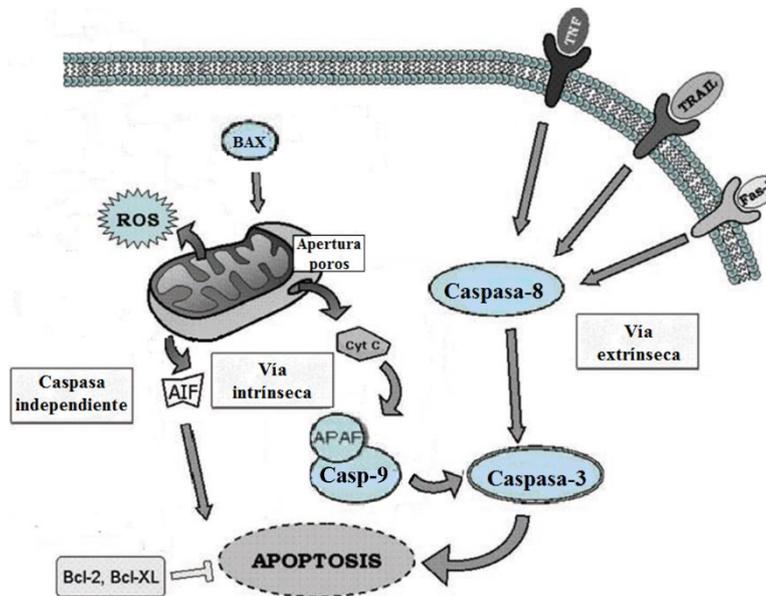


Figura 4. Rutas de apoptosis. Casp-9, caspasa 9; AIF, factor inductor de apoptosis; ROS, especies reactivas de oxígeno.

La vía independiente de caspasa tiene sus principales reguladores en la membrana mitocondrial. Una de las principales moléculas efectoras es el AIF, *apoptosis inducing factor*. En la **figura 4** se detalla el mecanismo. Por otra parte, el mecanismo dependiente de caspasa se subdivide en dos vías: la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca también conocida como vía de los receptores de muerte (**Fig. 4**). Existen fundamentalmente dos caspasas iniciadoras, caspasa -8 y -9, de la vía extrínseca e intrínseca respectivamente. Ambas vías convergen en la activación de la caspasa-3 que es la caspasa efectora.

2.1.2.2. Necrosis

La necrosis se caracteriza por la parada del metabolismo celular y la rápida desintegración de la célula. En este caso no hay activación de genes específicos que desencadenen el proceso, sino que se trata de un evento pasivo y patológico normalmente debido a la presencia de tóxicos o eventos traumáticos que producen la muerte celular de forma rápida (Wang, 2013). Se produce un hinchamiento masivo de las mitocondrias y la membrana plasmática que provoca la lisis de la célula y como consecuencia de ello se desencadena una respuesta inflamatoria masiva.

2.1.2.3. Muerte celular en la Enfermedad de Alzheimer

Como se ha comentado anteriormente, la EA se caracteriza por una pérdida de neuronas principalmente a nivel de corteza, hipocampo y amígdala (Rao y Balachandran, 2002). Las neuronas afectadas son sobre todo colinérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. Si bien muchos estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la pérdida de neuronas se debe principalmente a procesos de apoptosis, hay evidencias de que es una mezcla de ambos mecanismos ya que en pacientes de EA se observan tanto células apoptóticas como necróticas (Behl, 2000).

El conocimiento de los mecanismos que provocan la muerte neuronal en pacientes de EA es crucial para buscar nuevos tratamientos farmacológicos eficaces. En esta línea, algunos autores destacan la importancia de encontrar nuevas terapias para prevenir la muerte neuronal y evitar así la evolución de la enfermedad (Golde, 2009). Estas terapias se consideran principalmente preventivas ya que son eficaces únicamente en la fase prodrómica de la enfermedad, en la que se produce la pérdida masiva de neuronas; no obstante, esta fase es asintomática (Golde, 2009). El conocimiento de las vías de apoptosis permite el diseño de diferentes fármacos dirigidos a dianas terapéuticas variadas. La combinación de varios de estos fármacos puede ofrecer beneficios terapéuticos adicionales. (Sureda y cols., 2011). También es muy activa la búsqueda de compuestos bioactivos que modulen la respuesta apoptótica de forma específica (Flores Balcázar, 2015).

2.1.3. Sistema colinérgico y su importancia en la enfermedad de Alzheimer

La denominada hipótesis colinérgica defiende que la deficiencia del neurotransmisor acetilcolina es crítica en la aparición de la sintomatología clínica asociada a la EA, especialmente la pérdida de funciones cognitivas (Schliebs y Arendt, 2006). El deterioro progresivo de la capacidad de memoria y aprendizaje se ha atribuido a las alteraciones del sistema colinérgico con una disminución de los niveles de acetilcolina en Neocorteza, Hipocampo, y Núcleo Basal de Meynert; además de una reducción en la recaptación de colina, y una disminución en los niveles de la colin-acetiltransferasa (ChAT) enzima que se encarga de la síntesis de la acetilcolina. Por ello, la principal estrategia terapéutica empleada en clínica se basa en una inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la degradación de acetilcolina, con el objetivo de aumentar los niveles de este neurotransmisor en las sinapsis (Sánchez-Chavez y Salceda, 2008). Los fármacos más efectivos son Donepecilo, Galantamina y Rivastigmina, todos ellos inhibidores reversibles de la AChE. No debemos olvidar que en la EA el déficit de neurotransmisores es bastante complejo y afecta a otros sistemas.

2.1.3.1 Acetilcolinesterasa

La AChE pertenece junto con la butirilcolinesterasa a un grupo de enzimas esterasas denominadas colinesterasas encargadas de hidrolizar los ésteres de colina. La AChE degrada la acetilcolina en acetato y colina para regular la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis (Massoulié y cols., 1993). Desde su descubrimiento ha sido una de las enzimas más estudiadas en relación a su mecanismo de acción, su centro activo, así como su distribución y localización en los diferentes tejidos.

La AChE es una proteína codificada por un solo gen situado en el cromosoma 7 (Getman y cols., 1992) formado por 4 exones y 3 regiones de codificación adicionales. Sufre procesos de *splicing* alternativo en el extremo 3' y modificaciones post-traduccionales que dan lugar a tres isoformas de la proteína que difieren en su extremo carboxilo, la forma R, la S y la E (**Fig. 5**) (Sánchez-Chaves y Salceda, 2008).

- AChE-R: en inglés *readthrough*, es la isoforma de traducción completa que contiene además de los 4 exones las tres secuencias adicionales. Se encuentra principalmente como una forma monomérica y soluble, y parece estar asociada a condiciones de estrés.
- AChE-E: es la forma presente en los eritrocitos. También se conoce como AChE-H de hidrofóbica. Está formada por las regiones 5 y 6 además de los 4 exones. Codifica dímeros anfifílicos muy abundantes en la membrana de los eritrocitos.
- AChE-S: de sináptica, también denominada forma T (de *tail* en inglés). Contiene la región 6. Esta forma da lugar a una subunidad catalítica monomérica (G1) de unos 70- kDa que puede asociarse por puentes disulfuro para formar dímeros (G2) o tetrameros (G4). Además, en función de la estructura cuaternaria las diferentes formas se clasifican en asimétricas o globulares. Los péptidos se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso donde son glicosilados. Una vez ensamblados los dímeros y tetrameros ya son estables. Al pasar por el aparato de Golgi pueden adquirir adicionalmente residuos de oligosacáridos. Las moléculas que van a permanecer ancladas a la membrana incorporan glicofosfolípidos u otra cadena polipeptídica hidrofóbica. El resto de moléculas son secretadas al medio extracelular.

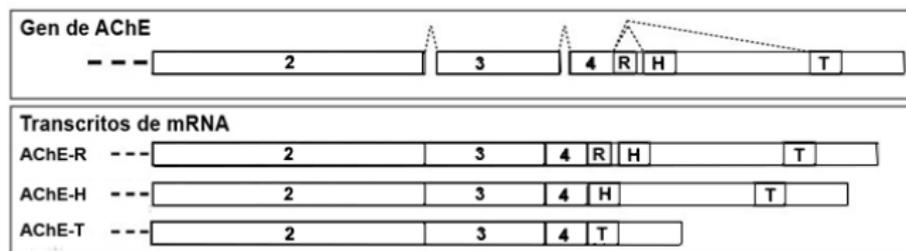


Figura 5. Gen de la acetilcolinesterasa (AChE) y las tres isoformas producto del proceso de *splicing* alternativo. Tomada de Sánchez-Chaves y Salceda (2008).

Todas las isoformas de AChE son catalíticamente activas. Sin embargo, en la última década se han estudiado otras funciones adicionales de esta proteína no relacionadas con su acción enzimática. Algunas de ellas son: capacidad trófica relacionada con la formación de neuritas, adhesión celular durante el desarrollo, interacciones neurona-glía, diferenciación neuronal, maduración de la sinapsis, activación de neuronas dopaminérgicas, agregación de A β , hematopoyesis y trombopoyesis (Soreq y Seidman, 2001). Recientemente se ha descrito la participación de la AChE en los procesos de muerte celular por apoptosis (Xie y cols., 2011), incluso algunos estudios sugieren la posible implicación de AChE en la formación del apoptosoma (Park y cols., 2004).

2.1.3.2 Alteraciones de la acetilcolinesterasa en la Enfermedad de Alzheimer

El análisis *post mortem* del cerebro de pacientes con EA reveló actividad AChE en las placas de A β . En ellas la actividad de AChE no se inhibe por sustrato y muestra una sensibilidad menor a fármacos anticolinesterásicos (Sánchez-Chaves y Salceda, 2008). Aunque en las placas, depósitos extracelulares de A β , la actividad de AChE en particular es alta, en general en el cerebro de pacientes de EA la actividad de AChE es menor (Campanari y cols., 2014). Además, se ha observado un aumento de la forma AChE-R, aunque no se ha demostrado una relación causa efecto con la enfermedad. También se han realizado algunos estudios para evaluar los niveles de las isoformas AChE-R y AChE-S en el cerebro y líquido cefalorraquídeo de pacientes de EA respecto a los de individuos sanos (Darreh-Shori y cols., 2004; Sáez-Valero y cols., 1999). En tales pacientes existen alteraciones en los niveles de las diferentes isoformas tanto en el cerebro como en el líquido cefalorraquídeo.

3. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) se define como la asociación de factores de riesgo vascular y alteraciones metabólicas que aumentan el riesgo individual de enfermedad cardiovascular (ECV) a través del desarrollo de arteriosclerosis y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Hanley y cols., 2005; García-Quismondo Fernández, 2016); Sánchez-Muniz, 2016).

Se trata de una afección ampliamente extendida por todo el mundo y con un gran impacto socioeconómico. Entre los parámetros que se tienen en cuenta a la hora de valorar el SM (**Fig. 6**) se encuentran la obesidad central, la hipertensión arterial (HTA), la presencia de hiperglucemia en ayunas, hipertrigliceridemia y niveles bajos de colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Alberti y cols., 2006; Zimmet y cols., 2001; Zimmet y cols., 2005). Desde 1923 que fue descrito por primera vez, hasta la actualidad se han ido modificando los diferentes criterios para el diagnóstico del SM y han dado lugar a consensos como el de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999), European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR, Balkau y Charles, 1999), National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III, 2002) e Internacional Diabetes Federation (IDF, 2005) (Alberti y cols., 2006). En los criterios del NCEP ATP III no se incluye la resistencia a la insulina (RI) como variable de diagnóstico. A pesar de ser una característica inherente del SM la RI se eliminó de la lista por la dificultad que supone el medirla en la práctica clínica diaria. Se incluyó la obesidad central como marcador subrogado.

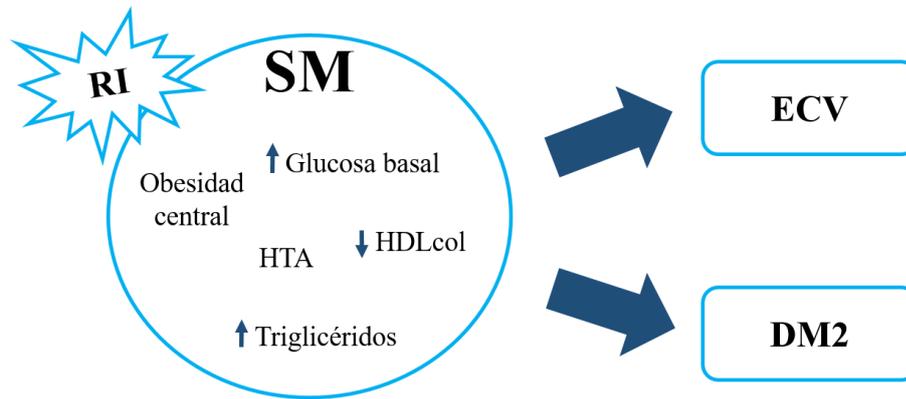


Figura 6. Síndrome metabólico como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus tipo 2. DM2, Diabetes Mellitus tipo 2; ECV, enfermedad cardiovascular; HDLcol, colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad; HTA, hipertensión arterial; RI, resistencia a la insulina; SM, síndrome metabólico.

Hasta el momento no se conocen con exactitud las causas que provocan la aparición del SM, si bien existen diversas teorías sobre el posible factor desencadenante. Algunos autores destacan la importancia de la predisposición genética, el aumento del índice de masa corporal (IMC) por inactividad física y mal hábito alimentario, y la RI. Más recientemente se ha sugerido un importante papel de la obesidad abdominal, demostrándose la relación entre ésta, la DM2 y ECV. La última hipótesis sobre la etiología del SM está basada en la cronificación de un patrón inflamatorio. Ciertos marcadores inflamatorios aumentan en pacientes obesos, y están a su vez relacionados con marcadores de RI o ECV (De la Torre, 2004; Serrano-Ríos y Cascales, 2015).

A continuación, se van a tratar brevemente algunas de las alteraciones asociadas con el SM.

3.1. Síndrome Metabólico y Obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica con gran trascendencia económica y socio-sanitaria considerada por la OMS la pandemia del siglo XXI (Ogden y cols., 2014; Serrano-Ríos y Gutiérrez Fuentes, 2011). Se estima que afectará a un 10% de la población a nivel mundial en el año 2030 si se mantiene la tendencia actual (Webber y cols., 2014). Se caracteriza por la acumulación excesiva de masa grasa (>25% en hombres y >33% en mujeres) que conlleva un aumento de peso corporal. El IMC es el método estandarizado para definir la obesidad en adultos. Se estima que la mortalidad aumenta aproximadamente un 30% por cada incremento de 5 kg/m² del IMC (Hennekens y Andreotti, 2013). Uno de los aspectos más importantes de esta patología es la distribución de la grasa, distinguiéndose dos patrones de obesidad: a) abdominal, también denominada androide, visceral o central, en la que la grasa se localiza a nivel abdominal; y b) periférica o de tipo ginoide, con un almacenamiento extra-abdominal. En relación a esta clasificación el perímetro de cintura es ampliamente utilizado en la práctica clínica y se considera factor de riesgo de obesidad abdominal. Según un meta-análisis realizado por Carmienke y cols.

(2013), la obesidad abdominal está directamente relacionada con la mortalidad y con otros estados patológicos. La obesidad aumenta el riesgo de padecer DM2 y ECV, disminuyendo la calidad y la esperanza de vida de quien la padece (Finelli *y cols.*, 2014; Friedman, 2003). Por todo ello el gasto sanitario atribuible a esta patología en nuestro país, se sitúa entre el 2 y el 8% del gasto total (Villagrán-Pérez *y cols.*, 2010).

La obesidad se caracteriza por un desbalance crónico entre ingesta y gasto de energía, pero los mecanismos exactos implicados en su desarrollo no se conocen con exactitud. Se sabe sin embargo que participan factores genéticos, ambientales, neurológicos, psicológicos, sociológicos, microbiológicos y endocrinos (Villagrán-Pérez *y cols.*, 2010; Cascales-Angosto, 2015; Sánchez-Muniz, 2016). Además, la obesidad es considerada un estado de inflamación crónica leve, caracterizado por una elevada producción de citoquinas y adipocinas pro-inflamatorias, que contribuyen a las alteraciones metabólicas que pueden sufrir estos individuos de forma permanente (Cascales-Angosto, 2015).

La prevención de esta patología es muy difícil, ya que se basa en la divulgación de hábitos saludables y en el cambio de patrones erráticos de dieta y ejercicio muy arraigados en la sociedad, así como en las intervenciones psicológicas en centros de trabajo o enseñanza (Sánchez-Muniz, 2016).

3.2. Síndrome metabólico (SM) y Diabetes Mellitus tipo 2

La DM es una patología caracterizada por una hiperglucemia prolongada (glucemia basal >126mg/dL en plasma venoso). Dependiendo del origen de la enfermedad, se han descrito clásicamente dos tipos de diabetes: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), causada por un proceso autoinmune que destruye las células beta del páncreas e impide la síntesis y secreción de la insulina y DM2, caracterizada por deficiencias en el mecanismo de transducción de señales de la hormona que causan una menor respuesta a la misma en las células diana, conocido como RI (American Diabetes Association, 2014).

El 90% de pacientes con DM padecen DM2 que está muy relacionada con el SM y supone un problema grave y creciente de salud pública que demanda un control urgente. Además de los factores genéticos, los factores ambientales, el sedentarismo y la dieta juegan un papel relevante en la aparición y desarrollo de DM2 (Rahati *y cols.*, 2014)

3.2.1. Importancia de la hiperglucemia postprandial

La DM2 se caracteriza por un rápido y marcado aumento de la glucemia durante la fase postprandial como consecuencia de la resistencia en los tejidos periféricos, particularmente músculo

esquelético e hígado, lo cual se considera un importante factor de riesgo para el desarrollo de ECV a largo plazo (Yamagishi y cols., 2016).

El aumento de glucosa en sangre en el periodo postprandial se considera un factor de riesgo independiente y conlleva un aumento de glucosa en células insulino dependientes (Yamagishi y cols., 2016). Las altas concentraciones de glucosa en el citoplasma provocan entre otros un descenso de los niveles de NADPH y como consecuencia de ello una menor cantidad de glutatión reducido (GSH) disponible (**Fig. 7**) (Faure-Nogueras, 2006). En esta situación se produce también una glicosilación proteica que afecta entre otras moléculas a la hemoglobina, relacionada con muchas de las complicaciones asociadas a la hiperglucemia postprandial; y a la apolipoproteína (Apo) B100 de las LDL disminuyendo la afinidad por el receptor de LDL (LDLr). Así mismo, los procesos de glicosilación suponen una mayor producción de ROS, que junto con la menor cantidad de GSH en la célula favorecen la aparición de estrés oxidativo (Ceriello, 2005).

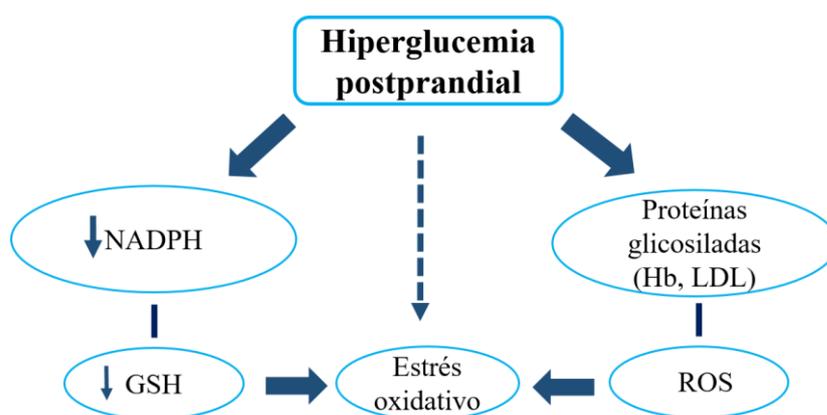


Figura 7. Consecuencias de la hiperglucemia postprandial a nivel de metabolismo celular. Hb, hemoglobina; GSH, glutatión reducido; LDL, lipoproteínas de baja densidad; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; ROS, especies reactivas de oxígeno.

Entre las complicaciones clínicas que se asocian a la hiperglucemia postprandial, encontramos las de origen microvascular (retinopatías, nefropatías y neuropatías) y macrovascular (enfermedad coronaria, enfermedades cerebrovasculares y arteriopatías periféricas) (Ceriello, 2005).

3.2.2. Tratamiento no farmacológico de la DM2

La intervención del estilo de vida con un aumento de ejercicio físico y una dieta adecuada es fundamental para la atención y prevención de la DM2. Una dieta de bajo índice glucémico promueve la pérdida de peso y ha demostrado mejorar el control de la glucemia. Entre las pautas recomendadas se encuentran la sustitución de hidratos de carbono simples por hidratos de carbono complejos de menor índice glucémico y fibra principalmente soluble y fermentable (Sánchez-Muniz y Sanz-Pérez, 2016); así

como el reparto de hidratos de carbono en varias comidas (cinco mínimas) a lo largo del día (Valero Zanuy y León Sanz, 2010). Es muy importante adecuar la ingesta al gasto calórico del paciente. Si los cambios en el estilo de vida en la DM2 leve no resultaran en una mejor glucemia pasadas seis semanas, debe considerarse el uso de medicamentos, sin olvidar mantener una dieta correcta y personalizada a la problemática metabólica del paciente.

3.3. Síndrome Metabólico (SM) y Dislipemias

Como ya se ha comentado, entre los parámetros que se tienen en cuenta para diagnosticar el SM se encuentran tanto los niveles altos de triglicéridos como niveles bajos de HDL, lo que sugiere un importante papel del metabolismo lipoproteico en esta patología (Sánchez-Muniz, 2016). Los lípidos, por su insolubilidad en medio acuoso, son transportados en sangre principalmente incorporados en lipoproteínas. Son partículas esféricas con una parte central o “core” formada por triglicéridos y colesterol esterificado y una parte periférica con fosfolípidos, colesterol libre y Apo. Además, en la parte periférica de las lipoproteínas se encuentran hidratos de carbono que favorecen el reconocimiento por los receptores de las diferentes lipoproteínas. Aunque las lipoproteínas pueden clasificarse de distintas formas (p.ej. atendiendo a su contenido y variedad en Apo), la forma más extendida de clasificarlas es en función de su densidad, que es inversamente proporcional a su tamaño, y que viene determinada por su composición (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010). Así, las lipoproteínas más ricas en proteínas, con forma discoidal, presentan una mayor densidad mientras aquellas con una mayor proporción de lípidos se caracterizan por una menor densidad y forma más esférica. Tipos de lipoproteínas en orden creciente de densidad:

- Quilomicrones (QM): en términos didácticos puede decirse que empaquetan los lípidos procedentes de la dieta (triglicéridos, colesterol y fosfolípidos) para transportarlos hasta el hígado. A medida que pasan por el músculo y tejido adiposo van siendo atacados por diferentes enzimas (lipoproteín lipasa, colesterol ester transfer protein), cediendo triglicéridos y van perdiendo tamaño. Los QM de menor tamaño se conocen como QM remanentes (QMr) que son captados por el hígado por el receptor de lipoproteínas (LRP) que reconoce a la ApoE de los QM.
- VLDL, *very low density lipoproteins*: formadas por el hígado para vehicular triglicéridos y colesterol. Ceden triglicéridos a los tejidos periféricos. De forma similar a lo señalado para los QM, son atacadas por la lipoproteín lipasa e intercambian componentes con las HDL, participando en este proceso diferentes sistemas enzimáticos entre los que resaltan la lecitín colesterol acil transferasa y el CETP (del inglés *cholesterol ester transfer protein*), transformándose en IDL. Parte de las partículas vuelven a ser captadas por el hígado como VLDL remanentes al unirse al LDLr.

- IDL, *intermedium density lipoproteins*: se forman a partir de las VLDL una vez que han perdido la mayor parte de sus triglicéridos. Este proceso tiene lugar en el hígado por acción conjunta de lipasas (lipasa endotelial, lipasa hepática). Son reconocidas por receptores ApoE/ApoB100 del hígado. Tienen una vida media muy corta.
- LDL, *low density lipoproteins*: procedentes de las IDL, presentan mayor contenido de colesterol y menor contenido de triglicéridos. Se encargan de transportar el colesterol a los tejidos. Son reconocidas por receptores ApoE/ApoB100, especialmente de las células hormonales y regenerativas.
- HDL, *high density lipoproteins*: se encargan del transporte reverso de colesterol, desde los tejidos periféricos al hígado donde es eliminado a través de la bilis o empaquetado de nuevo en las VLDL. Existen varias subpoblaciones con composición y características diferentes. Se ha demostrado que casi todas las células del organismo son capaces de sintetizarlas (Lee y Parks, 2005).

Existe un intercambio de componentes entre las diferentes lipoproteínas tanto de la fracción lipídica como de las Apo (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010). El hígado es el órgano principal a nivel de metabolismo del colesterol y se encarga de captar QMr, VLDL, IDL, LDL y HDL (Stein y cols., 1983). El metabolismo lipoproteico se resume en la **Figura 8**.

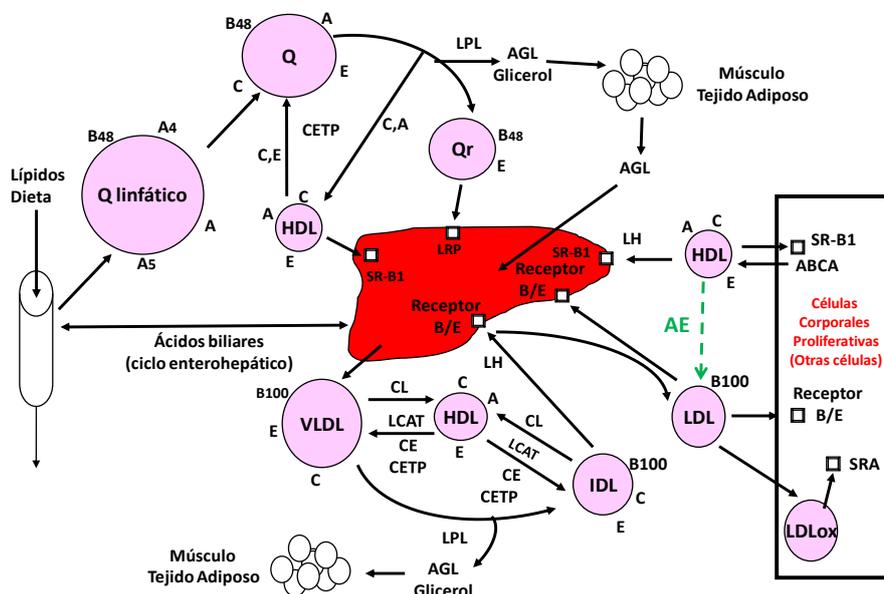


Figura 8. Principales rutas del metabolismo lipoproteico. ABC, transportador “ATP” binding cassette; AE, arilesterasa; AGL, ácidos grasos libres; apo, apolipoproteína; CE, colesterol esterificado; CETP, complejo de transferencia de ésteres de colesterol; CL, colesterol libre; HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT, lecitin colesterol acil-transferasa; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLox,

LDL oxidadas; LH, lipasa hepática; LPL, lipoprotein lipasa; LRP, proteína receptora de quilomicrones parecida a LDL; Q, quilomicrones; Qr, quilomicrones remanentes; SRA, receptor *scavenger* tipo A; SR-B1, receptor *scavenger* tipo B1; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Tomada de Gesteiro Alejos (2015).

Uno de los aspectos más importantes de la fracción HDL es la presencia de la enzima paraoxonasa 1 (PON1) que protege de la oxidación a las HDL y a otras fracciones lipoproteicas especialmente LDL y VLDL (Canales y Sánchez-Muniz, 2003). La PON1 es una glicoproteína Ca^{2+} -dependiente de 44- kDa con tres actividades principales: arilesterasa, paraoxonasa y lactonasa. Su síntesis, almacenamiento y secreción se lleva a cabo principalmente en el hígado (Mackness y cols., 1998). Numerosos estudios atribuyen a la PON1 propiedades antiaterogénicas. Entre sus funciones destaca: protección frente al daño oxidativo de LDL, HDL y macrófagos (Rozenberg y cols., 2003a); inhibición de moléculas que facilitan la adhesión de monocitos a la pared vascular (Mackness y cols., 2004); disminución de la captación de LDL oxidadas por los macrófagos (Fuhrman y cols., 2002) e inhibición de la síntesis de colesterol en macrófagos (Rozenberg y cols., 2003b).

Las ratas son el modelo animal más empleado para estudiar el metabolismo lipoproteico junto con el conejo. Sin embargo, se deben tener en cuenta algunas peculiaridades que presenta el metabolismo lipoproteico de las ratas respecto a los humanos. La rata es un animal HDL (Cava, 1986; Sánchez-Muniz y Bastida, 2008) ya que prácticamente el 80% de las lipoproteínas que presentan son HDL, existiendo niveles muy reducidos de LDL. Esto contrasta con lo observado en humanos adultos, donde otras lipoproteínas son mayoritarias. Otro de los aspectos que más diferencia a la rata es la proporción de LDL que procede de las VLDL. Mientras en los humanos la mayoría de las VLDL son convertidas en LDL (Smith y cols., 1978), en las ratas se reduce a solo un 10% del total de VLDL, lo que se traduce en unos niveles muy bajos de LDL (Bilheimer y cols., 1972). Los niveles normales de colesterol en la rata son <100 mg/dL, con una relación colesterol/fosfolípidos <1 (Sánchez-Muniz y Bastida, 2008). Se considera hipercolesterolemia moderada en ratas cuando el colesterol del plasma se encuentra entre 100 y 200 mg/dL o cuando el cociente colesterol/fosfolípidos >1; e hipercolesterolemia severa con niveles de colesterol plasmático >200mg/mL y cociente colesterol/fosfolípidos >2.

En situaciones patológicas el metabolismo lipoproteico puede alterarse, afectando tanto a la proporción de las diferentes fracciones de lipoproteínas como a la composición característica de cada una de ellas (Terpstra y cols., 1981; Carmena, 2010). La hiperlipemia se define como niveles anormalmente elevados de colesterol, triglicéridos o ambos, y en general es asintomática. Hay algunos factores que se relacionan con la hiperlipidemia como antecedentes familiares, sedentarismo, consumo de alcohol, tabaquismo o hipertiroidismo; aunque con frecuencia aparece por desequilibrios en el consumo de los macronutrientes de la dieta, especialmente un exceso de hidratos de carbono refinados y/o grasa saturada.

Uno de los primeros síntomas de la RI es el incremento de VLDL en sangre que provoca hipertrigliceridemia. El aumento en la síntesis de VLDL se debe al exceso de ácidos grasos libres (AGL)

que llegan al hígado. En la situación de RI las partículas ricas en triglicéridos permanecen más tiempo en sangre lo que tiene una serie de consecuencias que se detallan a continuación y que determinan en cierta manera el progreso del SM. Al estar más tiempo circulando, las VLDL quedan más expuestas a la CETP, favoreciendo el intercambio de lípidos con otras lipoproteínas. Las VLDL se cargan progresivamente de colesterol procedente de las LDL y las HDL; y a su vez las VLDL ceden sus triglicéridos. Este proceso da paso a LDL pequeñas y densas, y VLDL enriquecidas en colesterol ambas con perfil aterogénico y características del SM (Bays, 2009) (**Fig. 9**). Por último, las HDL ricas en triglicéridos y pobres en colesterol son partículas pequeñas y densas, con escaso poder antioxidante y vida media más corta. Como ya se ha comentado, el descenso de colesterol transportado por las HDL es uno de los parámetros que se tienen en cuenta para el diagnóstico del SM (Reaven, 2005).

Además de estas alteraciones, en el músculo y tejido adiposo disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa como consecuencia de la RI. Las VLDL no pueden ceder los triglicéridos a los tejidos, volviendo al hígado y agravando la situación de hiperlipemia hepática.

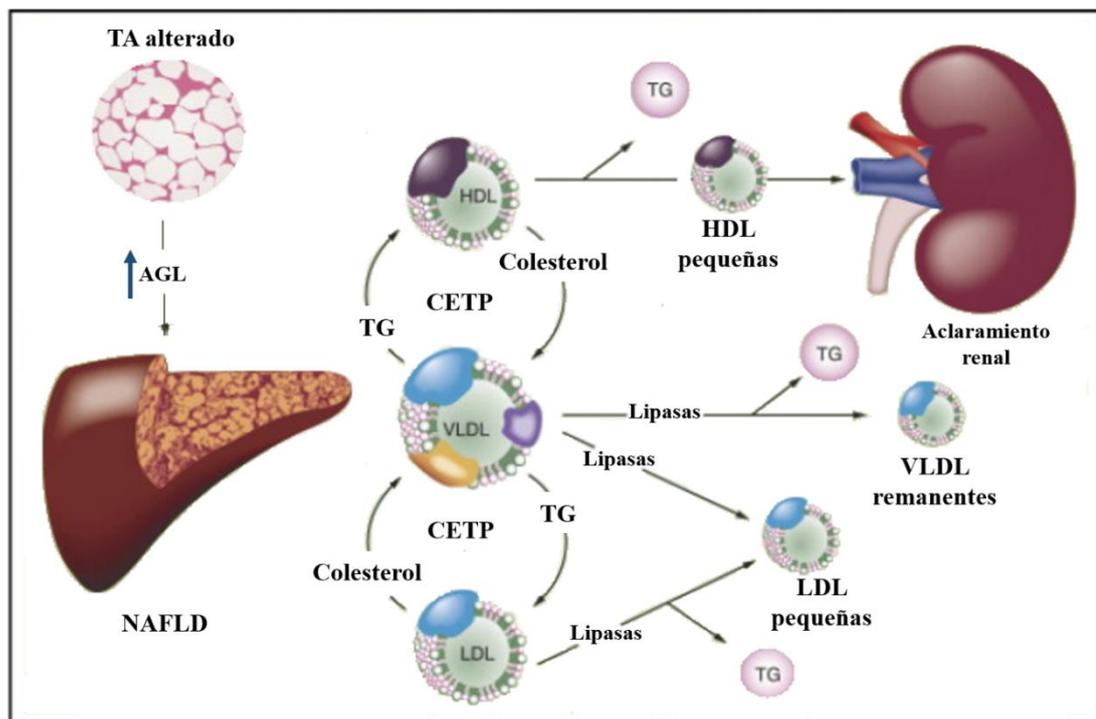


Figura 9: Consecuencias de la RI y la obesidad en el perfil lipídico de los pacientes con síndrome metabólico: hipertrigliceridemia, disminución de niveles de colesterol transportado por HDL y partículas LDL pequeñas y densas. AGL, ácidos grasos libres; CEPT, proteína transportadora de ésteres de colesterol; TG, triglicéridos. Adaptada de Bays (2009).

3.4. Hígado graso no alcohólico

El hígado graso no alcohólico, siglas procedentes del nombre en inglés *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), suele identificarse como la manifestación hepática del SM (Asrih y Jornayvaz, 2015; Than y cols., 2015). El NAFLD se define como la acumulación de grasa en forma de triglicéridos en más de un 5% de los hepatocitos en ausencia de inflamación o fibrosis y no asociada a un consumo elevado de alcohol (<30g en hombres y <20g en mujeres) (Castro y Silva, 2015; Chalasani y cols., 2012). Su prevalencia ha aumentado rápidamente en las últimas décadas debido a la incidencia de obesidad en los países desarrollados. El NAFLD está muy influido por factores como la edad, el sexo, dislipemia, DM2, obesidad central y algunos polimorfismos genéticos (Than y Newsome, 2015). La RI se considera el nexo de unión entre el SM y el NAFLD incluso en ausencia de obesidad (Asrih y Jornayvaz, 2015). Además, el NAFLD es un factor de riesgo de ECV que permite predecir futuros eventos independientemente del estado de otros factores de riesgo (Ahmed y cols., 2012; Brea y Puzo, 2013). En los últimos años algunos estudios proponen que no sólo es el NAFLD el que precede al SM sino que es un factor necesario para la progresión del SM (Asrih y Jornayvaz, 2015; Lonardo y cols., 2015).

La esteatohepatitis no alcohólica, en inglés *non alcoholic steatohepatitis* (NASH), es la forma progresiva del NAFLD en la que además de esteatosis aparece inflamación y balonización con o sin fibrosis. La inflamación es consecuencia de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α o interleuquina 6 (IL-6) producidas principalmente por el tejido adiposo o por el propio hígado. La progresión a NASH ocurre en un 20-25% de los pacientes con NAFLD, y de los pacientes con NASH el 20% desarrollará fibrosis y cirrosis (Angulo, 2010).

3.4.1 Prevalencia de NAFLD

Los estudios de prevalencia de NAFLD y NASH son relativamente recientes y bastante inespecíficos ya que se trata de una patología asintomática y de difícil diagnóstico. A pesar de ello, el NAFLD es la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica en países occidentales (Asrih y Jornayvaz, 2015)

La prevalencia se estima entre el 20-30% de la población (Williams y cols., 2011; Zelber-Sagi y cols., 2006); llegando al 50% si solo se tiene en cuenta población con sobrepeso o pacientes con dislipemia, a un 70% en diabéticos y hasta un 95% en obesos (Castro y Silva, 2015), lo que pone de manifiesto la relación de las diferentes patologías con el NAFLD. Parece que la progresión a NASH y fibrosis es más frecuente en hombres que en mujeres (Than y Newsome, 2015). La mortalidad se incrementa en pacientes con NAFLD un 35-85% comparado con población de la misma edad y sexo sin NAFLD (Castro y Silva, 2015) y es mayor en pacientes con NASH y fibrosis asociada a eventos cardiovasculares (Perazzo y cols., 2014).

3.4.2. Mecanismos implicados en NAFLD y NASH

El desarrollo de NAFLD parece deberse al aumento de AGL liberados en pacientes con obesidad central y RI (Stankovi y cols., 2014). Como ya se ha comentado anteriormente la RI parece el factor que relaciona el SM y el NAFLD. A pesar de que la obesidad es un factor predictivo importante se han detectado pacientes no obesos con NAFLD (Kim y cols., 2004; Musso y cols., 2008; Sinn y cols., 2012), lo que demuestra que no es un factor imprescindible para su desarrollo.

Los mecanismos implicados en la progresión del NAFLD a NASH no se conocen por completo todavía. En el año 1998, Day y James postularon la denominada hipótesis de los dos eventos o del “doble impacto”, en inglés *two hit hypothesis*. El primer evento, relacionado con la aparición de NAFLD, provoca la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos. En una situación de resistencia a insulina se produce un aumento de la actividad lipolítica en el tejido adiposo, y como consecuencia de ello una mayor llegada de AGL al hígado que provoca lipotoxicidad (Castro y Silva, 2015). La aparición de esteatosis hepática se produce por una alteración en el balance entre el aporte de lípidos (captación de AGL circulantes y los sintetizados *de novo*), y el catabolismo de los mismos (β -oxidación de ácidos grasos (AG) y/o la secreción de triglicéridos en forma de VLDL (Farrel y Larter, 2006).

El segundo evento provoca la progresión de NAFLD a NASH. Algunos de los factores propuestos como desencadenantes son la peroxidación lipídica, la disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, la disminución de la capacidad de defensa antioxidante, apoptosis y la respuesta inflamatoria promovida por el daño de los hepatocitos (Than y Newsome, 2015).

En los últimos años ha surgido una nueva hipótesis denominada múltiples eventos paralelos, *multiple parallel hits hypothesis*, en la que se describe que todos los posibles determinantes metabólicos e inflamatorios del NASH no actúan por separado, sino que son interactivos y colaboran en la progresión del daño tisular. Destaca el papel de las alteraciones en el tejido adiposo y la microbiota intestinal. Por lo tanto, la RI y la inflamación estarían aconteciendo simultáneamente sin que una sea necesariamente producto de la otra (Trauner y cols., 2010). Además, dado que sólo un 20% de casos de NAFLD derivan a NASH, sugieren que ambas patologías tengan un origen diferente. En esta línea, esta teoría defiende que mientras el NAFLD es producto de la esteatosis, en el NASH debe producirse la inflamación antes que la esteatosis, explicando la diferente progresión de la enfermedad. En cualquier caso, la identificación de los eventos que provocan la progresión de esta patología es de vital importancia para poder identificar nuevas dianas terapéuticas y un tratamiento efectivo de la enfermedad (**Fig. 10**) (Feldstein and Gores, 2005).

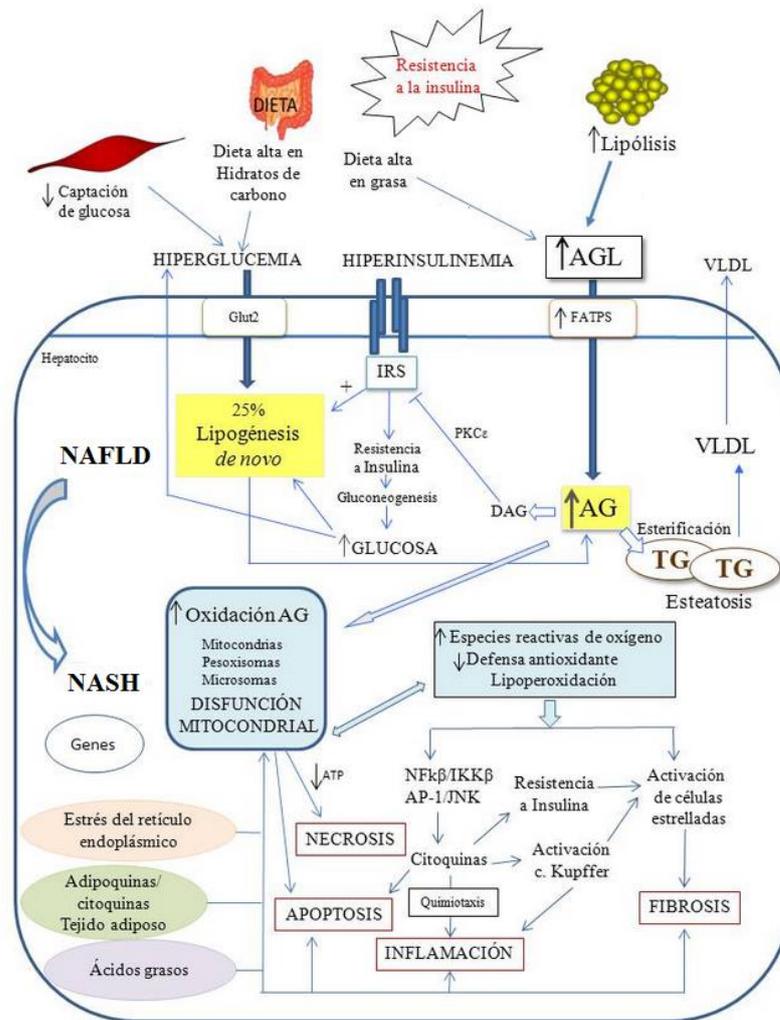


Figura 10: Mecanismos patogénicos del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y su progresión a esteatohepatitis no alcohólica (NASH). AG, ácidos grasos; AGL, ácidos grasos libres; DAG, diacilglicéridos; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Modificada de López-Oliva y Muñoz Martínez (2014).

3.4.3. Lipotoxicidad y lipopoptosis como aspectos importantes del hígado graso no alcohólico

La lipotoxicidad se define como la toxicidad celular observada en presencia de cantidades anormales de grasa (Unger, 2003). Se ha demostrado que la acumulación de triglicéridos en el hígado no es un proceso perjudicial en sí mismo, sino que aunque provoca esteatosis supone un mecanismo protector para evitar la acumulación de otras sustancias como ácidos grasos saturados (AGS) o colesterol que sí provocan lipotoxicidad (Alkhoury y cols., 2009). La lipopoptosis hace referencia a la muerte celular provocada por el exceso de grasa lipotóxica y parece tener un papel crucial en la progresión del NAFLD (Feldstein y cols., 2003), participando activamente en el segundo evento de la enfermedad (Feldstein y Gores, 2005). El grado de apoptosis en pacientes con NAFLD/NASH correlaciona con el

grado de inflamación y fibrosis y puede ser por tanto un buen indicativo del estado de la enfermedad. De hecho, ya se emplean en la práctica clínica algunos marcadores específicos de apoptosis como métodos predictivos no invasivos en el diagnóstico de NAFLD (Than y Newsome, 2015).

En cuanto a los mecanismos de lipoapoptosis, el exceso de AGL, principalmente AGS, provocan un aumento en los niveles de ROS y en la permeabilización de la membrana mitocondrial activando la cascada característica de la vía intrínseca de la apoptosis (Malhi y Gores., 2008). Por otra parte, los AGL pueden inducir también un aumento de los niveles de receptores de muerte provocando también la activación de la vía extrínseca de la apoptosis (Malhi y Gores., 2008). Esta vía también se ve favorecida por los niveles elevados de TNF- α liberado por células inflamatorias (Alkhoury y cols., 2009).

3.4.4. Hígado graso no alcohólico, estrés oxidativo y estado antioxidante

El estrés oxidativo parece uno de los mecanismos más importantes implicados en el daño hepático en el NAFLD, jugando un papel fundamental en la progresión de NAFLD a NASH (Polimeni y cols., 2015). Los ROS formados pueden agotar la acción de las enzimas antioxidantes haciendo que el hígado sea susceptible al daño oxidativo. El incremento en el hígado de los niveles de ROS y lípidos oxidados (p. ej. oxisteroles procedentes del colesterol) en pacientes con NAFLD/NASH acompañado de un descenso en los niveles de SOD y catalasa sugiere que existe una relación entre los biomarcadores de estrés oxidativo y el estado del NAFLD/NASH (Sumida y cols., 2013).

El aumento de los niveles de ROS en el hígado se ha relacionado con la peroxidación lipídica, la fibrogénesis y la disminución de la secreción de VLDL favoreciendo la esteatosis hepática (Day, 2002). Además, el estrés oxidativo promueve RI, necroinflamación, y activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Gambino y cols., 2011).

3.4.5. Hígado graso no alcohólico y colesterol

Dentro de los tipos de lípidos, algunas especies químicas están más relacionadas con la lipotoxicidad y son capaces de provocar muerte celular y desencadenar la respuesta inflamatoria y fibrótica. La acumulación de colesterol en el hígado se ha relacionado con la infiltración inflamatoria y balonización de los hepatocitos, factores muy relacionados con el NASH (Farrell, y Van Rooyen, 2012). De hecho, el uso de dietas hipercolesterolémicas en modelos animales provoca la progresión de NAFLD a NASH (Wouters y cols., 2008). Se ha observado además que el hígado de pacientes con NASH presenta mayor contenido de colesterol que los pacientes con NAFLD (Puri y cols., 2007). Este aspecto es relevante ya que, aunque los AGS, como ya se ha mencionado, también tienen un perfil lipotóxico, su contenido en pacientes con NAFLD y NASH fue muy similar.

3.4.6. Metabolismo lipoproteico e hígado graso no alcohólico

El contenido en lípidos del hígado está en gran medida regulado por la captación, síntesis y secreción de lipoproteínas, y su desequilibrio puede influir en el desarrollo de NAFLD (García y cols., 2015). Los pacientes con NAFLD presentan un perfil lipoproteico modificado típico, con mayores cantidades de VLDL y LDL, y menores niveles de HDL (García y cols., 2015). Además, el tamaño de las diferentes partículas no es el que se observa en situaciones fisiológicas (Cohen y Fisher, 2013; Chan y cols., 2010; DeFilippis y cols., 2013). Debe tenerse en cuenta que estas alteraciones pueden estar influidas por el género y la etnia (García y cols., 2015). Otra alteración importante asociada al NAFLD es la menor expresión del LDLr (Nakamuta y cols., 2009), que provoca que las VLDL y LDL permanezcan más tiempo en sangre, favoreciendo su oxidación (Toyota y cols., 1999). Las LDL oxidadas son capaces de activar células estrelladas cruciales en la progresión de NAFLD a NASH (Kang y Chen, 2009). Las VLDL son la fracción lipoproteica más ligada al SM (Cali y cols., 2007), observándose una correlación positiva entre ambos. Por último, los cambios en el metabolismo lipoproteico de pacientes con NASH son todavía contradictorios, ya que se basan en niveles de LDL colesterol y no en la aterogenicidad y oxidabilidad de dichas partículas LDL.

3.4.7. Modelos de NAFLD/NASH

Se han desarrollado numerosos modelos animales de NAFLD, principalmente murinos, para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el inicio del NAFLD y su progresión a NASH. El modelo ideal debería reflejar la histopatología y fisiopatología de la enfermedad en humanos. Los rasgos más importantes son la esteatosis, inflamación y balonización hepatocelular. En algunos casos puede valorarse la aparición de fibrosis y en último término cirrosis. Además de los rasgos histológicos deben emularse las alteraciones metabólicas típicas como la obesidad, RI, hiperglucemia y dislipemia. Los modelos animales se clasifican en modelos genéticos, nutricionales o la combinación de ambos. Ninguno de ellos consigue recrear exactamente la patología en humanos y por tanto se debe seleccionar cuidadosamente el modelo en función de las características y objetivos a estudiar (Takahashi y cols., 2012).

Dentro de los modelos con modificaciones genéticas destacan los ratones obesos ob/ob y db/db y la rata obesa fa/fa, con una alteración en el gen de la leptina y el receptor de leptina respectivamente. Como consecuencia de la pérdida de función de la leptina, estos animales presentan hiperfagia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, RI e hipertrofia del tejido adiposo (Aleixandre y Miguel, 2008). La principal limitación del modelo es que de forma espontánea no hay progresión a NASH y no presentan fibrosis.

En el grupo de modelos nutricionales se distinguen de igual manera diferentes estrategias. Son muy empleadas las dietas ricas en grasa que pretenden emular los hábitos alimentarios adoptados recientemente en la sociedad occidental. El consumo continuado de dietas con un alto contenido en grasa (40-50%) provoca el desarrollo de obesidad, RI y dislipemia en ratas y ratones. La patología suele aparecer a partir de los 2 ó 3 meses del inicio de la dieta (Akagiri y cols., 2008). Además de las dietas ricas en grasa, aquellas con un alto contenido en colesterol representan también un modelo interesante. El colesterol dietético, como se ha comentado anteriormente, es considerado un factor importante en el desarrollo de inflamación hepática y la progresión de las esteatosis (Wouters y cols., 2008). Las dietas hipercolesterolémicas provocan todas las alteraciones típicas del NAFLD/NSH excepto la obesidad, ya que lejos de engordar es frecuente detectar pérdidas de peso en estos animales (Takahashi y cols., 2012).

Una gran cantidad de procesos endocrinos y metabólicos participan en el proceso de envejecimiento. En particular, los mecanismos relacionados con la sensibilidad a insulina y la función mitocondrial son los más estudiados y dependen en gran medida del estado nutricional. Además, la edad se considera factor de riesgo en el NAFLD, ya que se observa un aumento de la prevalencia asociada al envejecimiento (Floreani, 2007). Por ello, muchos estudios combinan las estrategias descritas con el uso de animales adultos o viejos. Fontana y cols. (2013) afirman que la edad no influye en el desarrollo de esteatosis hepática pero favorece el incremento de inflamación, apoptosis y daño hepatocelular que provoca la progresión de la patología.

3.4.8. Métodos de diagnóstico

Al tratarse de una enfermedad normalmente asintomática su diagnóstico no es muy frecuente (Armstrong y cols., 2012). Los clínicos suelen realizar las pruebas diagnósticas en pacientes con test hepáticos alterados, o en aquellos que presentan varios de los factores del SM (Wong y cols., 2012). Los métodos de diagnóstico más empleados son la ecografía abdominal, espectroscopía por resonancia magnética, fibroscan, ultrasonografía, la tomografía computada, y niveles de transaminasas en sangre, aunque sin duda el *gold standard* continúa siendo la biopsia hepática (Bugianesi y cols., 2002). Los niveles de transaminasas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), parecen no ser buenos marcadores de NAFLD ya que en muchos estudios no se corresponden con el daño hepático real en esta patología (Dyson y cols., 2014; Verma y cols., 2013). En la actualidad dentro de los métodos predictivos no invasivos se emplea un *score* que incluye edad, sexo, talla, peso, alfa-macroglobulina, haptoglobina, apo A1, bilirrubina total, (gamma glutamil transpeptidasa (GGT), ALT, AST, triglicéridos, colesterol y glucemia (Castro y Silva, 2015).

3.4.9. Biopsia hepática

La biopsia es el único método que permite diferenciar NAFLD de NASH; sin embargo, dado su carácter invasivo, sólo se emplea en casos de alto riesgo de fibrosis avanzada, de enfermedad hepática concomitante, pacientes que se van a someter a algún proceso quirúrgico abdominal o en estudios clínicos controlados con el consentimiento previo del paciente (Chalasanani y cols., 2012; Nascimbeni y cols., 2013). La utilidad del diagnóstico exacto de la patología ha sido cuestionada ya que no se conoce un tratamiento que haya demostrado su eficacia. No obstante, los pacientes suelen cambiar sus hábitos alimentarios después de conocer el diagnóstico (Santos y cols. 2010). No puede ser considerada en ningún caso una herramienta de muestreo en estudios poblacionales; sin embargo, es la única prueba diagnóstica con la que deben validarse otras nuevas que vayan surgiendo (Brunt y Tiniakos, 2010).

Una de sus principales ventajas es la posibilidad de analizar e incluso evaluar semi-cuantitativamente las lesiones. Para poder estandarizar los criterios a la hora de diagnosticar la enfermedad y su progreso o no a NASH se han ido creando una serie de escalas de puntuación con los rasgos histológicos más importantes de la enfermedad. La más empleada en la actualidad es la propuesta por el *NASH Clinical Research Network* que incluye la esteatosis, inflamación lobular y balonización para formar un marcador de actividad NAFLD (NAS), por sus siglas en inglés de *NAFLD activity score*, con una máxima puntuación de 8. Un valor de NAS superior a 4 se diagnostica como NASH; menos de 3 como NAFLD, y un *score* de 3-4 se considera valor límite, ya que pueden progresar a NASH o remitir hacia NAFLD. Además del NAS, estos autores aportan un sistema para cuantificación de la fibrosis (Kleiner y cols., 2005).

3.4.10. Tratamiento del hígado graso no alcohólico

En general se acepta que el NAFLD, en la etapa inicial es reversible si se modifica o interrumpe la causa primaria, que probablemente sea aquella que provoca el desarrollo del SM (Santos y cols., 2010). Ya en etapas más avanzadas de la enfermedad, y especialmente cuando progresa a NASH, el daño hepático se hace más evidente y aumenta considerablemente la posibilidad de progresión hacia cirrosis hepática. A pesar de la gran cantidad de estudios sobre NAFLD y NASH realizados en la última década por su elevada prevalencia no se ha definido ningún tratamiento específico para paliarlo. Los posibles objetivos terapéuticos del NAFLD son múltiples ya que, aunque la RI es el principal factor patogénico, otros muchos influyen en su desarrollo. Algunas de las actuaciones comparten la mejoría de las alteraciones histológicas hepáticas con la disminución del riesgo vascular.

La primera medida a tener en cuenta y la más efectiva en el tratamiento de NAFLD es el cambio de los hábitos de vida, dando especial énfasis a la intervención dietética, la abolición del consumo de alcohol y la práctica de ejercicio (Castro y Silva., 2015; Asrih y Jornayvaz, 2015; Park y cols., 2004). Las

modificaciones del estilo de vida se aceptan universalmente para paliar las manifestaciones de la RI (Bettermann y cols., 2014). Como consecuencia de la intervención nutricional y el abandono de la vida sedentaria se consigue una disminución del peso corporal, junto con una mejora de la RI (Castro y Silva, 2015). Además, el consumo de una dieta saludable promueve el desarrollo de una microbiota beneficiosa (Wu y cols., 2011; Exteberria y cols., 2016).

Cuando la situación se agrava es necesario pautar una terapia farmacológica. Parecen útiles aquellos fármacos empleados para tratar los factores que intervienen en la patología de NAFLD/NASH. Existen hasta ahora múltiples propuestas como los medicamentos utilizados para bajar de peso (Orlistat), medicamentos que intentan bloquear la RI (Metformina, Glitazonas, Glinidase Incretinas), agentes hipolipemiantes (Estatinas, Fibratos, Ezetimiba), antioxidantes (Vitamina E) y citoprotectores (Betaína, Ácido ursodeoxicólico (AUDC) y Silimarina) (Cariou y cols., 2012).

Ninguno de estos ha sido aprobado por la FDA como tratamiento específico del NAFLD, por lo que se considera un campo de búsqueda continua con nuevas propuestas muy interesantes. Algunas de estas nuevas alternativas son: Losartán, que bloquea el sistema renina-angiotensina, controlando la presión arterial y evitando la fibrosis; los probióticos que inhiben la sobrepoblación bacteriana y la inducción de citoquinas responsables de inflamación; la Pentoxifilina que inhibe directamente al TNF α que promueve la inflamación; y los ácidos grasos omega-3 que en modelos animales han mostrado capacidad para mejorar la RI, reducir la hiperlipemia, la esteatosis y la inflamación (Bettermann y cols., 2014). Además, se propone la aplicación de terapias para combatir la apoptosis (Syn y cols., 2009).

4. Silicio

El silicio fue descubierto en 1824 por el químico suizo Jöns Jacob Berzelius. Es el segundo elemento más abundante de la tierra, supone el 27% de la masa total de la misma, sólo por detrás del oxígeno que supone aproximadamente el 45% (Greenwood y Earnshaw, 2012; Sahebi y cols., 2015). Su contribución se eleva hasta el 60% atendiendo a los componentes del suelo ya que se encuentra en casi todos los minerales, rocas, arcillas y arenas; en forma de cuarzo, esmeralda, feldespato, serpentina, mica, talco, asbestos y cristal. En el agua se encuentra en disolución a concentraciones de 0,07 a 2 mM (Ehrlich, 1996; Treguer y cols., 1995). Su disolución en agua es el resultado de la erosión de rocas que contienen silicatos, un proceso que es mediado por microorganismos, líquenes y por el agua de la lluvia (Bennett y cols. 2001). Dada su reactividad y abundancia existen innumerables formas químicas con diferentes estructuras y propiedades, siendo algunas de ellas tóxicas y otras aparentemente críticas para la salud. Existen evidencias de que el silicio es esencial para el crecimiento y la función biológica de diversos microorganismos, plantas y animales (Bendz, 2013).

Teniendo en cuenta su abundancia en la naturaleza no es extraño pensar que el silicio desempeñe alguna función importante en los seres vivos. Sin embargo, durante años la investigación relacionada con el silicio ha ido encaminada fundamentalmente al estudio de sus efectos tóxicos producidos por la inhalación de sílice cristalina (Merget y cols., 2002). Actualmente el silicio es reconocido como un micronutriente esencial para mamíferos, aunque tal observación ha sido objeto de controversia durante décadas. Sus efectos nocivos, sumados a la falta de comprensión de sus múltiples formas químicas, explican que no se hayan estudiado de forma detallada sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. En la actualidad sin embargo existe un interés creciente por conocer los efectos del silicio sobre la salud, así como sus mecanismos de acción (Martin, 2007; 2013).

En las siguientes páginas describiremos con detalle las propiedades y características más relevantes de este elemento químico.

4.1. Características generales

4.1.1. Distribución y prevalencia en la naturaleza

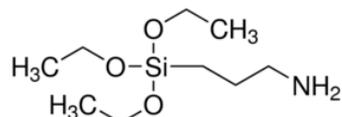
El silicio es un elemento de peso atómico 28 situado en el grupo XIV de la tabla periódica junto al carbono, germanio, estaño y plomo (Fig. 11). Es un átomo estructuralmente rígido, con cuatro electrones de valencia, y es incluido en el grupo de los llamados metaloides por sus características intermedias entre los metales y los no metales.

1	H	METALOIDES																2	He											
2	Li	Be	METALES																B	C	N	O	F	Ne						
3	Na	Mg																	Al	Si	P	S	Cl	Ar						
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr												
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe												
6	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn												
7	Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt										86	87	88	89	90							
8																	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
9																	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
7																	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Figura 11: Posición del silicio en la tabla periódica.

A simple vista, el silicio puede parecer una alternativa a la base del carbono porque es muy abundante en el universo y, al igual que éste, pertenece al grupo XIV en la tabla periódica y su química es muy similar. Por ejemplo, el silicio al igual que el carbono se combina con cuatro átomos de hidrógeno

para forma silanos (SiH_4), equivalentes a alcanos o hidrocarburos (CH_4) formados por carbono. Asimismo, existen numerosas formas de silanos como acetoxi-silanos, alcosi silanos, aminosilanos etc, con estructuras químicas análogas a las del carbono. Además, el silicio es capaz de formar compuestos con carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno como el 3-amino-propil-trietoxi-silano de fórmula:



Los compuestos orgánicos de silicio son compuestos que contienen enlaces covalentes entre átomos de silicio y carbono (Si-C). Por tanto, la rama de la química que estudia las propiedades y reactividad de estos compuestos se denomina química de organosilicio. El primer compuesto descrito fue el tetraetilsilano, descubierto por Charles Friedel y James Crafts en 1863 por reacción de tetraclorosilano con dietilzinc. Generalmente, los enlaces Si-C no participan en procesos bioquímicos. Las grandes diferencias entre la química del silicio y la del carbono se deben fundamentalmente a la menor electronegatividad del silicio y su mayor peso atómico. Por ello, los enlaces Si-Si, a diferencia de los enlaces C-C, son muy débiles e inestables en presencia de agua.

El silicio en su forma elemental aparece raramente en la naturaleza debido a su elevada propensión a reaccionar con el oxígeno y el agua. En las combinaciones con oxígeno forma uniones tipo siloxano (Si-O-Si) con gran estabilidad (Martin, 2007), y se encuentra fundamentalmente como sílice y silicatos muy extendidos en formaciones geológicas de rocas. Generalmente se considera silicato a cualquier compuesto que contenga silicio y oxígeno como anión. El anión SiO_4^{2-} es el óxido más extendido. Químicamente, los aniones silicato pueden formar compuestos con muchos cationes diferentes siendo las combinaciones con aluminio las más prevalentes (p.e aluminosilicatos o zeolitas) (Willhite y cols., 2012). Su elevada reactividad y abundancia le permiten dar lugar a gran cantidad de estructuras con propiedades físico-químicas diferentes. La formación de unas estructuras u otras depende de las condiciones ambientales de temperatura y pH, presencia de otros iones así como el tiempo de exposición a los mismos (Perry y Keeling-Tucker, 2000).

La sílice se define químicamente como óxido de silicio, y engloba a todas las formas tanto reactivas (solubles) como no reactivas (coloidales). El dióxido de silicio (SiO_2) es un ácido silícico anhidro del ácido ortosilícico (H_4SiO_4) que forma parte de la arena y es el compuesto más abundante de la naturaleza. El SiO_2 es capaz de formar a su vez estructuras cristalinas (ej. cuarzo o cristobalita) y formas amorfas. Por último, debido a su bajo peso molecular, el SiO_2 puede hidratarse y disolverse en agua parcialmente formando ácido silícico.

Las formas en las que se encuentra el silicio, así como los pesos moleculares de las mismas, dependen del pH y de la concentración en la que se encuentra en matrices acuosas. Así, a bajas

concentraciones (<2 mM) el silicio se encuentra en su forma monomérica ácida (pKa: 9,6) denominado ácido ortosilícico (H_4SiO_4) (Martin, 2013). Cuando el pH es mayor de 8, los protones se disocian para formar aniones bisilicatos como H_3SiO_4^- y $\text{H}_2\text{SiO}_4^{2-}$. Esta ionización y su consiguiente interacción con moléculas de agua mejoran la solubilidad del SiO_2 permitiendo que permanezca en solución a concentraciones más altas de las habituales (Martin, 2007). Cuando la concentración de ácido ortosilícico supera los 200 ppm éste va polimerizando a oligómeros o coloides menos biodisponibles, llegando a formar agregados y precipitados sólidos amorfos. Con el aumento de peso molecular y complejidad estructural disminuye la solubilidad en agua (Martin, 2013). Si bien el silicio se encuentra en la Tierra fundamentalmente formando parte de la arena y las rocas, también se encuentra en los organismos vivos, formando parte de estructuras como el esqueleto de las diatomeas (organismos unicelulares) y esponjas silíceas (organismos pluricelulares primitivos) así como los huesos de los animales superiores. Este silicio contenido en los seres vivos proviene de su absorción del componente terrestre y su mayor o menor absorción depende de la biodisponibilidad del mismo.

Uno de los aspectos de mayor controversia continúa siendo la biodisponibilidad de las diferentes formas de silicio. El ácido ortosilícico es la forma más biodisponible por su solubilidad y estabilidad en agua. Las formas hidratadas del ácido ortosilícico son el ácido metasilícico (H_2SiO_3), oligómeros como el ácido disilícico ($\text{H}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) y el ácido trisilícico ($\text{H}_2\text{Si}_3\text{O}_7$), y las correspondientes formas hidratadas es estas últimas, los ácidos pentahidrosilícico y piroxilícico (Jurkic y cols., 2013), todos ellos de bajo peso molecular. Por otra parte, se ha descrito que ciertas formas insolubles como el ácido silícico coloidal, sílica gel y zeolitas pueden liberar pequeñas cantidades de silicio soluble en los compartimentos biológicos aunque depende de las características fisicoquímicas específicas de cada molécula (Martin, 2013).

En conjunto puede afirmarse que debido a la gran variedad de estructuras que puede formar el silicio, existe todavía un elevado desconocimiento de su solubilidad en agua y por tanto de su biodisponibilidad para los seres vivos, lo que ha retrasado enormemente la investigación de sus efectos beneficiosos para la salud.

4.1.2. Ciclo biogeoquímico del Silicio

El ciclo biogeoquímico de un elemento es el proceso que asegura el recambio del mismo, haciéndole asequible en diferentes estados (sólido, líquido o gas) y formas. Entre otras, dicho ciclo describe los mecanismos por los que las formas biodisponibles de ese elemento son incorporadas a la biosfera y por tanto a los seres vivos. En relación a esa etapa, se ha observado que los ciclos más eficientes suelen ser aquellos que tienen una alta representación en la biosfera. Ejemplos de ello son el oxígeno, con un 24,9% en la biosfera y un 47,4% en la litosfera; o el carbono, nitrógeno y azufre, con

ciclos biogeoquímicos cortos con una mayor proporción en la biosfera que en la litosfera (Smil, 1997). El silicio, al contrario que los elementos citados, se encuentra en tan sólo un 0,03% en la biosfera, cantidad muy inferior al 27,7% presente en la litosfera. La consecuencia de este desbalance es un ciclo biogeoquímico muy largo con un recambio que se produce después de miles de millones de años.

El ciclo del silicio se divide en dos etapas claramente diferenciadas. La primera etapa correspondiente al ciclo terrestre incluye la fracción terrestre y las aguas continentales. En la litosfera el silicio principalmente se encuentra en forma de óxidos en combinación con otros metales, se encuentra embebido en formaciones de rocas geológicas de las que únicamente se libera por un proceso de erosión a partir del cual llega a las aguas continentales. Esta fase concluye con la llegada del silicio a la fracción marina comenzando con ello la segunda etapa o ciclo marino. En esta segunda etapa las diatomeas y las esponjas silíceas tienen un papel muy relevante e interesante. Cuando el silicio llega en forma de ácido silícico soluble al agua marina procedente de la erosión de las rocas es absorbido por las diatomáceas para formar su citoesqueleto (frústula). La absorción se realiza a través de un transportador silicio/sodio de estequiometría 1:1 (**Fig. 12**) (Thamatrakoln y Hildebrand, 2005; Curnow y cols., 2012).

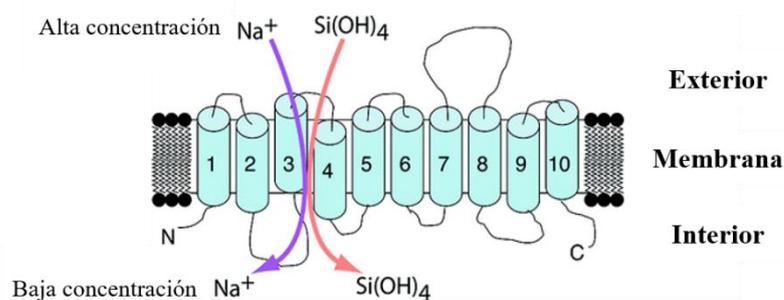


Figura 12. Transportador de silicio en diatomáceas adaptada de Curnow y cols. (2012).

Una vez absorbido, el silicio es procesado por estos organismos para formar su citoesqueleto mediante un proceso denominado biosilificación (del inglés *biosilification*) (Reincke y Barthel, 1997). Para poderse llevar a cabo es necesaria la participación de unas enzimas denominadas silicateínas responsables de la transformación de silicio inorgánico en biosílica (Schröder y cols., 2012). Una vez que el organismo muere, la frústula sedimenta en el fondo marino. La nueva reposición del silicio procedente del fondo marino a la fracción terrestre sólo acontece con la elevación de montañas del fondo marino o por un proceso de subducción, hecho que implica normalmente millones de años hasta que el silicio se reincorpora de nuevo a la etapa terrestre (Exley, 1998). Además del proceso de biosilificación de diatomeas y esponjas silíceas ya comentado, las plantas y los animales superiores también han desarrollado sus propios sistemas para incorporar silicio, aunque no han sido todavía totalmente dilucidados. Las plantas toman el silicio del suelo en forma de silicato de aluminio (Dahlgren, 1993). El silicio suele representar el 1% del peso seco de la planta, aunque en algunos casos alcanza el 10% del

peso seco. Los animales superiores toman el silicio del agua y de los alimentos principalmente los de origen vegetal.

Como consecuencia del ciclo biogeoquímico las fuentes terrestres de silicio son hoy mucho menores de lo que eran en el origen de la Tierra, y van a seguir reduciéndose a lo largo de los años. Hay otro factor que también ha contribuido al marcado descenso del silicio en aguas continentales. Antes de la aparición de los seres vivos en la Tierra la transformación de ácido silícico en sílice amorfa era mínima. Por ello, la concentración de ácido silícico en el agua era alta, del orden de milimolar, y se mantenía gracias a la erosión de las rocas terrestres. A partir de la aparición de los seres vivos y muy especialmente de las diatomeas, el ácido silícico comenzó a convertirse en sílice amorfo. Este proceso de condensación y polimerización del ácido silícico supone por tanto una pérdida neta de silicio disponible para la biosfera (Exley, 1998).

Dentro de las formas de silicio de la fracción terrestre el cuarzo es la más abundante. Se trata de una estructura cuyo proceso de erosión por reacción con el dióxido de carbono (CO_2) es muy lento. Parece que los fitolitos participan de forma muy activa en su intemperización (Meunier, 2003). Las reacciones de erosión de los minerales son dependientes de la concentración del producto de la reacción, en este caso el ácido silícico. Debido a la disminución de la concentración de ácido silícico por la transformación a sílice amorfa por los organismos vivos y su acumulación en la fracción marina, el proceso de erosión aumenta (Exley, 1998). Por todas estas causas, el ciclo biogeoquímico del silicio implica una deficiencia progresiva de silicio que conlleva grandes variaciones de la concentración de silicio en las aguas continentales a nivel global. Además, la concentración del silicio en el agua es también muy diferente entre unas zonas y otras ya que ésta depende de los procesos de erosión de las rocas que se encuentran en cada área (Birchall y Exley, 1992).

4.1.3. Consumo de Silicio

Existe evidencia de que la ingesta de silicio puede ejercer efectos beneficiosos sobre la salud, aunque aún no se han definido las ingestas de referencia. De hecho, muchos todavía no reconocen al silicio como un micronutriente esencial a pesar de que se encuentra a una concentración de 1-2 g en el cuerpo humano y no somos capaces de sintetizarlo (EFSA, 2004; Commission of the European Community, 1993). Se ha sugerido una dosis diaria mayor de 20-30 mg para un adulto de 70 kg (Boguszewska-Czubara y Pasternak, 2011). El comité de expertos en vitaminas y minerales estima un consumo máximo de 560 mg/día considerando como fuentes de silicio los alimentos, los suplementos y el agua de bebida (Expert group on vitamins and minerals, 2003). Asimismo, dicho Comité a partir de estudios de toxicidad realizados en animales, establece una ingesta máxima tolerable (UL) de 700 mg/día de silicio que equivale a 1500 mg/día de SiO_2 (EFSA, 2009). La dosis sin efecto adverso observado

(NOAEL) se sitúa, sin embargo, por encima de los 5000 mg/kg p.c. en humanos (Expert group on vitamins and minerals, 2003), de 2500 mg/kg p.c. en ratas y de 7500 mg/kg p.c. en ratones (Takizawa y *cols.*, 1988).

No se han encontrado datos publicados sobre el consumo de silicio en España, pero existen algunos estudios en diferentes países que permiten extrapolar una ingesta aproximada. La ingesta media de silicio de la población finesa es de 29 mg/día y la de la población belga de 19 mg/día (Van Dyck y *cols.*, 1999). Hay que destacar que en Inglaterra se han llevado a cabo numerosos estudios no sólo sobre la ingesta de silicio, sino también sobre la cantidad y biodisponibilidad de silicio de los diferentes alimentos (Jugdaohsingh y *cols.*, 2002; McNaughton y *cols.*, 2005; Powell y *cols.*, 2005). Consumiendo una dieta típica inglesa, la ingesta se encuentra entre 20 y 50 mg/día, lo que corresponde a 0,3-0,8 mg/kg de peso/día (Pennington, 1991; Bowen y Peggs, 1984). En Estados Unidos la ingesta es de 24 a 33 mg/día (Jugdaohsingh y *cols.*, 2002). Aunque el consumo de silicio en los diferentes países, o incluso en distintas zonas de un mismo país, es muy variable, se ha estimado que en general en la sociedad occidental la ingesta de silicio es aproximadamente de 20-50 mg/día (Aguirre y *cols.*, 2007). El consumo de silicio es mayor en hombre que en mujeres y que en ambos sexos disminuye con la edad (Jugdaohsingh y *cols.*, 2002). En países orientales como India y China, donde la dieta está basada en productos vegetales, la ingesta puede llegar hasta 200 mg de silicio al día (Jugdaohsingh y *cols.*, 2002).

4.1.4. La dieta como fuente de silicio

El aporte de silicio a través de la dieta se puede dividir en dos grandes bloques: el que aportan los alimentos, y el que aportan las bebidas. Por último, también deben considerarse como fuente de silicio los aditivos alimentarios y suplementos que se describirán también en este apartado.

El silicio se encuentra en mayor concentración en los alimentos de origen vegetal que en los de origen animal (Powell y *cols.*, 2005). Dentro de los primeros el silicio se encuentra mayoritariamente en los cereales integrales, hortalizas como las judías verdes y frutas como el plátano. Aunque el contenido de silicio en este tipo de alimentos es alto, su biodisponibilidad en la mayoría de ellos es muy baja. Esto se debe a que el silicio suele estar en forma de polímeros o especies coloidales que tienen que convertirse en las formas monoméricas para poder absorberse (Robberecht y *cols.*, 2009). Por ello y de forma didáctica, se ha establecido que generalmente la biodisponibilidad del silicio procedente de los alimentos es inversamente proporcional a la concentración a la que se encuentra en los mismos. No obstante, son precisamente los alimentos con mayor contenido de silicio los que más contribuyen al aporte de silicio, a pesar de que su grado de absorción sea reducido (Robberecht y *cols.*, 2009). El consumo de productos derivados de granos incluyendo cereales, harinas, pastas, masas, hojaldres y arroz (no integral) contribuyen en un 14% a la ingesta total de silicio, mientras las hortalizas contribuyen un 8%

(Pennington, 1991). Si nos centramos en la dieta tipo occidental, la mayor fuente de silicio son los cereales (30%), seguidos de frutas, y hortalizas (Mancinella, 1991). Sin embargo, el aporte de silicio de una dieta rica en fibra es aproximadamente el doble que el de una dieta pobre en fibra (Robberecht y cols., 2009). Se debe tener en cuenta que, durante el procesamiento y refinado de los granos, parte del silicio es eliminado y por tanto suponen un aporte menor.

Respecto a las bebidas, el silicio se encuentra en el agua, café y cerveza. El consumo de estas bebidas supone más de un 55% de la ingesta total de silicio (Pennington, 1991). La cerveza por su contenido en cebada y lúpulo, es la fuente mayoritaria de silicio con concentraciones entre 9 y 39mg/L (Bellia y cols., 1994; Sripanyakorn y cols., 2004). El contenido de silicio en el agua de abastecimiento varía desde 1 hasta 100mg/L en función de la presencia de silicio en el terreno por el que discurre dicha agua. Son especialmente ricas las aguas minerales procedentes de manantiales y pozos situados en zonas geográficas con abundante silicio (Barnett y cols., 1969). En el Reino Unido las concentraciones de silicio son menores de 2,5 mg/L en el norte y en el oeste, pero superan los 14 mg/L en el sur y en el este del país (Dobbie y Smith, 1982; Taylor y cols., 1995). En las principales ciudades de Francia la concentración de silicio se encuentra entre 4 y 11mg/L. En Estados Unidos la cantidad está entre 18 y 20 mg/L. En el caso de las aguas embotelladas la cantidad de silicio varía de 8 a 36 mg/L. Sin embargo, en algunos casos como en aguas embotelladas procedentes de Malasia o Islas Fiyi, debido principalmente a la abundancia de rocas volcánicas en dichos países, el silicio se encuentra en concentraciones de 40 mg/L y 85 mg/L, respectivamente (Martin, 2013).

El silicio también se emplea como aditivo alimentario en la industria alimentaria. Suele añadirse al alimento durante las etapas de procesamiento, manufacturado o distribución formando parte de agentes antiaglomerantes, espesantes, estabilizantes y clarificantes (Villota y cols., 1986). Sin embargo, en estos aditivos el silicio se encuentra en forma de silicatos considerados muchos de ellos de difícil absorción, especialmente las formas poliméricas o el SiO₂ amorfo. Por ello, la biodisponibilidad de estos aditivos es muy limitada. Por último, los suplementos de silicio constituyen una fuente alternativa ya que contienen ácido ortosilícico u otras formas fácilmente solubles en agua y por tanto de más fácil absorción (Van Dick y cols., 1999; Barel y cols., 2005).

4.1.5. Biodisponibilidad de las diferentes formas de Silicio

La concentración de silicio en los diferentes alimentos, bebidas o suplementos reviste importancia y ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la cantidad de silicio de los alimentos no siempre se corresponde con la cantidad absorbida ya que la biodisponibilidad del silicio depende de la forma química en la que se encuentre. Por ello se han llevado a cabo estudios que determinan la cantidad de silicio

absorbida en función de la fuente de silicio que se consuma. El silicio en forma de ácido silícico se absorbe entre un 20 y un 75% (Burns y cols., 2003).

Sripanyakorn y cols. (2009) compararon la absorción y excreción de las principales formas de silicio que se aportan a los organismos vivos bien a través de la dieta o como suplementos. Incluyeron ácido ortosilícico, monometilsilanotriol, cerveza sin alcohol, plátanos, judías verdes, ácido ortosilícico estabilizado con colina, sílice coloidal y un silicato de magnesio. El porcentaje de la dosis ingerida de silicio que es excretada en orina fue muy elevado en el caso de la cerveza sin alcohol y el monometilsilanotriol (64%) seguido del de las judías verdes (44%), ácido ortosilícico (43%), ácido ortosilícico estabilizado con colina (17%), plátanos y silicato de magnesio (4%) y por último de la sílice coloidal (1%). Los plátanos y el silicato de magnesio fueron los que provocaron menores aumentos de silicio en sangre después de su ingestión.

Para conocer si existen otros factores, además de la forma de silicio consumida, que influyan potencialmente en la absorción y excreción de silicio procedente de la dieta, se ha llevado a cabo un estudio con 26 pacientes. Jugdaohsingh y cols. (2013) concluyeron que ni la edad, ni el sexo, ni el nivel de estrógenos afectaban la absorción y excreción del mineral. Según Popplewell y cols. (1998), aproximadamente, el 75% del silicio plasmático es eliminado por la orina en un periodo de 3 a 8h desde la ingestión.

4.1.6. Niveles de Silicio en los tejidos

El silicio es el tercer elemento traza más abundante en el cuerpo humano después del hierro y el zinc (Bisse y cols., 2005; Sripanyakorn y cols., 2005) y está presente en todos los tejidos (Jugdaohsingh y cols., 2013). En algunos estados patológicos se ha observado un descenso en los niveles de silicio en los tejidos (Bisse y cols., 2005). En mamíferos, la concentración de silicio varía entre 1-10 µg/g, por tanto, asumiendo una distribución similar en todos los tejidos se puede extrapolar que el contenido total de silicio en un adulto de 70 kg puede variar entre los 70 y los 700 mg (Carlisle, 1984). Se ha observado también que la cantidad de silicio en los tejidos aumenta cuando se consumen suplementos (Pruksa y cols., 2014). La concentración más alta de silicio se ha encontrado en estructuras ricas en tejido conectivo, como la arteria aorta, pero también en la tráquea, huesos y piel (Popplewell y cols., 1998; Jugdaohsingh, 2007; Jugdaohsingh y cols., 2008). La cantidad de silicio en hígado, corazón, músculo y pulmones es de cuatro a cinco veces más baja (Boguszewska-Czubara y Pasternak, 2011).

Los niveles séricos de silicio son similares a los de otros elementos traza y parecen dependientes de la edad y el sexo. Con las primeras técnicas analíticas se describieron concentraciones plasmáticas de silicio del orden de 50–60 µg/dL (Dobbie y Smith, 1982; Carlisle, 1984). Más recientemente, dependiendo de la población estudiada y el método analítico utilizado, se han definido niveles entre 11 y

31 µg/dL (Bisse y cols., 2005). Se han realizado numerosos estudios para establecer valores de referencia de silicio plasmático. Bisse y cols. (2005) en población alemana sana observaron que las concentraciones plasmáticas de silicio varían en función de la edad y el sexo. Destacan especialmente el descenso de las concentraciones de silicio observados en mujeres post-menopáusicas respecto a pre-menopáusicas, por lo que la disminución de estos niveles parece estar relacionada con mecanismos hormonales. Van Dyck y cols. (2000) analizaron concentraciones plasmáticas de silicio en la población belga. Los niños menores de un año presentaron unas concentraciones de silicio más altas que los adultos. De nuevo se observa la pérdida de silicio con la edad. También es destacable la baja concentración de silicio en mujeres embarazadas en comparación con mujeres no gestantes de la misma edad. Una posible explicación a estos resultados es la transferencia materno-fetal de grandes cantidades de silicio para garantizar el desarrollo de tejidos. Estos autores realizaron una comparación entre sus resultados y los obtenidos en otros estudios llevados a cabo en diferentes países. Las concentraciones de silicio encontradas fueron similares en todos los estudios. Llama especialmente la atención que en un estudio realizado por Huang (1995) en la población china, los niveles de silicio no fueran significativamente más elevados que los encontrados en la población occidental, a pesar de que la ingesta diaria de silicio fuera casi diez veces más alta entre los orientales.

4.1.7. Efectos tóxicos

Los efectos tóxicos del silicio, aparecen como consecuencia a una exposición ambiental normalmente involuntaria, y son generalmente provocados por la inhalación de sílice cristalina y asbestos de sílice procedente de fábricas donde se procesa este elemento. El silicio es reconocido como carcinógeno pulmonar por silicosis y asbestosis después de una exposición prolongada a material en suspensión (Mossman y Churg, 1998; Freire y cols., 2013)

Entre las enfermedades relacionadas con el silicio destaca la silicosis, una enfermedad pulmonar causada por la inhalación continua de polvo de minerales que contienen sílice. Se caracteriza por fibrosis progresiva y reducción crónica de la capacidad pulmonar. La asbestosis tiene una etiología y patología similares a la silicosis, pero se diferencia de ella en el tipo y tiempo de exposición (Pollard, 2016).

Además de los efectos debidos a la inhalación de partículas de silicio se han descrito algunos efectos tóxicos debidos a nanopartículas de silicio. En estos casos el tamaño de las nanopartículas parece un factor crucial en el proceso de toxicidad. Shim y cols. (2014) observaron que las nanopartículas de SiO₂ eran capaces de unirse a proteínas de la sangre y de un homogenado de cerebro provocando la pérdida de su funcionalidad.

4.2. El silicio y sus beneficios potenciales sobre la salud

Considerando su abundancia en la naturaleza, se ha especulado que el silicio presenta beneficios para la salud. Se piensa que tiene funciones específicas tanto bioquímicas como biológicas, aunque aún no se han encontrado evidencias determinantes (Martin, 2013), desconociéndose todavía muchos de los mecanismos que pueden estar implicados en tales efectos (Birchall, 1995). Por todo ello en las últimas décadas se ha observado un creciente interés sobre los efectos a nivel de salud y el potencial terapéutico de las diferentes formas biodisponibles de silicio.

Los principales efectos contrastados del silicio están relacionados con la mineralización ósea, disminución del riesgo de CVD y de enfermedades neurodegenerativas (Jurkic y cols., 2013). Además, se ha descrito la implicación activa del silicio en la prevención del envejecimiento de la piel. Barel y cols. (2005) llevaron a cabo un estudio aleatorizado en mujeres entre 40 y 65 años con claros síntomas de envejecimiento. El tratamiento oral durante 20 semanas con ácido ortosilícico estabilizado con colina produjo frente a placebo una mejoría significativa de la epidermis y de sus propiedades mecánicas. Se observaron también efectos en el pelo y las uñas de las pacientes. Entre los mecanismos responsables de tales efectos se propuso la estimulación en la producción de colágeno y glucosaminoglicanos promovida por el consumo oral de ácido ortosilícico.

La habilidad del silicio para actuar como inmunomodulador ha sido demostrada por varios autores (Antonini y cols., 2000; Koo y cols., 2006; Yoo y cols., 2001). La exposición subcrónica a sílice cristalina estimula la respuesta inmune en los pulmones. Provoca un aumento de neutrófilos, células *natural killer* (NK) y linfocitos T (Antonini y cols., 2000). En otros estudios se ha empleado un agua mineral aniónica básica denominada Borodon® en caballos (Koo y cols., 2006) y cerdos (Yoo y cols., 2001). Se detectó un aumento de linfocitos T en sangre y órganos linfáticos secundarios de estos animales. Aunque no se conoce el mecanismo concreto, el efecto ha sido directamente atribuido al contenido en silicato de sodio (60% del contenido total) del agua mineral.

4.2.1. Mineralización y salud ósea

Sin duda una de las funciones potenciales del silicio, estudiada desde la década de los setenta, es la mineralización ósea. Este aspecto ha sido la principal causa para que comenzara el debate sobre si el silicio debía considerarse un micronutriente esencial o no. Existen hasta la fecha un gran número de artículos en relación a los efectos tanto de la deprivación (Schwarz y Milne, 1972; Carlisle, 1972) como de la suplementación de silicio (Schiano y cols., 1979) a nivel óseo. Incluso se encuentran en la literatura importantes revisiones dónde se trata únicamente este aspecto del silicio (Jugdohsignh, 2007; Rodella y cols., 2014). Sin embargo, dado que la mineralización y salud ósea no son objeto de estudio en la presente tesis, sólo se comentarán brevemente los principales descubrimientos.

Los primeros estudios de privación de silicio llevados a cabo en animales pusieron de manifiesto la aparición de alteraciones óseas y disfunción del tejido conectivo (Schwarz y Milne, 1972; Carlisle, 1972; Carlisle, 1976; Carlisle, 1980). Por otra parte, la suplementación con silicio redujo el riesgo de osteoporosis, aumentando la densidad mineral ósea (Schiano y cols., 1979; Eisinger y Clairet, 1993). Además, el silicio mejoró las propiedades mecánicas del hueso al compensar el balance entre aparición y resorción ósea (Maehira y cols., 2009). El silicio es capaz de inducir la síntesis de osteocalcina y la actividad fosfatasa alcalina en osteoblastos, lo que se traduce en formación ósea (Reffitt y cols., 2003). Al parecer en las mujeres existe una interacción entre los estrógenos y el silicio para proteger la salud ósea (Macdonald y cols., 2012). Además, se cree que el silicio necesita la presencia de vitamina K como cofactor nutricional adicional para poder llevar a cabo sus efectos beneficiosos (Jugdaohsingh y cols., 2008).

Además, en estudios de cohortes en Estados Unidos y en Inglaterra se observó una relación entre el consumo de silicio y la densidad mineral ósea, poniendo de manifiesto la importancia de una dieta rica en silicio (Jugdaohsingh y cols., 2004). Por todo ello, se considera que el silicio, como suplemento o procedente de la dieta, puede garantizar el balance óseo y como consecuencia reducir el riesgo de osteoporosis (Landis y cols., 1986). De hecho, un estudio de Jugdaohsingh y cols. (2013) ha demostrado que la concentración de silicio en los huesos está relacionada con el consumo de silicio de la dieta.

4.2.2. Neuroprotección con especial implicación en la Enfermedad de Alzheimer

El efecto neuroprotector del silicio ha sido ampliamente estudiado, pero siempre ligado a su capacidad para disminuir los niveles de aluminio en el organismo (Martin, 2013). La idea de que el silicio pudiera afectar a los niveles de aluminio en el organismo surgió a partir de las interacciones silicio - aluminio observadas en las reacciones inorgánicas (Boguszewska-Czubarra y Pasternak, 2011). Por otra parte, un estudio realizado por Rondeau y cols. (2009) analizó en 1925 pacientes ancianos la asociación entre la exposición a aluminio o silicio del agua y el riesgo de pérdida cognitiva, demencia y EA. Un aumento de 10 mg de silicio al día redujo significativamente el riesgo de demencia.

La patogénesis molecular de la EA incluye muchos factores de riesgo entre los que destacan la deposición extracelular de β -amiloide, la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares, daño por estrés oxidativo, y activación de la cascada inflamatoria (Chopra y cols., 2011). Aunque continúa siendo objeto de debate, el aluminio parece jugar un papel crucial en la oligomerización del β -amiloide y su concentración aumenta en el cerebro de pacientes con EA y enfermedad de Parkinson (Kawahara y Negishi, 2011). Además, se ha demostrado que el aluminio, a pesar de ser un metal activo no formador de radicales libres, contribuye al estrés oxidativo al aumentar la generación de ROS. En conjunto los estudios claramente indican que el aluminio promueve el estrés oxidativo provocando la muerte neuronal

(Gupta y cols., 2005). Algunos estudios epidemiológicos sugieren que el silicio puede tener un papel protector contra el daño del aluminio reduciendo la absorción intestinal del aluminio y/o aumentando su excreción (Gillette-Guyonnet y cols., 2007; Edwardson y cols., 1993), evitando así su deposición y acumulación dentro del cerebro. Según estos estudios solo la forma oligomérica de silicio, no la monomérica, puede prevenir la absorción de aluminio a nivel gastrointestinal. Esta hipótesis refuerza la importancia de la forma química en la que se administra el silicio (Jugdaohsingh y cols., 2000). Este elemento traza reacciona con el aluminio formando complejos; de hecho, los aluminosilicatos son los silicatos más prevalentes en la naturaleza.

La concentración relativa de aluminio y silicio en el agua de bebida es importante para determinar el beneficio o detrimento en relación al riesgo de EA (Seaborn y Nielsen, 1994). Así se observan grandes diferencias entre las aguas blandas, pobres en silicio y con mayor contenido de aluminio, y las aguas duras, con mayor contenido en silicio y menor en aluminio (Taylor y cols., 1995). Exley y cols. (2006) demostraron que el consumo durante 5 días de un agua mineral rica en silicio redujo significativamente los niveles generales de aluminio en el organismo, presumiblemente por una reducción en la absorción de aluminio como apoyan las menores concentraciones de aluminio en orina. Estos autores proponen basándose en estos resultados el uso de suplementos de silicio como terapia no invasiva para reducir los depósitos de aluminio en pacientes de EA. Davenward y cols. (2013) observaron que el consumo de al menos 1 L/día de agua mineral rica en silicio durante 12 semanas promovió la excreción urinaria de aluminio sin aumentar la excreción de micronutrientes como cobre y hierro (Davenward y cols., 2013).

En un estudio con ratones intoxicados con aluminio, González-Muñoz y cols. (2008a) observaron que el consumo de cerveza y de ácido ortosilícico redujo no sólo los niveles de aluminio en el cerebro, sino también el estrés oxidativo cerebral causado por la toxicidad del aluminio, a través de modular la expresión de genes pro-inflamatorios y enzimas antioxidantes (González-Muñoz y cols., 2008b). En otro estudio realizado con cerveza se encontró un aumento en la excreción urinaria de aluminio. Bellia y cols. (1996) atribuyeron este resultado a la interacción entre aluminio y silicio formando hidroxialuminosilicatos y evitando con ello la reabsorción de aluminio y por tanto la toxicidad potencial de este mineral.

La habilidad del silicio para disminuir la toxicidad del aluminio ha sido, sin embargo, objeto de amplia controversia (Drüeke y cols., 1997; King y cols., 1997). Una posible razón es que el ácido ortosilícico, empleado en dichos estudios, tiene baja afinidad por el Al^{3+} como demostraron posteriormente Farmer y Lumsdon (1994). Jugdaohsingh y cols. (2002) concluyeron que para que el aluminio y el silicio se unan formando complejos es necesario que al menos uno de los dos elementos se encuentre en forma polimérica.

4.2.3. Reducción del riesgo de aterosclerosis, enfermedades vasculares y Diabetes Mellitus

También se ha reconocido por estudios tanto bioquímicos como epidemiológicos al silicio como elemento traza protector de aterosclerosis. El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes de las ECV. Como se ha discutido, con la edad acontecen reducciones en la concentración de silicio, lo cual parece a su vez contribuir a enfermedades crónicas como la aterosclerosis. Como se ha indicado anteriormente, la mayor concentración de silicio en el organismo se encuentra en el tejido conectivo y elástico, especialmente en la aorta y otras grandes arterias, donde actúa como un agente estabilizador del colágeno fortaleciendo la vasculatura (Schwarz, 1977; Schwarz y cols., 1977). En la génesis de la aterosclerosis se ha detectado un descenso de los niveles de silicio en la pared arterial (Loeper y Lemaire, 1966; Loeper y cols., 1977), especialmente acusado en la fase inicial del desarrollo de la placa de ateroma, lo cual podría indicar que la deficiencia de silicio causa un debilitamiento inherente de las paredes de los vasos sanguíneos. Con el fin de comprobar este efecto y evaluar el mecanismo se han llevado estudios en varios modelos animales, algunos de los cuales comentaremos de forma resumida a continuación.

Trincă y cols. (1999) evaluaron el efecto antiateromatoso del silicio en conejos alimentados con dieta aterogénica suplementada o no con silicato de sodio. En el grupo con silicio los niveles de lípidos totales, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos permanecieron en valores normales. En un estudio posterior la administración de silicio en conejos, tanto por vía oral como intravenosa inhibió la aparición de placas de ateroma inducida por una dieta aterogénica, descendiendo el número de placas y los lípidos en ellas depositados. El mecanismo propuesto está relacionado con la preservación de la arquitectura elástica de los vasos, y la menor acumulación de lípidos en la íntima (Loeper y cols., 1979).

Öner y cols. (2006) demostraron en ratas que el silicio de la dieta modifica la dilatación endotelial de anillos de aorta ejercida por relajantes endoteliales y atenúa la respuesta del músculo liso al óxido nítrico.

En relación a la prevención de ECV, hay evidencias de que el silicio es capaz de disminuir los niveles plasmáticos de colesterol debido principalmente a un descenso en las fracciones de VLDL y LDL (Wachter y cols., 1998; Peluso y Schneeman, 1994). Maehira y cols. (2011) compararon los efectos del silicio soluble e insoluble en ratas hipertensas. Después de 8 semanas de tratamiento observaron un descenso de la presión sistólica con las dos formas de silicio.

Por último, la relación silicio y ECV ha sido demostrada en estudios epidemiológicos. En Estados Unidos se observó una elevada incidencia de muertes súbitas, enfermedades cerebrovasculares, hipertensión arterial y enfermedad coronaria en zonas de consumo de aguas blandas. Se investigó el posible efecto protector del calcio, magnesio, manganeso y silicio presentes en aguas duras (Tubek, 2006).

El silicio también parece tener efectos beneficiosos en relación a la DM. Se ha observado que los micronutrientes pueden regular el metabolismo y la expresión de genes asociados con la glucemia

influyendo así al desarrollo y progresión de la DM (O'Connell, 2001). Oschilewski y cols. (1985) observaron en un estudio en ratas BB propensas a síndrome metabólico que la administración de silicio inhibió casi por completo el desarrollo de diabetes. Atribuyeron dicho efecto a un descenso en la infiltración de macrófagos en los islotes de Langerhans. En otro estudio con ratones susceptibles a hiperleptinemia, hiperinsulinemia e hiperlipemia, la administración de silicio mostró efectos antidiabéticos promoviendo reducción de la glucosa en sangre, aumento de sensibilidad a la insulina, además de una mejora en la respuesta a leptina y adiponectina (Maehira y cols., 2011).

Todos estos resultados tan prometedores sugieren la clara necesidad de investigar los efectos de las diferentes aplicaciones terapéuticas del silicio para la prevención y manejo de la DM (Martin, 2013).

4.2.4. Efecto antioxidante del Silicio

Las propiedades antioxidantes del silicio han sido estudiadas de forma detallada en gran variedad de especies vegetales sometidas a diferentes situaciones de estrés. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto de la suplementación de silicio en situaciones de exceso de sal en cebada (Liang, 1999; Liang y cols., 2003) y pepino (Zhu y cols., 2004). Otros estudios se han centrado en el efecto antioxidante del silicio en trigo en situaciones de sequía (Gong y cols., 2005; Tale Ahmad y Haddad, 2011). Todos estos autores atribuyen los beneficios del silicio al aumento en la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes estudiadas. Además, algunos detectan una disminución en los niveles de lipoperóxidos (LPO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Estos estudios sobre la actividad antioxidante del silicio, tan frecuentes en plantas, son mucho más escasos en mamíferos. González-Muñoz y cols. (2008b) demostraron un aumento de la expresión de enzimas antioxidantes cerebrales en ratas tratadas con aluminio y silicio, aunque estos autores lo atribuyen en parte a la disminución del contenido en aluminio. En otro estudio realizado en células sanguíneas de voluntarios sanos se describe la capacidad del tratamiento con cerveza no sólo para reducir la toxicidad debida a los ROS, sino también para reducir su formación. Sin embargo, los autores no relacionan el contenido de silicio con este efecto (Winkler y cols., 2006). Por último, Kim y cols. (2013) observaron una gran capacidad antioxidante del silicio que evaluaron *in vitro* mediante la técnica del 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

5. Importancia de la dieta en las enfermedades crónicas

Los estudios epidemiológicos sobre la relación entre los hábitos alimentarios y el riesgo de padecer una enfermedad han demostrado que la dieta tiene un impacto importante sobre la salud (Cilla y cols., 2013). Así mismo una dieta desbalanceada se considera un factor de riesgo clave de las enfermedades

crónicas relacionadas con la edad. En particular la dieta occidental rica en AGS y pobre en fibra se asocia con un mayor riesgo de patologías crónicas (Cilla y cols., 2013).

En las recomendaciones para la prevención de la mayoría de enfermedades crónico-degenerativas destaca la importancia de la calidad de la dieta y de un estilo de vida saludable, que contribuyen claramente a una disminución de la prevalencia de este tipo de patologías (Sánchez-Muniz y cols., 2013; Sánchez-Muniz y Sanz-Pérez, 2015, 2016). Desafortunadamente los hábitos alimentarios son muy difíciles de modificar ya que afectan a costumbres muy afianzadas tanto a nivel individual como poblacional. Los alimentos funcionales constituyen una estrategia eficaz en la prevención y tratamiento de las enfermedades degenerativas ya que permiten mejorar la calidad de la dieta sin necesidad teóricamente de modificar los hábitos alimentarios en gran medida. Los consumidores se inclinan actualmente por las versiones más saludables de sus productos favoritos en vez de disminuir el consumo de los mismos para cumplir lo aconsejado en las guías nutricionales (Canham, 2014).

5.1. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales se encuentran dentro de la categoría de nuevos alimentos y se diseñan específicamente para producir efectos beneficiosos para la salud. Se consideran alimentos funcionales todos aquellos que demuestren científicamente un efecto positivo sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas (Ashwell, 2002). Dichos efectos beneficiosos se deben conseguir con un consumo normal de ese alimento dentro de una dieta equilibrada (Diplock y cols., 1999).

Existen diferentes estrategias a la hora de diseñar un alimento funcional. Las principales quedan recogidas en la **figura 13**.

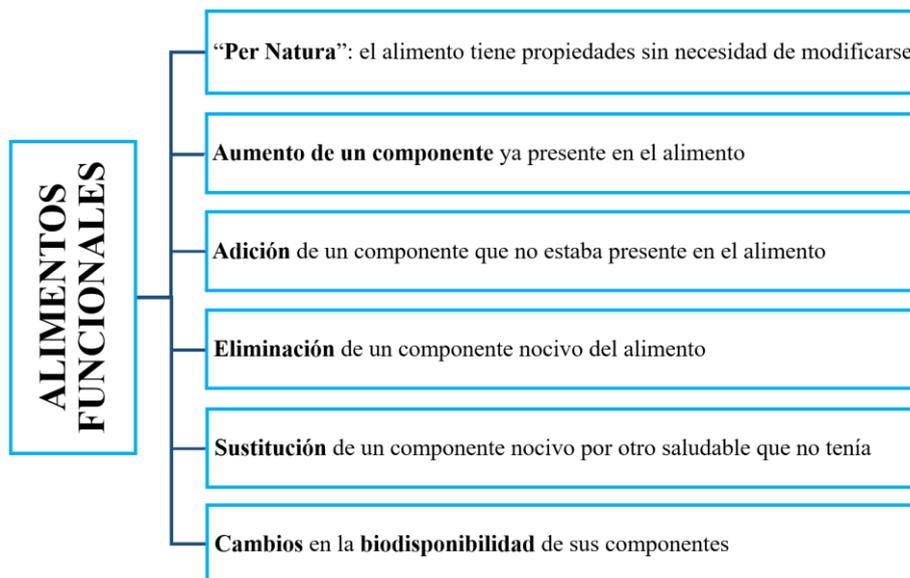


Figura 13. Estrategias disponibles a la hora de diseñar un alimento funcional. Modificado de Sánchez-Muniz, (2004, 2005).

La buena aceptación de los alimentos funcionales por parte de los consumidores se debe en gran medida a la evolución del concepto de nutrición a lo largo del tiempo. En las dos últimas décadas hemos pasado de una nutrición adecuada, aquella que primaba el abastecimiento suficiente y seguro de alimentos para sobrevivir, a una nutrición óptima dirigida a mejorar el bienestar físico y mental y reducir factores de riesgo de patologías crónicas. En este sentido, la calidad de la ingesta viene determinada tanto por los nutrientes de los alimentos como por los compuestos no nutrientes que tienen impacto sobre la salud (Sanchez-Muniz, 2005).

5.2. La carne como matriz para el diseño de alimentos funcionales

El consumo de carne y derivados ha sufrido un destacado aumento, paralelo al grado de desarrollo de nuestro país. Este hecho conlleva repercusiones tanto culturales como nutricionales (Carbajal-Azcona, 2004; Estudio ENIDE, 2011; Celada y cols., 2016a; Celada y Sánchez-Muniz, 2016). La carne está constituida mayoritariamente por agua (65-80%), proteínas (16-22%), en su mayoría de alto valor biológico, y pequeñas cantidades de otros compuestos nitrogenados, grasas (2-13%), hidratos de carbono, minerales y vitaminas. Como en otros alimentos existen diversos compuestos que, en determinadas circunstancias y en proporciones inadecuadas, pueden afectar negativamente a la salud humana (Jiménez-Colmenero y cols., 2010; Sánchez-Muniz, 2004; Sánchez-Muniz, 2005).

La ingesta excesiva de carne se ha relacionado con un aumento del riesgo cardiovascular y otras enfermedades degenerativas debido principalmente al contenido en AGS (Celada y cols., 2016a; Celada y Sánchez-Muniz, 2016). Por ello, los objetivos nutricionales recomiendan un menor consumo de cárnicos

con alta proporción de materia grasa. Sin embargo, estas recomendaciones podrían modificarse si se potencian las cualidades positivas de la carne, y se disminuyeran las negativas, lo que podría relacionarse con el concepto de alimento funcional (Sánchez-Muniz, 2005). Debido a la diversidad de productos cárnicos que existen en la actualidad, los cárnicos “funcionales” están muy presentes en un mercado emergente de alimentos con “valor añadido” (Jiménez-Colmenero y cols., 2007; Jiménez-Colmenero y cols., 2010; Olmedilla y cols., 2013).

De las diferentes estrategias que se pueden emplear en la obtención de un cárnico funcional destacan las modificaciones cualitativas y cuantitativas, con las que se pretende sustituir componentes endógenos de la carne por ingredientes exógenos, limitando la concentración de compuestos con efectos fisiológicos adversos e incrementando a su vez la concentración de aquellos con efectos beneficiosos (Jiménez-Colmenero, 2000; Jiménez-Colmenero y cols., 2001; Jiménez-Colmenero, 2007; Sánchez-Muniz, 2004; Jiménez-Colmenero y cols., 2010). Nuestro grupo de investigación lleva tiempo realizando estudios con diferentes productos cárnicos funcionales con el objetivo de demostrar sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud tanto en modelos animales como en individuos sanos. Los principales ingredientes funcionales incluidos han sido: nuez, algas, glucomanano y espirulina, y antioxidantes.

Entre las ventajas de la carne como matriz para diseñar alimentos funcionales se encuentra en primer lugar el elevado consumo de este alimento, muy por encima de los objetivos nutricionales. Debido a la dificultad que entraña el cambiar los hábitos alimenticios la obtención de cárnicos funcionales permitiría contrarrestar los efectos negativos derivados del elevado consumo de carne. Además, en el mercado se ofertan muchos tipos diferentes de productos cárnicos y derivados cárnicos que facilitan el diseño de alimentos funcionales a partir de las diferentes estrategias. Por todo ello ya contamos actualmente con numerosos productos cárnicos reformulados en los que se ha modificado considerablemente su composición para optimizar la presencia de ciertos componentes. Asimismo, en muchos de ellos se ha introducido un ingrediente funcional no cárnico con una actividad biológica demostrada (Jiménez-Colmenero y cols., 2010; Sánchez-Muniz y cols., 2012; Schultz y cols., 2013; Delgado-Pando y cols., 2014; González-Torres y cols., 2015; Celada y cols., 2015; Celada y cols., 2016b).

5.3. Evaluación de los alimentos funcionales

Para que un alimento pueda considerarse funcional y se puedan incluir alegaciones en su etiquetado es necesario demostrar científicamente y de manera objetiva las propiedades sobre la reducción del riesgo de padecer una enfermedad o sobre la mejora de la salud. Para poder llevar a cabo dicha investigación científica es muy importante seleccionar parámetros biológicos que permitan valorar adecuadamente los cambios potenciales producidos por el alimento. Generalmente son marcadores que aparecen modificados en una situación patológica respecto a sus niveles fisiológicos (Olmedilla-Alonso y cols., 2013).

5.4. El silicio como ingrediente funcional

Las características del silicio y sus diferentes formas, así como sus efectos han sido previamente descritos en el bloque 1 de la presente introducción. El silicio es ya reconocido por la comunidad científica como micronutriente esencial y si finalmente se fija sus ingestas de referencia, es previsible que en los próximos años aumente la comercialización de suplementos de silicio (Anderson y cols., 2003). La inclusión de silicio en diferentes alimentos como ingrediente funcional puede ser, por tanto, una estrategia interesante y eficaz para conferir sus propiedades a matrices que no las presentan, y asegurar el nivel óptimo de consumo de este elemento traza.

Uno de los aspectos más importantes para emplear una sustancia como ingrediente funcional es demostrar su perfil de seguridad. Ya que el silicio ha sido ingerido como aditivo alimentario durante décadas (Canham, 2014) por su uso como agente antiaglomerante, espesante, estabilizante y clarificante en la industria alimentaria (Villota y cols., 1986), su seguridad está garantizada. El silicio amorfo de calidad alimentaria (E551) en sus diferentes presentaciones (micronizado, precipitado, gel o sílice coloidal) tiene el estado GRAS (*generally recognized as safe*) de la Food and Drug Administration (FDA) (Canham, 2014).

Otra característica a tener en cuenta a la hora de seleccionar un ingrediente funcional es su color y características organolépticas, así como la posibilidad de modificar las de la matriz en la que se va a incluir. El silicio se solubiliza en mayor medida en el intestino que en el estómago, lo que evita que confiera un sabor desagradable al alimento (Canham, 2014). No obstante, los efectos que impliquen cambios en neurotransmisores y otras sustancias como cannabinoides y endorfinas son desconocidos. Además, el aditivo E551 micronizado es de color blanco lo que facilita su enmascaramiento en la matriz sin apenas modificar el color de la misma. Shabir y cols. (2012) concluyen que desde un punto de vista organoléptico el silicio es aceptado a concentraciones moderadas cuando se añade en forma de micropartículas a diferentes alimentos.

Dado que el contenido de silicio en la carne es muy reducido, su inclusión como ingrediente para formular un cárnico funcional podría ser interesante. Las propiedades beneficiosas del silicio a nivel de ECV y DM2 pueden contrarrestar los efectos nocivos atribuidos a un elevado consumo de carne en esos pacientes; sobre todo si la carne y derivados cárnicos forman parte de una dieta variada y rica a su vez en productos vegetales con alto contenido en compuestos bioactivos (Celada y Sánchez-Muniz, 2016; Celada y cols., 2016a).

INTERÉS DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS

El silicio es un micronutriente esencial que ha demostrado tener efectos beneficiosos para la salud. Existen grandes diferencias en su distribución entre unas zonas geográficas y otras, provocando diferencias en la concentración de silicio en las aguas de abastecimiento. Este hecho, sumado a los hábitos alimentarios característicos de cada región hace que el consumo de silicio sea muy variable, especialmente si se compara oriente y occidente. Se han detectado también diferencias en el consumo de silicio entre ambos sexos. Al no haberse establecido todavía un valor de referencia para el silicio no se pueden identificar aquellos grupos de población con un consumo que no garantice sus efectos positivos sobre la salud. Por esta misma causa, actualmente el consumo de suplementos de silicio no es una práctica habitual.

En líneas generales, los hábitos alimentarios típicos de los países occidentales proporcionan pocos alimentos de origen vegetal, lo que conlleva una ingesta baja de silicio. Además, debido a su ciclo biogeoquímico las concentraciones de silicio en el agua de abastecimiento y en los alimentos de origen vegetal van a ser progresivamente menores. Por todo ello, la necesidad de suplementar el silicio en la dieta parece previsible, particularmente cuando se fije el valor de referencia de este micronutriente. El diseño de alimentos funcionales que contengan silicio como ingrediente funcional puede ser una estrategia de gran utilidad para aumentar su consumo sin necesidad de modificar los hábitos alimentarios de la población. El uso extendido de silicio como aditivo alimentario garantiza la seguridad de este elemento, y facilita su incorporación en matrices de diferentes características. La carne, con un consumo muy elevado en los países occidentales, se ha empleado como matriz de alimentos funcionales ya que por sus características permite una fácil incorporación de nuevos ingredientes. Los cárnicos funcionales han demostrado efectos beneficiosos en modelos experimentales de rata al mejorar algunos marcadores importantes de ECV y DM2.

Por otra parte, la revisión bibliográfica de los efectos del silicio a nivel de salud demuestra su participación activa en las principales enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con la edad (osteoporosis, EA, ECV, y DM2). Es precisamente en los ancianos dónde se han registrado las menores concentraciones plasmáticas de silicio, debido a la disminución de la concentración plasmática de silicio con la edad, presentando este grupo por ello una menor protección ante dichas enfermedades. Los efectos neuroprotectores del silicio, junto con su papel a nivel de salud ósea, han sido los más estudiados. Sin embargo, su capacidad para reducir el riesgo de EA se ha atribuido exclusivamente a su habilidad para limitar la absorción de Al, y aumentar su excreción, disminuyendo los niveles de este mineral tóxico en el cerebro. La posibilidad de que existan otros mecanismos que participen en el efecto neuroprotector del silicio no ha sido estudiada.

El estrés oxidativo se considera un factor implicado tanto en el proceso de envejecimiento como en las patologías crónicas relacionadas con el mismo. Los antioxidantes han sido propuestos como alternativa efectiva en la prevención y tratamiento temprano de estas enfermedades. Aunque el efecto

antioxidante del silicio ha sido abundantemente descrito en plantas, no hay datos en mamíferos, y no se ha estudiado si un posible mecanismo antioxidante podría ser la causa de sus beneficios sobre la salud.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el **objetivo central** de este trabajo es evaluar los posibles mecanismos del silicio responsables de sus efectos protectores tanto a nivel neuronal como hepático e intestinal en modelos *in vitro* e *in vivo*.

De forma más concreta se plantean los siguientes **objetivos primarios**:

1. Caracterizar los mecanismos de protección del silicio en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en ausencia y presencia de estrés oxidativo.
2. Analizar la posibilidad de emplear el silicio como ingrediente funcional incluido en una matriz cárnica. Determinar el impacto del consumo del cárnico funcional enriquecido con silicio sobre el metabolismo lipoproteico y los principales factores del NAFLD (índice NAS, apoptosis y estrés oxidativo) en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y colesterol.
3. Estudiar el posible efecto del silicio sobre la digestión y absorción de hidratos de carbono y grasas. Determinar la capacidad inhibitoria *in vitro* de la enzima α -glucosidasa. Efectos *in vivo* sobre la glucemia y trigliceridemia postprandiales tras una administración aguda y una administración subcrónica de silicio en ratas Wistar sanas.

RESULTADOS

Expresión de resultados.

Para una lectura más fácil de este apartado se ha dividido esta sección en capítulos 1 a 3 que responden a los objetivos primarios planteados en esta memoria de Tesis Doctoral.

En cada capítulo, a modo de subsección, se han definido: los artículos integrados en él, una breve introducción, objetivos y diseño experimental incidiendo en los detalles metodológicos más relevantes. A continuación, se incluye cada uno de los artículos, con una página a modo de prólogo en castellano, finalizando con el artículo respectivo publicado o en vías de publicación.

Capítulo 1

Evaluación de los efectos neuroprotectores del silicio en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano

Artículos integrados en este capítulo:

BMC Complementary and Alternative Medicine. 14 (1). 384 (2014).

Chemosphere. 135: 217-224 (2015).

PloS one: en fase de revisión

Introducción

La EA es la principal causa de demencia en personas adultas, con una prevalencia que aumenta cada año en países desarrollados (Kumar y Singh, 2015). Los beneficios del silicio en la prevención de la EA han sido descritos tras observarse en aquellos países un mayor consumo de este mineral. Sin embargo, el efecto neuroprotector del silicio en la EA sólo se atribuye a su capacidad para limitar la absorción de aluminio a nivel intestinal y aumentar su excreción en orina, sin que se hayan descrito otros posibles mecanismos adicionales (ver introducción subsección 4.2.2). Aunque existen estudios *in vitro* en células de pulmón y hueso, no hemos encontrado bibliografía sobre la caracterización de otros mecanismos moleculares neuroprotectores en líneas celulares de origen nervioso tratadas con silicio.

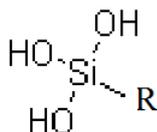
Objetivos

- Estudiar el efecto *in vitro* del tratamiento con diferentes concentraciones de silicio en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y en presencia o ausencia de estrés oxidativo
- Determinar el intervalo de dosis efectivas de Si en esta línea celular

Diseño experimental del capítulo 1:

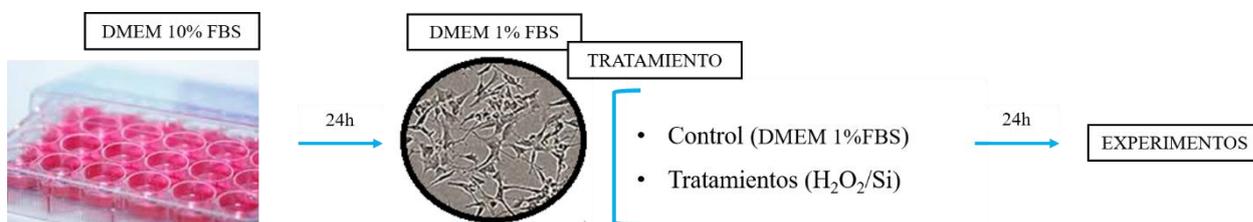
Modelo: los estudios *in vitro* se han realizado en la línea celular SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) de neuroblastoma humano sin diferenciar. Esta línea es una de las más empleadas en la actualidad en los estudios preliminares sobre neuroprotección y neurotoxicidad mediados por diferentes sustancias. Además esta línea expresa los principales marcadores de neuronas colinérgicas, considerándose por ello un buen modelo para estudiar alteraciones de las mismas. Todos los experimentos se realizaron entre los pases 3 y 15.

Forma química de silicio escogida: el silicio empleado en los estudios con cultivos celulares fue el silicio G5 de Glycan Group (Geneva, Switzerland). Este laboratorio modificó posteriormente el nombre del producto a silicio G57, sin variar la formulación. Se trata de un silicio orgánico soluble, capaz de atravesar la membrana celular. Aunque la molécula se encuentra bajo patente, se trata de un metil-silanotriol en el cuál el grupo metilo ha sido sustituido por un radical más complejo.



Presenta la ventaja respecto a otras formas solubles de silicio, como el ácido silícico, de ser estable en solución incluso a temperatura ambiente.

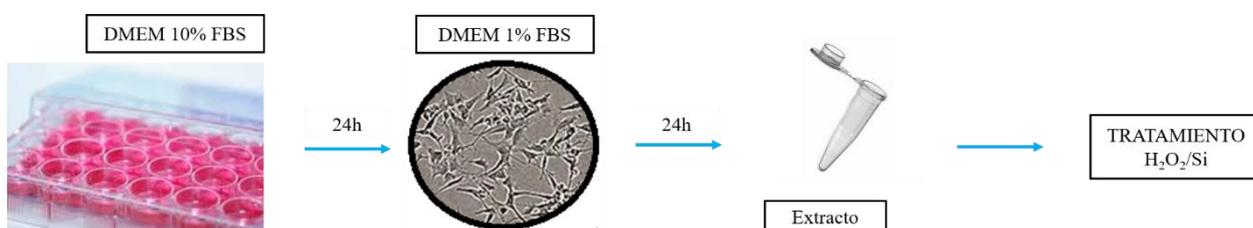
Cultivo celular y tratamientos: las células SH-SY5Y se cultivaron en medio DMEM con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y 10% de Penicilina-Estreptomicina. Los tratamientos se realizaron con DMEM 1% FBS, a las 24h de sembrar las células en las placas correspondientes (Figura A).



Las soluciones ensayadas de H₂O₂ y silicio se prepararon extemporáneamente (en fresco) para cada experimento. El H₂O₂ se diluyó en PBS mientras las diluciones de silicio se hicieron directamente en el DMEM 1% FBS.

- Artículo 1: las células se trataron con H₂O₂ (400 μM) y con diferentes concentraciones de silicio en un intervalo de 50 a 2000 ng/mL.
- Artículo 2: se empleó solo silicio a concentraciones entre 50 y 20000 ng/mL.
- Artículo 3: el tratamiento consistió en H₂O₂ a diferentes concentraciones (1-1000 μM).

Actividad acetilcolinesterasa en extracto de células control (Artículos 3 y 4): uno de los experimentos de estas publicaciones se realizó de forma diferente al resto de tratamiento con H₂O₂ y silicio. El objetivo del mismo fue estudiar el efecto directo de ambos compuestos (H₂O₂ y silicio) sobre la estructura de la enzima. Por ello, el tratamiento se realizó en extractos celulares procedentes de células control, evitando así la regulación génica que alterase los niveles de proteínas. El cultivo se realizó en todos los casos con células control que se mantuvieron con medio DMEM 1% FBS durante 24h. Pasado ese tiempo se recogieron las células y se obtuvo un extracto total de las mismas. Finalmente el H₂O₂ y el silicio se añadieron a ese extracto y se incubaron a diferentes tiempos antes de medir la actividad AChE.



- Artículo 3: los extractos de células control se trataron con H₂O₂ (1-1000 μM) durante 0, 15 y 30 minutos.
- Artículo 4: los extractos de células control se trataron con H₂O₂ (1, 400 y 1000 μM) y silicio (50-750 ng/mL) durante 0, 15 y 30 minutos.

Artículo 1

Organic silicon protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide effects

Garcimartín A, Merino JJ, González MP, Sánchez-Reus MI,

Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, & Benedí J.

BMC complementary and alternative medicine (2014)

Impact factor: 2.020 (6 de 24 en Integrative and Complementary Medicine)

Doi: 10.1186/1472-6882-14-384

Antecedentes: el estrés oxidativo desempeña un papel relevante en la EA (Christen, 2000) y, por ello, las sustancias antioxidantes pueden ser útiles en la prevención de dicha patología. La eficacia del silicio en la EA ha sido demostrada en estudios epidemiológicos, pero los mecanismos moleculares por los que puede llevar a cabo su función neuroprotectora no han sido estudiados de forma detallada. Aunque la función antioxidante del silicio ha sido descrita en ensayos *in vitro* y sobretodo en vegetales (Zhu y cols., 2004), su posible implicación como neuroprotector no ha sido estudiada previamente.

Hipótesis: el silicio tiene una acción neuroprotectora frente al daño oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a través de la eliminación de ROS.

Resultados: en primer lugar se caracterizó el efecto tóxico del H_2O_2 en nuestras condiciones experimentales. El H_2O_2 provocó una disminución de la viabilidad del 40%, detectándose muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, concretamente a través de la vía extrínseca, con activación de caspasa-8. Además, en las células tratadas con H_2O_2 aumentaron significativamente los niveles intracelulares de ROS y la peroxidación lipídica, demostrándose por tanto una situación de estrés oxidativo. El tratamiento de las células con silicio (200-1000 ng/mL) previno el descenso de la viabilidad celular provocado por el H_2O_2 . Asimismo, el silicio evitó parcialmente la muerte por necrosis (50-500 ng/mL) y por apoptosis, ya que se detectó menor actividad caspasa-8 (50-750 ng/mL) y caspasa-3 (250-750 ng/mL). Aunque solo la concentración de 250 ng/mL de silicio redujo la peroxidación lipídica provocada por el H_2O_2 , todas las concentraciones de silicio (50-750 ng/mL) evitaron por completo el aumento de ROS dentro de las células. Por último la dosis más alta de silicio (750 ng/mL) aumentó significativamente la peroxidación lipídica en comparación con el control de H_2O_2 .

Conclusiones: los resultados demuestran que el tratamiento con H_2O_2 (400 μ M, durante 24h) provoca la aparición de estrés oxidativo y muerte neuronal por necrosis y apoptosis, que de una u otra manera se encuentran implicadas en la EA. El silicio, especialmente a dosis entre 100 y 500 ng/mL, neutralizó el efecto tóxico del H_2O_2 , evitando parcialmente la muerte celular y revirtiendo la situación de estrés oxidativo. Se confirma la hipótesis inicial, el silicio mostró propiedades antioxidantes en células SH-Y5Y tratadas con H_2O_2 . Este mecanismo puede estar relacionado con el efecto neuroprotector del silicio escrito acientes de EA.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Organic silicon protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide effects

Alba Garcimartín^{1,2*}, José J Merino³, María Pilar González³, María Isabel Sánchez-Reus³, Francisco J Sánchez-Muniz², Sara Bastida² and Juana Benedí¹

Abstract

Background: Hydrogen peroxide (H₂O₂) is a toxic agent that induces oxidative stress and cell death. Silicon (Si) is a biological element involved in limiting aluminium (Al) absorption with possible preventive effects in Alzheimer's disease. However, Si has not yet been associated with other neuroprotective mechanisms.

Methods: The present experiments evaluated in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line the possible role of different Si G5 (50-1000 ng/mL) concentrations in preventing cellular death induced by H₂O₂ (400 µM, 24 hours).

Results: Our findings showed that H₂O₂ promoted cell death in the human SH-SY5Y cell cultures and this could be prevented by Si treatment. The loss in cell viability mediated by H₂O₂ was due to an apoptotic and necrotic process. Apoptotic death was incurred by regulating caspase-8 activity in the extrinsic pathway. The apoptotic and necrotic cell death induced by H₂O₂ was almost totally reversed by Si (50-500 ng/mL), indicating that it down-regulates both processes in H₂O₂ treated cells.

Conclusions: According to our data, Si is able to increase SH-SY5Y cell survival throughout partially blocking cellular damage related to oxidative stress through a mechanism that would affect H₂O₂/ROS elimination.

Keywords: Silicon, Cellular death, LDH, ROS, Caspase-3,-8,-9, Neuroprotection

Background

Silicon (Si) is a biologically important element that is soluble in water as silicic acid, Si(OH)₄. It has been reported that Si is a decisive factor in limiting absorption of dietary Aluminium (Al) [1]. Si administration reduced Al accumulation in several tissues, including brain areas of rats orally exposed to Al [2,3]. In the form of silicon dioxide (SiO₂), Si is the most abundant element on the Earth's crust together with oxygen. Nevertheless, its biological role has not yet been well studied [4]. Si has been considered an "essential" element since chicks receiving Si-deprived diet showed poor growth [5], and because it is also necessary to assure normal growth impairment [6]. Apart from its physiological role in bone and cartilage formation, Si has been associated with cardiovascular protection, immune system enhancement and protective

effects in the Alzheimer's disease [7,8]. Despite its numerous properties, its biological function remains unclear. Its blood concentration is similar to other elements like zinc [9] and in urine the concentration is like that of calcium, but contrary to other elements and although it is quite ubiquitous [10], it does not associate with plasma proteins [11] and does not have an identified binding site [12]. Finally, Si does not seem to take part in any biochemical reactions/interactions because it does not have bioorganic-inorganic chemistry [13]. Ortho-silicic acid, or monomeric Si(OH)₄, is water soluble and stable in highly diluted aqueous solutions. It plays a crucial role in delivering Si to the living organisms' cells. Thus, it represents the major source of Si for both humans and animals. The recommended daily Si intake (RDI) has not yet been set [14,15]. Some studies suggest that serum Si levels decrease in pregnancy [16] and with aging, particularly in women [17]; thus, supplementation with Si in available forms, such as organic Si, could prevent degenerative processes. As already commented, Si reduces Al bioavailability, thereby possibly limiting Al neurotoxicity. Consumption

* Correspondence: a.garcimartin@ucm.es

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

Artículo 2

Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma

SH-SY5Y cell line

Garcimartín A, Merino JJ, Santos-López JA, López-Oliva ME, González, MP,
Sánchez-Muniz FJ, & Benedí J.

Chemosphere (2015)

Impact factor: 3.698 (37 de 225 en Environmental Sciences)

Doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.060

Antecedentes: en el primer artículo se puso de manifiesto la capacidad del silicio para revertir el daño provocado por el H₂O₂, posiblemente a través de un mecanismo antioxidante. Por otra parte, el silicio a concentraciones elevadas (2000 ng/mL) no fue capaz de bloquear el efecto lesivo del H₂O₂, y a 750 ng/mL aumentó la peroxidación lipídica respecto al mismo, sugiriendo un posible efecto tóxico. En la bibliografía se encuentran otros trabajos que estudian la toxicidad del silicio, especialmente en forma de nanopartículas de sílice, pero no existen estudios *in vitro* que analicen un intervalo amplio de concentraciones de silicio.

Hipótesis: dependiendo de la concentración ensayada, el silicio orgánico, una forma altamente biodisponible de silicio, puede ejercer efectos neuroprotectores o neurotóxicos.

Resultados: el silicio a bajas concentraciones (100-250 ng/mL) aumentó la viabilidad celular debido a un efecto antiapoptótico, por inhibición de la actividad caspasa-8 y caspasa-3, y disminución de la liberación de TNF- α (250 ng/mL). A dosis altas (750-1000 ng/mL) se observó un aumento de la necrosis provocada probablemente por un aumento en la peroxidación lipídica (250-750 ng/mL). La peroxidación lipídica puede ser consecuencia de un aumento del radical OH[•], ya que no se detectó aumento de H₂O₂ en las células. Además, a 500-750 ng/mL el silicio aumentó la actividad de caspasa-3, confirmándose la fragmentación de ADN a dichas dosis, y la liberación de TNF- α a 750 ng/mL.

Conclusiones: el efecto del silicio es claramente dosis-dependiente. A dosis bajas se comporta como un neuroprotector, aumentando la viabilidad celular no por un aumento en la proliferación, sino por una disminución de la apoptosis basal. A dosis altas provoca neurotoxicidad, aumentando tanto la necrosis por peroxidación lipídica, como la apoptosis por aumento de TNF- α .



Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line



Alba Garcimartín^{a,b,*}, José Joaquín Merino^c, Jorge Arturo Santos-López^{a,b}, María Elvira López-Oliva^d, María Pilar González^c, Francisco José Sánchez-Muniz^b, Juana Benedí^a

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

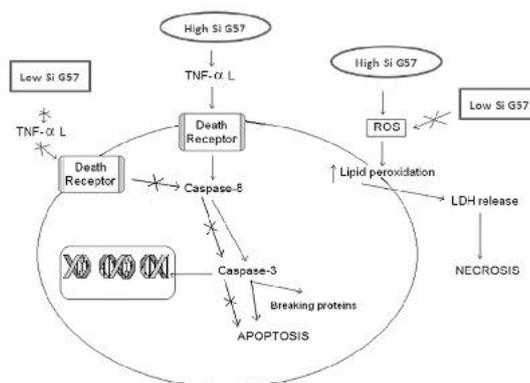
^c Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^d Sección Departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Silicon show a double-edged-sword effect depends on the concentrations used.
- Silicon at high doses may act as neurotoxic by necrosis and apoptosis mechanisms.
- Silicon at low doses may act as neuroprotector by inducing anti-apoptotic effects.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2014
Received in revised form 14 April 2015
Accepted 22 April 2015
Available online 15 May 2015

Keywords:

Silicon
Cell death
Proliferation
Neuroprotection
Neurotoxic
SH-SY5Y

ABSTRACT

Silicon (Si) is a trace element that has been considered to be an environmental contaminant for many years, although different studies have recently reported it is an essential element for living cells. The present study tested the ability of different concentrations of Si G57™ to induce neuroprotection or neurotoxicity over 24 h in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. Cell viability, cellular proliferation, LDH release, ROS, antioxidant capacity, TBARS, caspase-3, -8 and -9, DNA fragmentation, and TNF- α levels were evaluated. Low Si doses (50–250 ng mL⁻¹) increased the cell viability and reduced caspase-3 and -8 activities and TNF- α level. The increase in cell viability was independent of any proliferative effect as there was no variation in cyclin E and PCNA levels. At higher concentrations, Si increased caspase-3, as well as TBARS, LDH, DNA fragmentation, and TNF- α releases. Altogether, these results suggest that Si could act either as a neuroprotector or a neurotoxic agent depending on the concentration tested. This study emphasizes the importance of developing new neuroprotective therapies based on low Si doses.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride; AD, Alzheimer's disease; AFC, 7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin; Al, aluminium; AMC, fluorochrome 7-amino-4-methyl-coumarin; BHT, butylated hydroxytoluene; H₂DCF-DA, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; FBS, foetal bovine serum; LDH, lactate dehydrogenase; MTT, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Si, silicon; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

* Corresponding author at: Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Plaza Ramón y Cajal s/n, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: garcimartin.a@gmail.com (A. Garcimartín).

Artículo 3

Hydrogen peroxide modifies both activity and isoforms of acetylcholinesterase in human neuroblastoma SH-SY5Y Cells

Garcimartín A, López-Oliva ME, González MP,

Sánchez-Muniz FJ, & Benedí J.

PloS one (En revisión)

Impact factor: 3.057 en 2015 (11 de 63 en Multidisciplinary Sciences)

Antecedentes: la hipótesis colinérgica de la EA se basa en la disminución de la acetilcolina (ACh) observada en estos pacientes (Schliebs y Arendt, 2006). La actividad de AChE aumenta en presencia de A β , y a su vez, la AChE acelera la agregación del A β fibrilar, detectándose altos niveles de ambos en las placas seniles propias de esta enfermedad. Por ello, las sustancias capaces de inhibir la actividad de AChE se consideran útiles para el tratamiento de la EA. En este artículo se plantea evaluar la capacidad del silicio para inhibir la AChE en nuestro modelo de estrés oxidativo previamente publicado y discutido. Sin embargo, al realizar la búsqueda bibliográfica del tema no pudimos encontrar información sobre el efecto del H₂O₂ sobre la actividad de AChE. Dada la importancia tanto de la AChE como del estrés oxidativo en la fisiopatología de la EA, nos pareció importante establecer, en primer lugar, la posible relación entre el silicio y el H₂O₂ como paso previo al estudio con silicio.

Hipótesis: el H₂O₂ altera específicamente la actividad y los niveles de las diferentes isoformas de AChE en las células SH-SY5Y.

Resultados: el H₂O₂ desde una concentración mínima de 1 μ M aumenta significativamente la actividad de AChE, provocando cambios en los parámetros cinéticos de la misma que sugieren que el H₂O₂ sea un activador alostérico de la enzima. El aumento de la actividad de AChE fue observado igualmente al poner en contacto el H₂O₂ con extracto de células control, lo que demuestra un efecto directo del mismo sobre la estructura de la enzima. Por otra parte, el H₂O₂ a altas concentraciones (400-1000 μ M) provoca una disminución en los niveles totales de AChE, acompañada además de una alteración en el perfil de isoformas característico de esta proteína. Los cambios en las isoformas pueden conllevar, entre otras, un aumento de apoptosis demostrado con la liberación de citocromo c. La disminución de los niveles de proteína explica que el aumento de actividad por H₂O₂ no sea dosis dependiente.

Conclusiones: el H₂O₂ es un potente activador de la enzima AChE desde dosis muy bajas. Este aumento de actividad en presencia de estrés oxidativo puede agravar el déficit de ACh detectado en la EA. El tratamiento agudo con dosis altas de H₂O₂ modifica drásticamente el perfil de isoformas de la proteína, y disminuyen los niveles totales de la misma. Este estudio demuestra el efecto directo del H₂O₂ sobre la AChE y sugiere un posible nexo de unión entre la hipótesis colinérgica y la hipótesis del estrés oxidativo de la EA. Además, abre la puerta al estudio de la posible utilidad de los antioxidantes para el tratamiento de la EA por su capacidad potencial para evitar la activación de la AChE.

PLOS ONE

Hydrogen Peroxide Modifies both Activity and Isoforms of Acetylcholinesterase in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Hydrogen Peroxide Modifies both Activity and Isoforms of Acetylcholinesterase in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells
Short Title:	Hydrogen Peroxide Impact on Acetylcholinesterase
Corresponding Author:	Alba Garcimartín, Ph.D. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia Madrid, SPAIN
Keywords:	Acetylcholinesterase, hydrogen peroxide, alternative splicing, cell culture, cell death.
Abstract:	<p>The involvement of cholinergic system and the reactive oxygen species (ROS) in the pathogenesis of some degenerative diseases has been widely reported; however, the specific impact of hydrogen peroxide (H₂O₂) on the acetylcholinesterase (AChE) activity as well as AChE isoform levels has not been clearly established. Hence, the purpose of present study is to clarify whether H₂O₂ alters these parameters. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were treated with H₂O₂ (1-1000 µM) for 24 h and AChE activity and AChE and cytochrome c levels were evaluated. AChE activity was strongly increased from 1 µM to 1000 µM of H₂O₂. The results of the kinetic study showed that H₂O₂ affected V_{max} but not K_m; and also that H₂O₂ changed the sigmoid kinetic observed in control samples to hyperbolic kinetic. Thus, results suggest that H₂O₂ acts as an allosteric activators. In addition, H₂O₂, (100-1000 µM) reduced the total AChE content and modified its isoform profile (mainly 50-, 70-, and 132-kDa). H₂O₂ from 100 µM to 1000 µM induced cytochrome c release confirming cell death by apoptosis. All these results together suggest: a) the involvement of oxidative stress in the imbalance of AChE, which is linked to the etiology of Alzheimer disease; and b) treatment with antioxidant agents may be a suitable strategy to protect cholinergic system alterations and to avoid cellular death in Alzheimer disease patients.</p>
Order of Authors:	Alba Garcimartín, Ph.D. M. Elvira López-Oliva M Pilar González Francisco J Sánchez-Muniz Juana Benedí
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
<p>Financial Disclosure</p> <p>Please describe all sources of funding that have supported your work. This information is required for submission and will be published with your article, should it be accepted. A complete funding statement should do the following:</p> <p>Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name,</p>	<p>Spanish projects AGL2011-29644-C02-02 and AGL2014-53207-C2-2-R. AG received a pre-doctoral fellowship award from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2012-054752 (FPI))</p>

1 **Hydrogen Peroxide Modifies both Activity and Isoforms of**
2 **Acetylcholinesterase in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells**

3

4 **Alba Garcimartín^{1*}, M. Elvira López-Oliva², M. Pilar González¹, Francisco J. Sánchez-**
5 **Muniz³, Juana Benedí¹**

6 ¹ Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de
7 Madrid, Madrid, Spain

8 ² Sección Departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de
9 Madrid, Madrid, Spain

10 ³ Departamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, Universidad
11 Complutense de Madrid, Madrid, Spain

12 ***Correspondence:** Alba Garcimartín. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia,
13 Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Telephone number 0034913941873,
14 fax number 0034913941726, e-mail address: a.garcimartin@ucm.es

15

16 Running head: Hydrogen Peroxide Impact on Acetylcholinesterase

17

Artículo 4

Silicon prevents AChE alteration promoted by H₂O₂ in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

Garcimartín A, López-Oliva ME, González MP, Sánchez-Muniz FJ, & Benedí J.

En fase de escritura

Antecedentes: la relación entre la AChE y el estrés oxidativo pone de manifiesto la posibilidad de emplear sustancias antioxidantes en el tratamiento de la EA. El H₂O₂ afecta tanto a la capacidad enzimática de la AChE como a los niveles y proporción de isoformas de la proteína. En los primeros estudios se ha demostrado la capacidad antioxidante del silicio a bajas dosis y su potencial tóxico a dosis más altas. Además, Bluder y cols. (2010) describieron la capacidad de un derivado de metil-silanotriol para inhibir la actividad AChE. Por ello nos planteamos estudiar el efecto de concentraciones crecientes de silicio sobre la actividad y niveles de AChE, en ausencia y presencia de H₂O₂.

Hipótesis: el silicio es capaz de contrarrestar la activación de AChE producida por el H₂O₂ en células SH-SY5Y.

Resultados: el silicio, a concentraciones ≥ 250 ng/mL, aumentó significativamente la actividad de AChE, modificando su comportamiento enzimático y pasando de un ajuste sigmoideo a otro parabólico. Los resultados sugieren que actúa como activador alostérico, ya que aumenta la V_{max} sin afectar a la K_m de la enzima. A pesar del aumento de actividad, los niveles de proteína y la contribución de las isoformas no se modificó. Los experimentos con H₂O₂ se llevaron a cabo con 100 y 250 ng/mL de silicio ya que son las concentraciones que produjeron un efecto neuroprotector (artículos 1 y 2). El silicio en presencia de H₂O₂ se comporta como un inhibidor de la AChE. Desde la concentración mínima ensayada de H₂O₂ (1 μ M), el silicio disminuyó significativamente la activación de la enzima, revirtiéndola en muchos casos hasta niveles del control. A las concentraciones 1 y 400 μ M de H₂O₂ el silicio disminuyó la V_{max} sin afectar a la K_m. A 1000 μ M de H₂O₂, el silicio además de disminuir la V_{max} aumentó la K_m de la AChE, reduciendo con ello la afinidad de la acetilcolina por el centro activo de la enzima. El experimento con extractos de células control reflejó igualmente que el silicio bloqueó la activación del H₂O. En los experimentos sobre los niveles y composición de la proteína el H₂O₂ 1 μ M no causó ningún cambio significativo como ya se demostró en el artículo 3. El H₂O₂ a 1000 μ M modificó tanto los niveles como la proporción de isoformas de la proteína. El tratamiento conjunto con silicio no provocó ninguna modificación en los niveles de AChE respecto al H₂O₂.

Conclusiones: el silicio se comporta de diferente forma en ausencia o en presencia de H₂O₂. En ausencia de estrés oxidativo, actúa como activador alostérico de la AChE a partir de 250 ng/mL, provocando un aumento de la V_{max} sin afectar a la K_m. Por otra parte, el silicio evita la activación de AChE producida por H₂O₂ en células SH-SY5Y al bloquear el efecto de éste sobre la estructura de la enzima. A la concentración más alta de H₂O₂ el silicio disminuye la afinidad de la acetilcolina explicando la disminución en la V_{max}. La inhibición de AChE puede contribuir al efecto neuroprotector del silicio observado en pacientes y modelos animales de EA.

Capítulo 2

Impacto del consumo de un cárnico funcional enriquecido con silicio sobre el metabolismo lipoproteico y los principales factores del NAFLD en ratas Wistar de 1 año alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y colesterol durante 8 semanas

Artículos integrados en este capítulo:

LWT-Food Science and Technology, 64 (2), 720-726 (2015)

Food Research International, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.029> (2016)

Journal of Nutrition, 145 (9), 2039-2045 (2015)

PloS one, 11 (1), e0147469 (2016)

Oxidative Medicine and Cellular Longevity: en revisión

Introducción

Este capítulo está formado por dos partes bien diferenciadas. La primera, compuesta de dos artículos sobre cárnicos funcionales con algas, cuyo objetivo en el marco de esta Tesis Doctoral está detallado en el resumen de cada uno de ellos. La otra está relacionada con el uso de silicio como ingrediente incluido en un cárnico funcional y sus efectos en un modelo de rata de NAFLD, y consta de tres artículos.

La inclusión de silicio en un alimento de alto consumo para la obtención de un alimento funcional podría ser una estrategia interesante para aumentar la concentración de silicio en la dieta. La carne y sus derivados han demostrado ser una buena matriz, tanto por la facilidad para incorporar ingredientes bioactivos como por su elevado consumo en los países desarrollados que asegura el aporte del ingrediente funcional sin necesidad de modificar los hábitos alimentarios. En la sociedad actual la prevalencia de SM es muy elevada (Orgaz Gallego y cols., 2015), afectando fundamentalmente a la población adulta-anciana. Se plantea en este capítulo el diseño de un cárnico funcional enriquecido en silicio y la evaluación de su consumo en un modelo de NAFLD en ratas Wistar de 1 año.

Objetivos

- Elaboración de cárnicos funcionales por el método de adición de nuevos componentes; búsqueda de marcadores útiles para probar su eficacia.
- Determinar la influencia del consumo durante 8 semanas del cárnico funcional enriquecido en silicio sobre el metabolismo lipoproteico y grado de oxidación de las VLDL en un modelo de NAFLD con ratas Wistar de 1 año alimentadas con dieta con alto contenido de grasa saturada y colesterol
- Conocer el efecto del cárnico funcional enriquecido en silicio sobre las defensas antioxidantes en un modelo de NASH basado en el consumo de una dieta alta en grasa saturada y colesterol en ratas Wistar de 1 año.
- Evaluar el impacto del consumo del cárnico funcional enriquecido en silicio sobre marcadores de NAFLD en un modelo de NASH inducido por dieta en ratas Wistar de 1 año.

Diseño experimental del capítulo 2:

Estudio previos con cárnicos funcionales con algas: realización de experimentos con cárnicos formulados con algas para valorar su efecto *in vitro* sobre la digestión de hidratos de carbono. Búsqueda bibliográfica sobre la inclusión de algas en una matriz cárnica y sus efectos sobre diferentes marcadores de CVD, SM y DM2 que ha culminado con la publicación de un artículo de revisión. Estos conocimientos sobre la elaboración y manejo de los productos cárnicos, así como la selección de marcadores y su posterior evaluación han sido fundamentales para la realización del estudio posterior de cárnicos con silicio.

Forma química de silicio escogida: para la elaboración del cárnico funcional se empleó SiO₂, un silicio amorfo micronizado (E551) de calidad alimentaria (Merck, Darmstadt, Alemania). Esta presentación de silicio es ampliamente utilizada como aditivo alimentario y tiene la calidad *GRAS*, del inglés *generally recognized as safe*, de la FDA, lo que asegura su seguridad a la hora de emplearlo como ingrediente funcional.

Elaboración del cárnico funcional enriquecido en silicio: el silicio coloidal (1,3 g) se mezcló con la manteca de cerdo (190,0 g) para evitar la dispersión y pérdida del silicio durante el proceso. A continuación se incorporó a la mezcla la carne magra de cerdo picada (1,0 kg) y se homogenizaron formando una especie de pasta que recordaba por su aspecto a las salchichas comerciales (reestructurado cárnico, RP). La concentración final de silicio en el cárnico es de aproximadamente 1 g/kg.

Elección de la concentración de silicio en los cárnicos: se ha demostrado en estudios previos la posibilidad de incorporar el silicio como ingrediente en chicles o chocolates hasta en un 10% del peso final del producto (Canhan, 2014). A esa concentración de silicio, la aceptación por parte de los catadores fue alta. En nuestro experimento el silicio como SiO₂ se empleó a una proporción aproximada del 0,1% lo que en principio garantizaba la aceptación del cárnico y en caso de buenos resultados su posterior comercialización.

Dietas empleadas en el estudio *in vivo*: los marcadores elegidos para evaluar el efecto del cárnico funcional, como se comentará posteriormente, están relacionados con el SM y por tanto con sus factores de riesgo (dislipemia, disglucemia, peso corporal, etc.). El modelo experimental elegido se basa en el consumo de una dieta con elevado contenido en grasa saturada y colesterol. Se formularon para el estudio dos dietas: a) dieta control (C), con un contenido relativamente alto de grasa saturada; y b) control alto en colesterol (Chol-C), que además de grasa saturada, contenía una cantidad elevada de colesterol y ácido cólico. Las dos dietas control contenían un 20% de reestructurado cárnico liofilizado sin silicio para imitar el elevado consumo de carne en los países occidentales, así como su posible participación en el aumento de riesgo de enfermedades crónicas. Además, se formuló una dieta de tratamiento (Chol-Si) con la dieta rica en colesterol y un 20% del cárnico funcional conteniendo silicio (RP-Si). La concentración de

Si en la dieta Chol-Si fue menor que la de otros estudios previos realizados con silicio y en los que se analizaron parámetros similares (Peluso y Schneeman, 1994; Oschilewski y cols., 1985).

Diseño experimental del estudio crónico: el experimento se realizó en ratas Wistar macho de 1 año, que extrapoladas al ser humano equivale a aproximadamente 60 años (Carlson y cols., 1968). Dado que la edad es un factor de riesgo muy importante en las enfermedades crónico-degenerativas, consideramos que el uso de ratas de 1 año aporta valor añadido al estudio y permite replicar mejor las características de la patología estudiada. Las ratas se dividieron en tres lotes de ocho ratas cada uno, consumiendo cada lote una de las dietas experimentales durante ocho semanas. Por tanto, se estudiaron los grupos C, Chol-C y Chol-Si.

Para los estudios de estatus antioxidantes se introdujo un cuarto grupo de 8 ratas. La dieta de este grupo (Chol-HTx) contenía colesterol y RP enriquecido en un compuesto con capacidad antioxidante reconocida, el hidroxitirosol (Cofrades y cols., 2011) a concentración de 3,6 g de HTx/kg de RP fresco.

La comida y agua de bebida se proporcionaron *ad libitum*. La cantidad de dieta consumida se controló diariamente. Asimismo los animales se pesaron una vez a la semana. Durante la última semana del estudio se recogieron heces de todos los grupos. Finalmente, pasadas 8 semanas los animales fueron anestesiados con isoflurano (5%) para proceder a la toma de sangre por punción intracardiaca, sacrificio y extracción del hígado.

Artículo 5

Aqueous extracts and suspensions of restructured pork formulated with *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* and *Porphyra umbilicalis* distinctly affect the in vitro α -glucosidase activity and glucose diffusion.

Garcimartín A, Benedí J, Bastida S, & Sánchez-Muniz FJ.

LWT -Food Science and Technology (2015).

Impact factor: 2.711 (22 de 124 en Food Science and Technology)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.050>

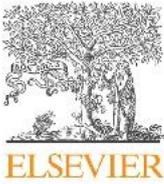
Introducción: este artículo incluye información sobre el efecto antidiabético *in vitro* de cárnicos funcionales con algas. En un artículo previo del grupo se evaluó el efecto *in vitro* de tres especies de algas, *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Himanthalia elongata* (Sea spaghetti) y *Porphyra umbilicalis* (Nori) sobre la digestión de hidratos de carbono y difusión de glucosa (Schultz-Moreira y cols., 2014). En el caso de la inhibición de la α -glucosidasa la más activa fue *Himanthalia elongata*, probablemente por su contenido en polifenoles y fibra soluble. El extracto acuoso de *Undaria pinnatifida* fue el que más retrasó la difusión de glucosa. Se formularon tres cárnicos funcionales cada uno con una de estas algas. En estudios *in vivo* se había comprobado (Schultz-Moreira y cols., 2010) que dichos cárnicos eran capaces de ejercer algunas de las actividades propias del alga que contenían.

Hipótesis: los cárnicos funcionales formulados con *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* y *Porphyra umbilicalis* mantienen la actividad observada con las algas aisladas.

Objetivo del estudio en el marco de la tesis: familiarización con el manejo de cárnicos funcionales y con la evaluación de sus efectos.

Resultados: el reestructurado cárnico (RP) empleado como matriz tuvo un efecto activador de la enzima α -glucosidasa. El cárnico funcional con *Himanthalia elongata* disminuyó significativamente la actividad de la enzima mostrando un comportamiento tipo inhibidor competitivo. Al igual que en la α -glucosidasa, el RP aumentó la difusión de glucosa respecto al PBS. En este experimento fueron el cárnico con Nori seguido del de Wakame los que contrarrestaron el efecto del RP disminuyendo significativamente la difusión de glucosa. En este caso podría estar implicado el contenido en sodio de los mismos.

Conclusiones: la inclusión de algas en un cárnico funcional aporta a la matriz cárnica características propias del ingrediente bioactivo.



Aqueous extracts and suspensions of restructured pork formulated with *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* and *Porphyra umbilicalis* distinctly affect the *in vitro* α -glucosidase activity and glucose diffusion



Alba Garcimartín ^{a, b}, Juana Benedí ^b, Sara Bastida ^a, Francisco J. Sánchez-Muniz ^{a, *}

^a Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n., 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2015

Received in revised form

15 June 2015

Accepted 16 June 2015

Available online 25 June 2015

Keywords:

Alpha-glucosidase

Glucose diffusion

Restructured pork

Inhibition mechanism

Hypoglycaemic effects

ABSTRACT

Seaweed antidiabetic properties have been linked to changes in carbohydrate digestion and absorption. The effect of aqueous extracts and suspensions of restructured pork (RP) with 5 g/100 g of *Porphyra umbilicalis* (Nori), *Undaria pinnatifida* (Wakame) or *Himanthalia elongata* (Sea spaghetti) on α -glucosidase activity and glucose diffusion were *in vitro* tested. α -Glucosidase inhibition type was also assayed. Sea spaghetti-RP suspensions displayed, through a competitive mechanism, the highest α -glucosidase inhibitory effects (19.8% vs. control-RP at 45 min). Control-RP extracts vs. blank increased (15.4%) glucose diffusion while Nori-RP followed by Wakame-RP extracts significantly inhibited glucose diffusion (26.7% and 20%, respectively) and decreased AUC (18–20%) respect to control-RP counterpart. Stepwise analyses showed that maltose and polyphenols in the α -glucosidase inhibition- and Na in glucose diffusion-test, were significantly involved. In conclusion, Sea spaghetti-RP should be selected as α -glucosidase inhibitor while Nori-RP and Wakame-RP should be used as glucose diffusion reducers. As both hypoglycaemic effects were non-concatenated, generalizations about seaweed-RP should be avoided.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a lifestyle-related disease that has been strongly associated with dietary habits. Specifically, mild T2DM cases are currently increasing due to decreased physical activity and wrong dietary habits based on diets rich in energy and saturated fat (e.g. fatty meat based-diets) (Zhou, Tian, & Jia, 2013). Meat consumption is very high in Westernized countries. However, some of the potential negative components of meat could be partially removed in order to obtain potentially healthier functional meat (Burger, Beulens, Boer, Spijkerman, & Van der, 2011). In fact,

due to their high acceptability, meat products are an excellent alternative to include bioactive compounds in the diet without changing dietary habits. Hence, the design of restructured meat (e.g. restructured pork, RP) may lead to improve composition and potential health benefits ascribed to commercially meat products (Olmedilla-Alonso, Jiménez-Colmenero, & Sánchez-Muniz, 2013).

Seaweeds are a good source of soluble/viscous dietary fibre (Brownlee et al., 2005), minerals and vitamins, and also have associated bioactive compounds such as polyphenols (Bocanegra, Bastida, Ródenas, Benedí, & Sánchez-Muniz, 2009; Jiménez-Escrig & SanchezMuniz, 2000). They exert variable effects on rat cholesterololemia and antioxidant status, which persist when included as functional ingredient in RP (Moreira et al., 2010) or other food matrices (Dawczynski, Schubert, & Jahreis, 2007). In recent years many studies provide evidence that marine seaweeds and their derivatives show potential antidiabetic properties and could help to partially replace hypoglycemic drugs (Lin & Liu, 2012; Pantidos, Boath, Lund, Conner, & McDougall, 2014).

In vitro models could represent a useful approach to study the

Abbreviations: CVD, cardiovascular disease; CRP, control-RP; GOD, glucose oxidase; Ki, inhibition constant; Km, Michaelis–Menten constant; NRP, restructured pork containing 5 g/100 g of Nori; RP, restructured pork; SRP, restructured pork containing 5 g/100 g of Sea spaghetti; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus; Vmax, maximum velocity; WRP, restructured pork containing 5 g/100 g of Wakame.

* Corresponding author.

E-mail address: frasan@ucm.es (F.J. Sánchez-Muniz).

Artículo 6

A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: From technological development to assessment of healthy properties

Cofrades S, Benedí J, Garcimartín A, Sánchez-Muniz FJ, &
Jimenez-Colmenero F.

Food Research International

Impact factor: 3.182 en 2015 (17 de 124 en Food Science and Technology)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.029>

Antecedentes: los alimentos funcionales representan una estrategia nutricional cada vez más empleada en los países desarrollados para incorporar compuestos bioactivos en la dieta (Ashwell, 2002). La carne es un alimento rico en proteínas de elevado valor biológico, minerales y vitaminas que goza de una gran aceptación por parte de los consumidores. La reformulación de derivados cárnicos permitiría mantener un consumo elevado al reducir los componentes potencialmente perjudiciales y proporcionar otros con propiedades beneficiosas para la salud.

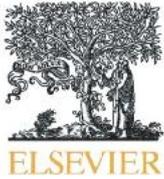
Las algas son un alimento muy común en Asia, aunque en Europa su consumo es reciente. Constituyen una fuente de compuestos activos como minerales, vitaminas, fibra o polifenoles entre otros. Su consumo se ha relacionado con un aumento de la esperanza de vida y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas (Sánchez-Muniz y cols., 2013). Su inclusión en un derivado cárnico puede favorecer un mayor consumo en la población occidental que se beneficiaría así de sus efectos.

Objetivo del estudio en el marco de la tesis: valorar los aspectos importantes a tener en cuenta en la formulación de un cárnico funcional y la evaluación de sus efectos a nivel experimental.

Resultados: se formularon tres reestructurados cárnicos con las tres algas en estudio: Wakame, Nori y Sea spaghetti. El contenido final del alga en el cárnico fue del 5%. A su vez, en el proceso de formulación se sustituyó parcialmente la grasa de la carne, rica en ácidos grasos saturados, por aceite de oliva, y se disminuyó la cantidad de sodio, todo ello dirigido a la obtención de un producto teóricamente más saludable.

El estudio de las propiedades de los tres cárnicos funcionales se llevó a cabo en ratas Wistar macho en crecimiento. El experimento duró 5 semanas durante las que consumieron dietas con un 15% del cárnico funcional, enriquecida o no con colesterol y ácido cólico para desarrollar algunas alteraciones típicas del SM. Se evaluaron parámetros de crecimiento e ingesta, niveles de lípidos plasmáticos y transporte lipoproteico, marcadores de estatus antioxidante y apoptosis en el hígado y la expresión de enzimas de lipogénesis y lipólisis. Los cárnicos funcionales mostraron efectos propios del alga que contenían, exhibiendo cada uno de ellos un perfil diferente. El cárnico con Wakame presentó mayor actividad antioxidantes mientras los que contenían Sea spaghetti o Nori fueron más efectivos contrarrestando las alteraciones producidas por el colesterol y reduciendo la apoptosis.

Conclusiones: la inclusión de algas para la obtención de cárnicos funcionales parece una buena estrategia nutricional para mejorar los niveles de algunos marcadores centrales de SM. Es necesario realizar una correcta evaluación de los efectos de cada producto, seleccionando de forma óptima los marcadores a estudiar, para así caracterizar sus beneficios específicos.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: From technological development to assessment of healthy properties

S. Cofrades^a, J. Benedí^b, A. Garcimartin^b, F.J. Sánchez-Muniz^b, F. Jimenez-Colmenero^{a,*}

^a Institute of Food Science, Technology, and Nutrition (ICTAN-CSIC), 28040 Madrid, Spain

^b Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2016

Received in revised form 23 June 2016

Accepted 30 June 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Meat-based functional foods

Seaweed

Bioactive compounds

Technological development

Growing animals

Lipoprotein metabolism

ABSTRACT

Meat consumption is influenced by various kinds of factors, among them health implications. Different strategies can be effective in developing meat-based functional foods. These basically entail reducing the presence of compounds with negative health implications and enhancing the presence of beneficial compounds. This article reviews a comprehensive model for the development of meat-based functional foods based on a presentation of the research achieved in terms of the design and development of qualitatively and quantitatively modified meat products (frankfurters, patties and restructured steaks). These were reformulated to incorporate nutrients associated with three different seaweeds (wakame–*Undaria pinnatifida*; nori–*Porphyra umbilicalis*; and sea spaghetti–*Himanthalia elongata*) as sources of bioactive substances, while simultaneously reducing sodium and fat and improving fatty acid profiles. Those seaweeds were chosen, because in terms of composition and health implications, abundance on Spanish coasts, relatively widespread consumption, and suitability in terms of flavour and colour they are better suited than others for use as ingredients in new products. It also discusses the consequences of the use of this type of meat-based functional foods (combination of pork meat and 5% of each seaweed with or without hypercholesterolaemic agent included in the diets) on growing animals (Wistar male rats), and their effects on different aspects of lipoprotein metabolism, oxidative stress and liver structure. This article, then, reports a comprehensive approach to the production of seaweed-enriched meat products, considering aspects of technological development aimed at achieving the functional effect.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Meat and meat products are essential components of the diet which supply valuable amounts of the nutrients (protein, fatty acids, vitamins, minerals and other bioactive compounds) needed for a healthy, balanced diet. However, like any other food they also contain constituents which, when consumed in inappropriate quantities, may enhance the risk of some of the major degenerative and chronic diseases (ischaemic heart disease, cancer, etc.). The growing understanding of the relationship between diet and health, combined with consumer interest in healthy, nutritious foods with additional health promoting functions, is driving the development of functional foods, which presents a challenge for the future of the meat industry. Meat-based functional foods offer an interesting opportunity to address consumer needs and to update recommendations regarding nutritional and dietary goals (Jimenez-Colmenero, 2007a). Consumers' unwillingness to change their dietary habits suggests that there is a considerable potential

market for frequently-consumed foods such as meats that have been designed to produce health benefits. Also, owing to the broad range of available presentations and the possibility of modifying their composition using non-meat ingredients, high consumer acceptability, etc., meat products are an excellent vehicle for delivery of bioactive compounds in the diet while complying more closely with dietary recommendations.

In general, the design and development of meat-based functional foods basically seeks to reduce the presence of compounds with negative health implications and increase the presence of beneficial compounds. Approaches based on animal production practices (genetic and nutritional) and meat transformation systems (reformulation process) are the most promising strategies for introducing qualitative and/or quantitative modifications in meat and meat derivatives (Arhara, 2006; Jimenez-Colmenero, 2007b; Jimenez-Colmenero, Carballo, & Cofrades, 2001). Reformulation has been widely used to remove, reduce, increase, add and/or replace different bioactive components and obtain specific meat-based designs with certain attributes that confer health-promoting properties (Olmedilla-Alonso, Jimenez-Colmenero, & Sánchez-Muniz, 2013). Healthy meat products have

* Corresponding author.

E-mail address: fjimenez@ictan.csic.es (F. Jimenez-Colmenero).

Artículo 7

**Silicon-Enriched Restructured Pork Affects the Lipoprotein Profile, VLDL
Oxidation, and LDL Receptor Gene Expression in Aged Rats Fed an
Atherogenic Diet**

Garcimartín A, Santos-López JA, Bastida S, Benedí J, &
Sánchez-Muniz FJ.

Journal of Nutrition

Impact factor: 3.740 (17 de 78 en Nutrition and Dietetics)

Doi: 10.3945/jn.115.213934

Antecedentes: algunos de los parámetros relacionados con un aumento de riesgo de ECV son los niveles elevados de triglicéridos y colesterol plasmáticos, alteraciones en el perfil lipoproteico, así como un aumento en la oxidación de las lipoproteínas aterogénicas (artículo 6). El modelo de SM basado en una dieta alta en grasa saturada y colesterol provoca la alteración de la mayor parte de los parámetros comentados. Además, la edad es un factor de riesgo importante de las enfermedades crónicas, incluido el SM y la ECV.

Algunos artículos previos demuestran un efecto hipocolesterolemizante del silicio acompañado de un descenso de VLDL y LDL (Wachter *y cols.*, 1998; Peluso y Schneemanz, 1994). Estos resultados podrían a su vez explicar los beneficios del silicio observados a nivel cardiovascular (Trincă *y cols.*, 1999). Por ello, la evaluación de los efectos del silicio incluido en una matriz cárnica como ingrediente funcional a nivel de perfil lipoproteico y oxidación de lipoproteínas puede resultar altamente interesante.

Hipótesis: la adición de silicio a un reestructurado cárnico frena las alteraciones provocadas por una dieta rica en grasa saturada y colesterol en la composición y niveles de oxidación de lipoproteínas en ratas Wistar macho de 1 año.

Resultados: los tres grupos de ratas (C, Chol-C y Chol-Si) presentaron niveles equivalentes de ingesta, lo que demuestra una buena aceptación del cárnico con silicio. Sin embargo, la digestibilidad de la dieta Chol-Si fue la más baja de las tres debido al aumento en la excreción de heces encontrado. Además, el grupo Chol-Si disminuyó los niveles de lípidos plasmáticos (colesterol, fosfolípidos y triglicéridos), normalizando la masa total de VLDL hasta niveles del grupo C. Este resultado puede explicarse en parte por el aumento de la expresión del receptor de LDL (LDLr) en el grupo Chol-Si, lo que conlleva un aumento en la captación de VLDL e IDL más LDL por parte del hígado. Por último, se observó un descenso en el grado de oxidación de la fracción VLDL, registrándose menor peroxidación lipídica y formación de dienos conjugados. La menor oxidación puede deberse al aumento en el cociente arilesterasa/colesterol total, aunque el menor tiempo de permanencia de estas lipoproteínas en sangre por la mayor captación a nivel hepático pudo también favorecer este efecto.

Conclusiones: el silicio es capaz de revertir los efectos de una dieta con un contenido elevado de grasa saturada y colesterol sobre la lipemia, perfil lipoproteico y oxidación de lipoproteínas. La inclusión de silicio en un reestructurado cárnico para la obtención de un alimento funcional parece una buena estrategia tecnológica y nutricional para aumentar el consumo de este micronutriente esencial.



Silicon-Enriched Restructured Pork Affects the Lipoprotein Profile, VLDL Oxidation, and LDL Receptor Gene Expression in Aged Rats Fed an Atherogenic Diet¹⁻³

Alba Garcimartin,⁴⁻⁶ Jorge A Santos-López,^{4,6} Sara Bastida,⁵ Juana Benedi,⁴ and Francisco J Sánchez-Muniz^{5*}

Departments of ⁴Pharmacology and ⁵Nutrition and Food Science, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Background: Research has shown that silicon can play an important role in protecting against degenerative diseases. Restructuring pork by partially disassembling meat permits the incorporation of active components with potential functional effects. However, there has been no research to date on the impact that silicon, as a functional ingredient in restructured pork (RP), has on lipoprotein composition, metabolism, and oxidation.

Objective: This study was designed to evaluate the effect of silicon-enriched RP on lipemia, lipoprotein profile, and oxidation markers of aged rats fed high-fat, high-energy, cholesterol-enriched diets.

Methods: RP samples similar to commercial sausages (16% protein and 22% fat, wt/wt) were prepared by mixing lean pork and lard alone or with silicon (1.3 g Si/kg fresh matter) under controlled conditions and then freeze-dried. Saturated fat-rich diets were designed by mixing 78.3% purified diet with 21.7% freeze-dried RP. Three groups composed of 8 aged male Wistar rats (1 y old) were fed for 8 wk a control RP (C) diet, a cholesterol-enriched RP (Chol-C) diet (C diet enriched with 1.26% cholesterol plus 0.25% cholic acid, or a cholesterol and silicon-enriched RP (Chol-Si) diet (same as the Chol-C diet but containing silicon). Plasma lipid concentrations, lipoprotein profile, the degree of VLDL oxidation, and LDL receptor gene (*Ldlr*) expression were tested.

Results: Compared with the C diet, the Chol-C diet did not modify food intake or body weight but significantly increased ($P < 0.05$) plasma cholesterol (32%) and total lipids (19%), VLDL and intermediate density lipoprotein + LDL cholesterol (both >500%), total lipids and proteins (both >300%), and the degree of VLDL oxidation [conjugated dienes >250%; thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS), 900%] and reduced *Ldlr* expression (64%) and liver arylesterase activity (54%). The Chol-Si diet partially normalized changes induced by the Chol-C diet. Compared with the Chol-C group, Chol-Si rats had lower VLDL compound concentrations ($F < 0.001$; e.g., 75% less VLDL cholesterol) and VLDL oxidation (65% less conjugated dienes and 85% less TBARS) but greater *Ldlr* expression (200%).

Conclusions: Silicon added to RP strongly counterbalanced the negative effect of high-cholesterol-ingredient, functioning as an active hypocholesterolemic, hypolipemic, and antioxidative dietary ingredient in aged rats. *J Nutr* 2015;145:2039-45.

Keywords: Wistar rats, aging, silicon, restructured pork, lipids, lipoproteins, LDL receptor, VLDL oxidation

Introduction

Meat and meat products are widely consumed in developed countries. Although they are a good source of valuable nutrients

(protein and vitamins and/or minerals), there is much epidemiologic evidence relating meat consumption to degenerative ailments such as cardiovascular disease (CVD)¹ (1). Therefore, much research has been conducted on quantitative and/or qualitative modifications with a view to producing functional meats and meat products (2, 3). Restructuring pork by partially disassembling meat would allow for the incorporation of active

¹ Supported by AGL 2011-29644-C02-02 (Ministerio de Economía y Competitividad). A Garcimartin received a predoctoral fellowship (gran: BES-2012-054752) (Formación de Personal Investigador (FPI)).

² Authors disclosures: A Garcimartin, JA Santos-López, S Bastida, J Benedi, and FJ Sánchez-Muniz, no conflicts of interest.

³ Supplemental Table 1 is available from the "Online Supporting Material" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org>.

* These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: frasan@ucm.es.

² Abbreviations used: AE, arylesterase enzyme; AI, atherogenic index; C, control restructured pork; Chol-C, cholesterol-enriched restructured pork; Chol-Si, cholesterol and silicon-enriched restructured pork; CVD, cardiovascular disease; %a/fa, Zucker; *Ldlr*, LDL receptor gene; RP, restructured pork; SRB1, scavenger receptor B1.

Artículo 8

Effects of Silicon vs. Hydroxytyrosol-Enriched Restructured Pork on Liver Oxidation Status of Aged Rats Fed High-Saturated/High-Cholesterol Diets

Garcimartín A, Santos-López JA, Merino P, López-Oliva ME,
Bastida S, Benedí J, & Sánchez-Muniz FJ.

PloS one

Impact factor: 3.057 en 2015 (11 de 63 en Multidisciplinary Sciences)

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147469>

Antecedentes: el NAFLD es la manifestación del SM a nivel hepático (Than y cols., 2015). Dado que no existe hasta la fecha ningún tratamiento específico para esta patología, la primera medida consiste en una intervención dietética y algunos cambios en el estilo de vida (Castro y Silva., 2015). El elevado consumo de carne roja se ha relacionado con un aumento en la progresión de NAFLD a NASH (Zelber-Sagi y cols., 2007). El estrés oxidativo parece uno de los principales factores que participan en dicha progresión, y por ello, algunas sustancias con propiedades antioxidantes como la vitamina E han demostrado ser eficaces en el tratamiento del NAFLD. Las propiedades antioxidantes del silicio orgánico han sido discutidas en células de neuroblastoma como se expuso en el capítulo 1. Estudios previos con SiO₂ habían demostrado la capacidad del silicio para regular la expresión de enzimas antioxidantes en el cerebro de ratones intoxicados con aluminio (González-Muñoz y cols., 2008b). Por último, en el artículo 7 se demostró la capacidad del silicio administrado como ingrediente funcional para disminuir el grado de oxidación de las VLDL. El empleo de una dieta alta en grasa saturada y colesterol en roedores es un conocido modelo de NASH con el que se consigue la aparición de esteatosis, inflamación y estrés oxidativo (Takahashi y cols., 2012). El hidroxitirosol (HxT) es una sustancia con capacidad antioxidante reconocida que se ha empleado como ingrediente funcional con anterioridad (Cofrades y cols., 2011) y que reúne por ello las características para ser un buen control positivo.

Hipótesis: el silicio formando parte de un reestructurado cárnico como ingrediente funcional es capaz de reducir el estrés oxidativo a nivel hepático en ratas de 1 año alimentadas con una dieta rica en grasa saturada y colesterol como modelo de NASH.

Resultados: el grupo Chol-C presentó un perfil histopatológico compatible con NASH con una marcada esteatosis e infiltraciones de células inflamatorias. Además, la cantidad de GSSG en este grupo fue muy elevada, provocando el aumento del índice redox. En cuanto a las defensas antioxidantes, el consumo de la dieta Chol-C provocó la disminución de la actividad de catalasa y SOD y de los niveles de glutathion reductasa, el aumento de los niveles de glutathion peroxidasa y un marcado descenso en la expresión de Nrf2. En las ratas Chol-Si y Chol-HxT se observó un descenso del GSSG normalizándose el índice redox, un aumento de la actividad SOD, de la expresión de Nrf2 y de los niveles de glutathion reductasa, y menores niveles de glutathion peroxidasa. El grupo Chol-Si mostró un aumento mucho más acusado tanto de la expresión como de la actividad de SOD que el grupo Chol-HxT, y una mayor expresión de Nrf2. Ambos parámetros correlacionaron positivamente con la ingesta de silicio. El grupo Chol-HxT tuvo mayor expresión y niveles de glutathion reductasa y mayores niveles de glutathion peroxidasa y catalasa.

Conclusiones: el silicio actúa como hepatoprotector al disminuir el estrés oxidativo en un modelo de NASH en ratas Wistar de un año. El mecanismo parece estar basado en una importante activación de la enzima SOD a nivel de expresión y actividad, sugiriendo además la captación y eliminación directa de H₂O₂ por parte del silicio. La inclusión de este mineral en un reestructurado cárnico para la obtención de

un alimento funcional parece una buena estrategia tecnológica y nutricional para aumentar el consumo de este micronutriente esencial.

RESEARCH ARTICLE

Effects of Silicon vs. Hydroxytyrosol-Enriched Restructured Pork on Liver Oxidation Status of Aged Rats Fed High-Saturated/High-Cholesterol Diets

Jorge A. Santos-López¹ , Alba Garcimartín^{1,2} , Pinar Merino³, M. Elvira López-Oliva⁴, Sara Bastida², Juana Benedí¹, Francisco J. Sánchez-Muniz^{2*}

1 Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Department of Nutrition and Food Science, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Department of Biomedical Sciences, Teaching Unit of Toxicology, School of Pharmacy, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain, **4** Department of Physiology, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

 These authors contributed equally to this work.

* frasan@ucm.es



 OPEN ACCESS

Citation: Santos-López JA, Garcimartín A, Merino P, López-Oliva ME, Bastida S, Benedí J, et al. (2016) Effects of Silicon vs. Hydroxytyrosol-Enriched Restructured Pork on Liver Oxidation Status of Aged Rats Fed High-Saturated/High-Cholesterol Diets. *PLoS ONE* 11(1): e0147469. doi:10.1371/journal.pone.0147469

Editor: Manuel Portero-Otín, Universitat de Lleida-IRBLLEIDA, SPAIN

Received: September 29, 2015

Accepted: January 4, 2016

Published: January 25, 2016

Copyright: © 2016 Santos-López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Supported by AGL 2011-29644-C02-02. J. A. S.-L. received the foreign PhD studies fellowship from CONACYT-México, and A. G. received a predoctoral fellowship (grant BES-2012-054752) (FPI).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Pork is an essential component of the diet that has been linked with major degenerative diseases and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Previous studies have demonstrated the in vitro antioxidant activity of silicon (Si). Furthermore, when Si is added to restructured pork (RP) strongly counterbalances the negative effect of high-cholesterol-ingestion, acting as an active hypocholesterolemic and hypolipemic dietary ingredient in aged rats.

Objective

This study was designed to evaluate the effects of Si vs hydroxytyrosol (HxT) RP on liver antioxidant defense in aged rats fed cholesterol-enriched high saturated/high cholesterol diets as a NASH model.

Methods

Four diets were prepared: Control RP diet (C) with non-added cholesterol; Cholesterol-enriched high-saturated/high-cholesterol control RP diet (CHOL-C) with added cholesterol and cholic acid; Si- or HxT-RP cholesterol-enriched high-saturated/high-cholesterol diets (CHOL-Si and CHOL-HxT). Groups of six male Wistar rats (1-yr old) were fed these modified diets for eight weeks. Total cholesterol, hepatosomatic index, liver *Nrf2* and antioxidant (CAT, SOD, GSH, GSSG, GR, GPx) markers were determined.

Artículo 9

**Silicon alleviates non-alcoholic steatohepatitis reducing apoptosis in aged
Wistar rats fed a high-saturated/high-cholesterol diet**

Garcimartín A, López-Oliva ME, Santos-López JA, García-Fernández RA,
Macho-González A, Bastida S, Benedí J, & Sánchez-Muniz FJ.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity (en revisión)

Impact factor: 4.492 en 2015 (53 de 187 en Cell Biology)

Antecedentes: en el artículo 8 se demostró que el grupo Chol-C presentaba una histología hepática compatible con NASH y un incremento del estrés oxidativo. Por el contrario, el consumo de la dieta Chol-Si formulada con el cárnico funcional enriquecido en silicio fue capaz de mejorar las defensas antioxidantes y disminuir el índice redox respecto a Chol-C. Además del estrés oxidativo, estudios recientes destacan la importancia del proceso de lipoapoptosis en la progresión de NAFLD a NASH (Feldstein y cols., 2003). De hecho, actualmente se emplean marcadores específicos de apoptosis como predictores en el diagnóstico de NAFLD en la práctica clínica; y algunas terapias antiapoptóticas han demostrado ralentizar el proceso (Morgan y cols., 2016). El silicio en la forma de metil-silanotriol fue capaz de disminuir la apoptosis en células SH-SY5Y en presencia o ausencia de estrés oxidativo (artículos 1 y 2). Sin embargo, el efecto del Si sobre la progresión a NASH y sobre la lipoapoptosis no ha sido aún evaluada.

Hipótesis: el silicio, empleado como ingrediente funcional en una matriz cárnica, mediante un mecanismo antiapoptótico retrasa la aparición de NASH en un modelo de dieta con un elevado contenido en grasa saturada y colesterol.

Resultados: el diagnóstico del NAFLD/NASH se realizó histológicamente mediante la utilización del índice NAS (puntuación de 0 a 8) que tiene en cuenta la esteatosis, la inflamación lobular y la balonización. El grupo C presentó alteraciones típicas de NAFLD con esteatosis e inflamación lobular leve debido probablemente a la edad no muy avanzada de los animales y al consumo de una dieta alta en grasa saturada, pero sin colesterol. Los niveles de apoptosis en el grupo C fueron bajos según el método TUNEL y los niveles de caspasa 3 activada. Las ratas Chol-C tuvieron un valor medio para el índice NAS de 7 con esteatosis, inflamación lobular severa y balonización importante. En este grupo además presentó muy marcada apoptosis, con niveles altos de Bax, citocromo c, AIF, y caspasas 9 y 3 activadas, poniendo de manifiesto que la apoptosis ocurre por la vía intrínseca. Por último, el consumo de la dieta Chol-Si redujo la severidad de NASH de acuerdo con el índice NAS disminuyendo sobre todo la inflamación lobular y la balonización. Aunque el grado de apoptosis no se modificó según los criterios del índice NAS, sí se observó una mejoría de la misma en la zona 3. Además, la dieta Chol-Si previno la apoptosis al evitar la activación de la vía intrínseca. Las ratas Chol-Si mostraron menores niveles de marcadores pro-apoptóticos como Bax, citocromo c, AIF y las formas activas de las caspasas 9 y 3.

Conclusiones: el silicio presentó un efecto hepatoprotector al retrasar la progresión de fase NAFLD a NASH y bloquear parcialmente el proceso de lipoapoptosis que se produce a través de la vía intrínseca. La inclusión de silicio en un reestructurado cárnico para la obtención de un alimento funcional parece una buena estrategia tecnológica y nutricional para aumentar el consumo de este micronutriente esencial.

Silicon alleviates non-alcoholic steatohepatitis reducing apoptosis in aged Wistar rats fed a high-saturated/high-cholesterol diet

Alba Garcimartín^{1,2,*}, M. Elvira López-Oliva^{3,*}, Jorge A. Santos-López¹, Rosa A. García-Fernández⁴, Adrián Macho-González², Sara Bastida², Juana Benedí¹, Francisco J. Sánchez-Muniz²

¹Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain.

²Departamento de Nutrición y Bromatología I. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain.

³ Sección Departamental de Fisiología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain.

⁴ Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain.

*Can be considered first author of the paper

Running title: Silicon and NASH progression in aged rats

Contact information: Corresponding author. Francisco J. Sánchez-Muniz. Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Telephone number 0034913941828, fax number 0034913941810, frasan@ucm.es

Capítulo 3

Estudio del efecto hipoglucemiante e hipolipemiante del silicio *in vitro* e *in vivo*

Artículos integrados en este capítulo:

Journal of functional foods: en revisión.

Introducción

Los estudios sobre el efecto beneficioso del silicio en la ECV se basan en una mejoría en la arquitectura de los vasos, con una reducción en la formación de placas de ateroma; y una disminución del colesterol sanguíneo atribuido al descenso de lipoproteínas VLDL y LDL (Wachter y cols., 1998; Trincă y cols., 1999). En cuanto al mecanismo de acción sobre la DM2 se ha propuesto el descenso de glucosa en sangre y mejora de la respuesta a leptina y adiponectina entre otros (Maehira y cols., 2010). En el capítulo 2 de la presente memoria de Tesis Doctoral (artículo 7) se demostró que el silicio es un potente hipolipemiante que disminuye las concentraciones plasmáticas de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos en sangre en un modelo de SM inducido por una dieta alta en grasa saturada y colesterol. Además, se aportaron datos sobre el aumento de grasa en las heces del grupo Chol-Si, que pueden explicar en parte los bajos niveles basales de triglicéridos de estos animales. Dicho efecto se produjo con la administración de silicio inorgánico amorfo como ingrediente funcional de un reestructurado cárnico, y formando parte de una dieta alta en grasa saturada y colesterol. Sin embargo, el efecto del silicio a nivel intestinal sobre la digestión y absorción de lípidos e hidratos de carbono en el periodo postprandial no ha sido evaluado previamente y podría explicar, al menos parcialmente, los beneficios observados en dichas patologías.

Objetivos

- Estudiar el efecto *in vitro* del silicio sobre la enzima α -glucosidasa -actividad maltasa- implicada en la digestión de hidratos de carbono.
- Evaluar el efecto del silicio sobre la glucemia basal y postprandial comparando una administración aguda vs. subcrónica (1 semana) en ratas Wistar macho sanas de dos meses de edad.
- Evaluar el efecto del silicio en los niveles del transportador SGLT1 en duodeno y yeyuno después de 1 semana de administración en ratas Wistar macho sanas de dos meses de edad.
- Analizar el efecto del Si sobre la trigliceridemia basal y postprandial comparando una administración aguda vs. subcrónica (1 semana) en ratas Wistar macho sanas de dos meses de edad.

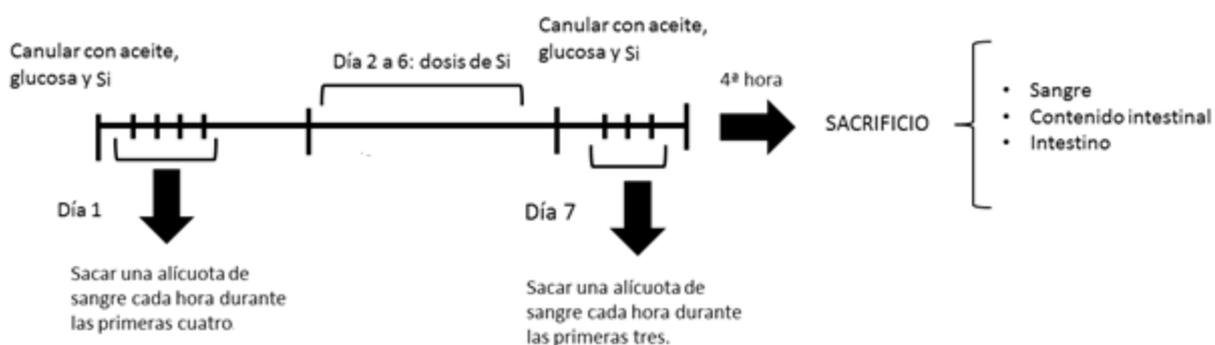
Diseño experimental del capítulo 2:

Forma química de silicio escogida: en este estudio empleamos de nuevo el silicio orgánico G57 (Glycan Group, Ginebra, Suiza) utilizado en el capítulo 1. Al ser una forma soluble fácilmente absorbible, permitió utilizar una concentración mucho menor. Esta forma de silicio puede incorporarse directamente en formulaciones líquidas, lo que resulta muy útil en el diseño de determinados alimentos funcionales. Por último, el cambio a una forma de silicio totalmente diferente a la empleada en el estudio *in vivo* ya discutido (capítulo 2) permite comprobar si los efectos observados son independientes de la forma de silicio empleada.

Ensayos *in vitro*: enzima α -glucosidasa -actividad maltasa-. Fuente de la enzima: extracto intestinal de rata.

Elección de la concentración de silicio empleada en el estudio *in vivo*: el grupo de tratamiento recibió 2mg/kg pc/día de silicio orgánico. Esta cantidad se eligió en base a las diferencias de consumo de silicio que existen entre los países occidentales respecto a los orientales. Como se comentó en la introducción (apartado 4.1.3), mientras la población occidental consume entre 20 y 50 mg de silicio /día; la oriental debido a la elevada proporción de productos vegetales en su dieta llega a consumir hasta 200 mg de silicio /día, que equivale aproximadamente a 3mg/kg pc. Según estos datos, para equilibrar la ingesta en los países occidentales sería necesario aportar 2 mg/kg pc/día extra de silicio.

Ensayos *in vivo*: se emplearon dos lotes de 6 ratas Wistar macho de unos dos meses de edad y aproximadamente 200 g de peso. Uno de los lotes se empleó como control y el otro se trató con silicio orgánico a una dosis de 2 mg/kg p.c. /día. Este estudio se subdivide en un experimento postprandial agudo (una sola dosis de silicio) y un experimento postprandial subcrónico después de 7 días de tratamiento. En ambos estudios postprandiales se administró 1mL de aceite de oliva y una dosis de glucosa de 500 mg. Además, en el grupo de tratamiento se administró una dosis de silicio de 2 mg/kg p.c. junto con el aceite y la glucosa. El esquema del estudio se puede observar en la **figura 14**.



Artículo 10

Hypoglycemic and hypolipemic properties of Silicon

Garcimartín A, Macho-González A, López-Oliva ME, Bastida S,
Benedí J, & Sánchez-Muniz FJ.

Journal of Functional foods (en revisión)

Impact factor: 3.973 en 2015 (8 de 124 en Food Science and Technology)

Antecedentes: la hiperglucemia postprandial se considera un factor de riesgo importante en la DM2 y se ha relacionado con las complicaciones micro- y macro-vasculares características de esta patología (Ceriello y cols., 2002). Una de las estrategias empleadas para controlar la glucemia postprandial consiste en inhibir la enzima α -glucosidasa (DiNicolantonio y cols., 2015). Los efectos del silicio en modelos de DM2 parecen estar relacionado con mecanismos antiinflamatorios y de modulación génica. Sin embargo, su efecto en la hiperglucemia postprandial no ha sido estudiado previamente. Por otra parte, en estudios previos se ha estudiado el efecto del silicio en la concentración basal de triglicéridos y colesterol plasmáticos, atribuyendo la reducción de los mismos a un descenso en la concentración de VLDL y LDL, y a algunos cambios en la composición de ácidos biliares. El impacto del silicio sobre la digestión y absorción de grasas podría contribuir con dicho efecto.

Hipótesis: el silicio orgánico es capaz de inhibir la digestión de hidratos de carbono y lípidos, reduciendo la hiperglucemia e hiperlipemia postprandial en ratas sanas.

Resultados: el aporte de silicio disminuyó la actividad maltasa de la enzima α -glucosidasa *in vitro* desde el minuto 15 al 90, reduciendo un 20% la pendiente de la recta respecto al control. En el estudio *in vivo*, el silicio orgánico a una concentración de 2 mg/mL modificó significativamente las concentraciones de glucosa postprandial después de una semana de administración. Comparando el estudio agudo y el subcrónico se observaron diferencias en el grupo del silicio a todos los tiempos estudiados, que pueden ser debidas tanto a la inhibición de la α -glucosidasa como al descenso en los niveles del transportador de glucosa SGLT1 en duodeno y yeyuno.

En relación a la concentración plasmática de triglicéridos, el silicio mostró un efecto hipotrigliceridemiante desde la primera dosis, disminuyendo la concentración en sangre a las 2 y 3 horas de la administración. Tras una semana de administración los efectos fueron más evidentes, reduciendo la concentración de triglicéridos desde la primera hora hasta la cuarta y retrasando el pico máximo desde la segunda a la tercera hora. La comparación entre el estudio agudo y subcrónico mostró diferencias significativas en el grupo del silicio en el basal y hasta la hora 3 del postprandial.

Conclusiones: el silicio presenta importantes efectos a nivel postprandial reduciendo la digestión/absorción de triglicéridos desde la primera dosis, y de glucosa a la semana de tratamiento. Se deben realizar más experimentos para evaluar los mecanismos implicados, sobre todo en el efecto hipolipemiente. Además, puede ser interesante comprobar este efecto en modelos de ECV, DM2 y SM. Este estudio demuestra la importancia del silicio como micronutriente esencial con efectos beneficiosos a muy corto plazo. El silicio orgánico puede ser un buen candidato dentro de las formas de silicio en el diseño de alimentos funcionales.

Hypoglycaemic and hypotriglyceridaemic postprandial properties of organic Silicon

Alba Garcimartín^{1,2,*}, M. Elvira López-Oliva^{3,*}, Adrián Macho-González², Sara Bastida², Juana Benedí¹, Francisco J. Sánchez-Muniz²

¹Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid, España.

²Departamento de Nutrición y Bromatología I. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid, España.

³ Sección Departamental de Fisiología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid, España.

Running title: Postprandial effects of silicon

Contact information: Corresponding author. Francisco J. Sánchez-Muniz. Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Telephone number 0034913941828, fax number 0034913941810, frasan@ucm.es

DISCUSIÓN

Discusión

En la actualidad son cada vez más frecuentes los estudios que describen los efectos beneficiosos del silicio en la salud, considerándose hoy en día un micronutriente esencial. A pesar de ello, los mecanismos responsables de dichos efectos saludables son en la mayoría de los casos desconocidos. La falta de estudios poblacionales que demuestren la sintomatología asociada a una deficiencia de silicio explica que no se haya definido todavía sus ingestas de referencia. Este aspecto dificulta enormemente la identificación de grupos de población con ingestas inadecuadas, que podrían beneficiarse de la recomendación de consumir alimentos con alto contenido en este mineral o de la suplementación de la dieta con formas biodisponibles de silicio. Es importante tener en cuenta también que, por su ciclo biogeoquímico, la cantidad de silicio disponible para la biosfera está reduciéndose de forma progresiva (Exley, 1998). Este hecho, añadido a que la concentración de silicio en el agua y en los alimentos es altamente dependiente de la zona geográfica (Birchall y Exley, 1992), hace pensar que la ingesta sub-óptima de silicio sea prevalente. Por tanto, la investigación de los mecanismos por los que el silicio ejerce sus efectos sobre la salud podría ayudar a identificar los síntomas asociados a su deficiencia y contribuir a definir las ingestas de referencias.

1. Mecanismos de protección del silicio en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

El consumo de silicio afecta de forma importante al sistema óseo-articular, conociéndose muchos de los mecanismos mediante los cuales el silicio ejerce dicha acción (Rodella y cols., 2014). Sin embargo, en base a estudios epidemiológicos, el efecto neuroprotector del silicio (Rondeau y cols., 2009) ha sido atribuido fundamentalmente a la capacidad del silicio para secuestrar aluminio, bloqueando especialmente la absorción de este metal tóxico a nivel intestinal (Frisardi y cols., 2010) y promoviendo su excreción en orina (Davenward y cols., 2013). El tratamiento con silicio en ratones intoxicados con aluminio demostró disminuir el estrés oxidativo cerebral y modular genes pro-inflamatorios, y nuevamente el mecanismo propuesto se basó en la interacción de este mineral con aluminio (González-Muñoz y cols., 2008b).

A raíz de todos estos estudios, nos planteamos como objetivo principal del **capítulo 1** estudiar si en el efecto neuroprotector del silicio podrían estar implicados otros mecanismos no necesariamente relacionados con el aluminio. Para ello decidimos analizar el efecto del silicio en ausencia y presencia de H_2O_2 sobre tres aspectos fundamentales de la EA: estrés oxidativo, muerte celular y actividad acetilcolinesterasa. El estrés oxidativo parece ser una de las primeras alteraciones que tienen lugar en la EA (Jomova y cols., 2010). Las terapias antioxidantes, recomendadas actualmente en la prevención y tratamiento de la EA (Bonda y cols., 2010), deben reducir el nivel de ROS y mejorar el sistema antioxidante endógeno (Firuzi y cols., 2011). La muerte de neuronas tanto por apoptosis como por

necrosis conducen a la neurodegeneración progresiva propia de la EA (Rao y Balachandan, 2002). Actualmente se está realizando una búsqueda activa de compuestos para prevenir la muerte neuronal y evitar la evolución de la enfermedad. Estas estrategias serían mayoritariamente preventivas ya que para ser eficaces se tendrían que aplicar en la fase prodrómica de la enfermedad (Sevigny y cols., 2016; Golde, 2009). Por último, la EA se caracteriza por un déficit de acetilcolina que se ha relacionado con la pérdida de memoria (Giacobini, 1990). Los inhibidores de AChE constituyen el tratamiento de elección en la EA; no obstante, algunos estudios cuestionan sus beneficios ya que se administran en una etapa avanzada de la patología cuando el daño es irreversible y por ello sus efectos suelen ser sólo moderados y transitorios (García-Ayllón y cols., 2011).

Los experimentos realizados con silicio en ausencia de estrés oxidativo, mediado por H₂O₂, revelan un comportamiento protector o tóxico del silicio que viene determinado por la concentración a la que se encuentre (**artículo 2 y 3**). Mientras a concentraciones bajas (100 y 250 ng/mL) el silicio demostró un efecto antiapoptótico, a concentraciones más altas promovió la muerte celular tanto por necrosis, al incrementar la peroxidación lipídica, como por apoptosis a través de la activación de la vía extrínseca mediada por TNF- α (**artículo 2**). Asimismo, activó la enzima AChE aumentando su V_{max} (**artículo 4**). Según Pruksa y cols. (2014) la tasa de excreción renal de silicio es elevada. Por ello, parece difícil alcanzar concentraciones muy elevadas de este mineral, y por tanto potencialmente tóxicas, en el organismo en general y en el cerebro en particular. Esta situación podría comprometerse en pacientes con insuficiencia renal o sometidos a diálisis en los que se ha observado un aumento de las concentraciones de silicio en plasma (D'Haese y cols., 1995; Miura y cols., 2002).

El H₂O₂ se empleó como agente tóxico causante de estrés oxidativo. Es una sustancia ampliamente utilizada en cultivos celulares y presenta la ventaja de que es producida de forma natural por las neuronas (Andersen y cols., 2004). Se eligió la concentración de 400 μ M a la que demostró reducir la viabilidad celular un 40% (**artículo 1**). Este efecto deletéreo causado por el tratamiento con H₂O₂ se debe, como ocurre en la EA, a la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis (Behl, 2000). Además de inducir estrés oxidativo y muerte celular, el H₂O₂ aumentó la actividad AChE incluso a dosis muy bajas (1 μ M) (**artículo 3**). Este dato es relevante ya que en enfermos de EA se ha detectado en las placas seniles un aumento en la actividad de AChE, aunque esta activación se atribuye a la presencia de A β (Sánchez-Chaves y Salceda, 2008). Nuestros resultados demuestran que el H₂O₂ se comporta como un activador alostérico de la enzima, modificando su V_{max} por una acción directa sobre la estructura de la enzima; lo que agravaría el déficit de acetilcolina característico de la EA. A concentraciones altas, el H₂O₂ redujo los niveles totales de AChE y modificó la composición de isoformas de la misma, probablemente alterando funciones no relacionadas con la actividad catalítica de esta proteína (**artículo 3**). Este estudio también sugiere que existe una relación entre el estrés oxidativo y el déficit en el sistema colinérgico. Así, resultados inéditos de nuestro grupo no publicados indican que el H₂O₂ causa en células

SH-SY5Y una disminución en los niveles de ChAT, enzima de síntesis de acetilcolina, apoyando la hipótesis de una mayor susceptibilidad de las células colinérgicas al estrés oxidativo. Ahmad y cols. (2012), en un modelo de isquemia cerebral en rata, atribuyeron el descenso de los niveles de ChAT al estrés oxidativo.

Dada la importancia del estrés oxidativo en la EA, existen multitud de estudios sobre nuevas terapias antioxidantes (Di Domenico y cols., 2015). Así, en un estudio prospectivo realizado en 5395 participantes (Engelhart y cols., 2002) se comprobó que el consumo de una dieta rica en sustancias antioxidantes como la vitamina C y la vitamina E reduce el riesgo de EA. Zhang y cols. (2012) relacionaron el estrés oxidativo, el déficit colinérgico y el A β soluble en etapas muy tempranas de la EA, por lo que recomiendan una terapia antioxidante preventiva. El efecto antioxidante del silicio se evaluó en presencia de H₂O₂ en células SH-SY5Y (**artículos 1 y 4**). El silicio bloqueó el efecto tóxico del H₂O₂ reduciendo la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, y disminuyó la concentración intracelular de ROS y la peroxidación lipídica (**artículo 1**). El silicio, en presencia de H₂O₂, demostró también ser capaz de mantener la actividad AChE a niveles observados en las células control. El tratamiento simultáneo con silicio provocó la disminución de la V_{max} a todas las concentraciones de H₂O₂ ensayadas, y aumentó la K_m sólo a la concentración más alta (1000 μ M) (**artículo 4**). Por tanto, el mecanismo del silicio implicado en los efectos observados en los **artículos 1 y 4** parece estar relacionado con un efecto antioxidante. Igualmente, en el **artículo 2** se demostró la capacidad antioxidante del silicio mediante una modificación del método ORAC (Ganske y Dell, 2006) en la que se evalúa el descenso de la formación de ROS mediado por el AAPH (**artículo 2**).

En conjunto los resultados demuestran que el silicio presenta propiedades antioxidantes y antiapoptóticas que explican, junto con su capacidad para limitar la acumulación de aluminio, el efecto neuroprotector observado en algunos estudios epidemiológicos (Gillette-Guyonnet y cols., 2007). El efecto antiapoptótico observado en el **artículo 2** sugiere que la presencia de silicio en ausencia de estrés oxidativo garantizaría la supervivencia de las neuronas, dificultando con ello el proceso de neurodegeneración. Además, el silicio ayudaría de forma preventiva a controlar el estrés oxidativo evitando que la acumulación de ROS produjera alteraciones mayores gracias a su capacidad para contrarrestar el efecto tóxico del H₂O₂.

Este efecto es especialmente relevante ya que al aumento de estrés oxidativo asociado a la edad (Cencioni y cols., 2013) se suma el hecho de que el cerebro es especialmente sensible al daño oxidativo (Andersen, 2004). A este respecto Mariani y cols. (2005) señalaron que el cerebro presenta menor actividad catalasa y glutatión peroxidasa que otros órganos, lo que se traduce en una menor efectividad en la eliminación del H₂O₂. Por ello, la neutralización del H₂O₂ por el silicio puede ser muy beneficiosa. Por último, en una situación de estrés oxidativo, el mantenimiento de la actividad AChE en valores normales

sería un beneficio adicional del silicio para proteger al SNC del déficit colinérgico, retrasando con ello la aparición de síntomas cognitivos.

2. Impacto del consumo de silicio en un modelo de NAFLD en ratas viejas

Como se comentó en la introducción, muchos estudios defienden en la progresión de NAFLD a NASH la importancia de la apoptosis (Spahis y cols., 2016; Feldstein y Gores, 2005) y el estrés oxidativo (Gambino y cols., 2011). Por ello, aunque no existe ningún tratamiento específico para esta patología, se ha propuesto como alternativa terapéutica la utilización de compuestos con actividad antiapoptótica y antioxidante (Hossain y cols., 2016). Dadas las propiedades antioxidantes y antiapoptóticas del silicio ya discutidas (**artículos 1 y 2**), nos planteamos estudiar el posible papel protector del silicio en el NAFLD (**artículos 7 a 9**).

El uso del silicio como ingrediente funcional ha sido propuesto como una posible estrategia para aumentar su consumo (Canham, 2014). En nuestro estudio, decidimos emplear el silicio como ingrediente funcional por varias razones. En primer lugar, teniendo en cuenta que la modificación de la dieta es la primera medida que se toma en pacientes con NAFLD (Castro y Silva., 2015), la propuesta de un alimento funcional aseguraría una administración temprana del silicio. Además, los alimentos funcionales gozan en la actualidad de una gran aceptación por parte de los consumidores, ya que les ofrecen beneficios sobre la salud sin necesidad de cambiar sus hábitos alimentarios. Por último, dado que el silicio de calidad alimentaria (E551) es ampliamente utilizado como aditivo alimentario, su perfil de seguridad está garantizado, y puede añadirse de forma sencilla en la dieta de los animales de experimentación. La segunda decisión importante en el diseño de un alimento funcional es la matriz a la que se va a incorporar el ingrediente. A este respecto, el elevado consumo de carne en países occidentales y la diversidad de productos derivados comercializados en la actualidad hacen de la carne una matriz adecuada para formular alimentos funcionales (Sánchez-Muniz, 2004; Sánchez-Muniz, 2005; Jiménez-Colmenero y cols., 2010; Olmedilla Alonso y cols., 2013). La adición de ingredientes bioactivos consigue no sólo aportar a este alimento propiedades que no tiene, sino que también consigue contrarrestar alguno de los efectos potencialmente negativos asociados a su consumo (Celada y Sánchez-Muniz, 2016; Celada y cols., 2016a) (**artículos 5 y 6**). En este sentido, la inclusión de *Himanthalia elongata* en un reestructurado cárnico bloqueó el efecto activador *in vitro* de la carne sobre la enzima α -glucosidasa (**artículo 5**), y mantuvo la capacidad inhibidora del alga (Schultz Moreiray cols., 2014). Los cárnicos funcionales elaborados con algas demostraron beneficios en marcadores de SM en un modelo de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en colesterol y ácido cólico (**artículo 6**).

Nuestro modelo de NAFLD se induce mediante el consumo de una dieta rica en colesterol y ácido cólico, con una proporción elevada de AGS y un 20% de liofilizado cárnico. Esta dieta se asemeja a la

consumida actualmente en muchos países occidentales y está asociada al aumento de riesgo de NAFLD (Zelber-Sagi *y cols.*, 2007). Se utilizaron ratas de 1 año, ya que la edad es un factor de riesgo de esta patología (Than y Newsome, 2015). Además, para poder interpretar correctamente los resultados obtenidos hay que tener en cuenta que las ratas viejas presentan ciertas particularidades respecto a las jóvenes. Así, está descrito que la edad tiene un efecto anorexígeno que provoca una disminución de la ingesta respecto a animales jóvenes (Nesic *y cols.*, 2013). También se ha observado en ratas, al igual que ocurre en humanos, que los niveles de colesterol plasmático tienden a incrementarse con la edad (Erdoğan *y cols.*, 1997; Uchida *y cols.*, 1978). El envejecimiento se ha asociado a su vez con una disminución en los niveles de LDLr, que limita la recaptación de partículas VLDL y LDL por el hígado (Pallottini *y cols.*, 2006). Otra característica de las ratas viejas es la mayor propensión a acumular grasa en los hepatocitos provocando la aparición de esteatosis e inflamación incluso cuando se alimentan con una dieta *chow* (Gupte *y cols.*, 2010). En relación a las alteraciones del sistema antioxidante endógeno asociadas al envejecimiento, existe un aumento del cociente GSSG/GSH provocado principalmente por el descenso de los niveles de GSH, y que se traduce en una menor efectividad del sistema redox (Iantomasi *y cols.*, 1993). Los niveles de glutatión pueden verse parcialmente afectados por los niveles reducidos de Nrf2 propios de animales viejos (Okada *y cols.*, 2012). Por último, el proceso de envejecimiento está muy ligado a la disfunción mitocondrial debida en gran medida a la mayor producción y acumulación de ROS (Cencioni *y cols.*, 2013). Cascales Angosto (2015) señala que con la edad se induce una disminución de la mitocondriogénesis, resultando en una menor producción de ATP y mayor generación de ROS. El daño mitocondrial promueve alteraciones en la membrana mitocondrial y favorece la muerte celular a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Begriche *y cols.*, 2006; Nassir e Ibdah, 2014).

Todas estas diferencias ligadas al proceso de envejecimiento fueron confirmadas al comparar el grupo control (grupo C) (**artículos 7, 8 y 9**) con los controles de ratas Wistar jóvenes analizados en estudios previos del grupo (Olivero-David *y cols.*, 2011; Schultz-Moreira *y cols.*, 2014b).

Las ratas C presentaron una histología compatible con NAFLD (**artículo 9**), con esteatosis e inflamación leve que pueden ser debidas a la conjunción de la edad con el consumo de una dieta rica en AGS (Sheedfar *y cols.*, 2013). El consumo de dietas con alto contenido en energía y AGS incrementa la lipogénesis en tejido adiposo (Sánchez-Muniz y Sanz Pérez, 2015 y 2016). El tejido adiposo visceral se encuentra directamente conectado con el hígado a través de la vena porta, lo que representa una amenaza para este órgano, cuya integridad y funcionalidad pueden estar comprometidas por el exceso de aporte de AGL (Arner, 2002). El exceso de ácidos grasos que llegan al hígado contribuye a la formación incrementada de VLDL enriquecidas en triglicéridos, aspecto clave de la lipemia observada en muchos ancianos y particularmente en la DM2 (Carmena, 2010). Aunque el transporte de colesterol se realiza fundamentalmente por la fracción HDL, es llamativa la presencia incrementada de IDL+LDL en estas ratas C y la mayor contribución de las partículas IDL+LDL en el transporte de lípidos (11% en el **artículo**

7) respecto a ratas jóvenes con dieta control (4% según Olivero-David y cols., 2011). Debe recordarse que la rata no obesa/no diabética presenta niveles muy reducidos de LDL-colesterol (Sánchez-Muniz y Bastida, 2008) y de lipoproteínas remanentes por existir una transferencia muy limitada de componentes de VLDL a las LDL y por la captación muy rápida de las VLDL por el hígado (Bilheimer y cols., 1972). El incremento de las lipoproteínas aterogénicas parece también ligado a la reducción del LDLr asociado a la edad, que limitaría la recaptación de las lipoproteínas por parte del hígado, permaneciendo más tiempo en sangre y favoreciendo la formación de LDL desde las VLDL (Morgan y cols., 2016).

La esteatosis hepática se ve influida por las alteraciones en el perfil lipoproteico presentes en el grupo C (García y cols., 2015). El exceso de lípidos en los hepatocitos puede desencadenar la muerte celular por lipoapoptosis, muy ligado al NAFLD/NASH (Feldstein y cols., 2003). En los animales del grupo C se aprecia la salida de citocromo c al citosol, sugiriendo la afectación de la membrana mitocondrial, aunque la apoptosis de los hepatocitos se mantiene en niveles basales (**artículo 9**). Probablemente el hecho de que el citocromo c liberado no llegue a desencadenar la muerte celular se deba a la presencia de mayores niveles de la proteína de choque térmico 27 (Hsp-27). El papel protector de esta proteína se basa entre otros en el bloqueo del citocromo c, impidiendo la activación de la caspasa 9 (Bruey y cols., 2000), y ha sido descrito en modelos hepáticos de daño por isquemia/reperfusión (Chen y cols., 2009). La alteración mitocondrial en el grupo C puede ser debida a la acumulación de ROS, posiblemente como consecuencia de la ineficacia del sistema redox, que presentó, al contrario de lo encontrado en ratas jóvenes (Schultz y cols., 2010), mayores niveles de GSSG que de GSH (**artículo 8**). A continuación, se exponen los principales resultados obtenidos. Para una más fácil lectura y comprensión se incluye en la **Figura 15** un resumen de los puntos metabólicos claves que ocurren en las ratas viejas alimentadas con dieta con elevada cantidad de AGS que hemos llamado “control” (grupo C).

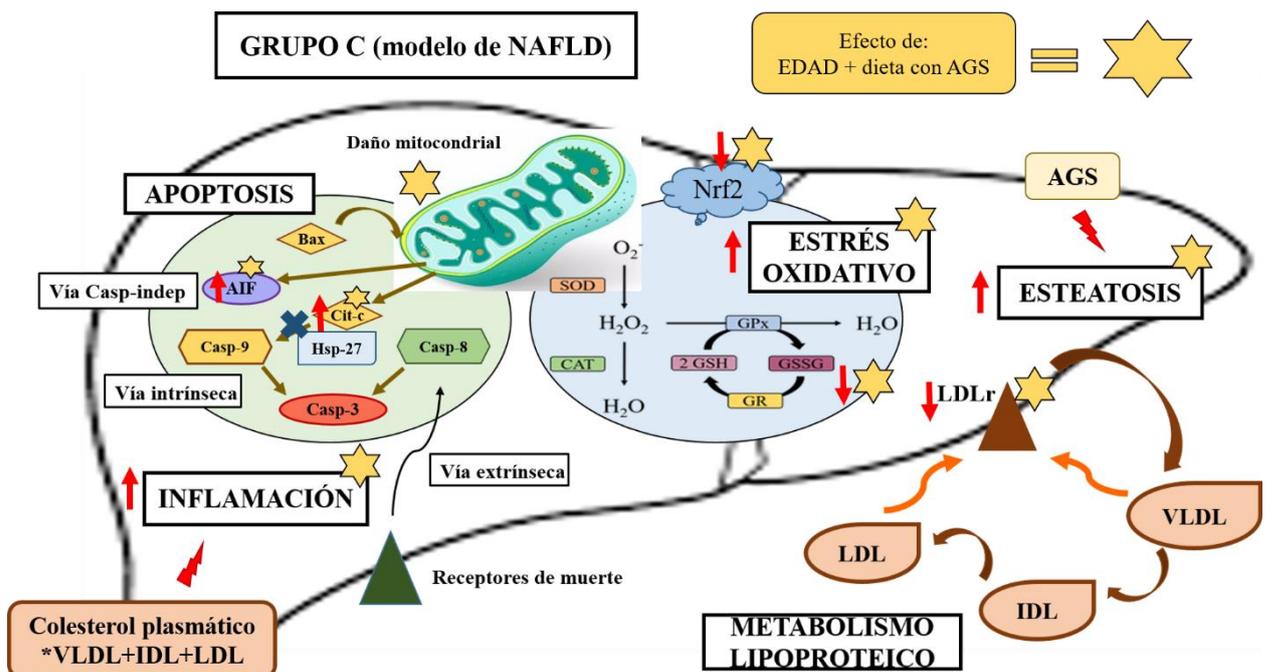


Figura 15. Mecanismos probables inducidos en ratas viejas por el consumo de dieta enriquecida en ácidos grasos saturados y energía.

La adición de colesterol y ácido cólico a la dieta promovió la progresión del NAFLD, observándose en el grupo Chol-C un perfil histológico hepático con signos como balonización e infiltración inflamatoria severa característicos del NASH (**artículo 9**). Varios acontecimientos provocados por el consumo de la dieta Chol-C pueden estar implicados en la aparición de NASH. Entre ellos destacan los relacionados con el metabolismo lipoproteico, el estrés oxidativo y la lipoapoptosis. En primer lugar, las ratas Chol-C presentaron mayores niveles de lípidos plasmáticos, y un metabolismo lipoproteico profundamente modificado respecto al grupo C, y similar al observado en pacientes con NAFLD/NASH (García y cols., 2015). La fracción VLDL, que ha sido la más relacionada con el SM (Cali y cols., 2007), fue la más afectada por la dieta Chol-C, con variaciones tanto en sus niveles como en su composición, mostrando un perfil característico de partículas β -VLDL enriquecidas en colesterol (**artículo 7**). El aumento significativo de los niveles de VLDL en plasma, junto con los de IDL+LDL, está favorecido por el marcado descenso en los niveles de LDLr debido a la edad y potenciado por la dieta Chol-C. Además, las partículas VLDL de las ratas Chol-C se encuentran más oxidadas como consecuencia del mayor tiempo de permanencia en sangre (menor LDLr), y por la menor protección antioxidante por la arilesterasa de las HDL. La presencia de VLDL oxidadas pueden igualmente promover la progresión a NASH (Kang y Chen, 2009). En relación al estrés oxidativo como segundo factor implicado en la progresión a NASH, el grupo Chol-C presenta menor expresión de Nrf2 acompañado de una menor efectividad del sistema de defensa antioxidante endógeno, por la expresión y actividad reducidas de catalasa y SOD. El sistema de glutatión afectado en primer lugar por la edad de los animales, se ve negativamente influido también por la dieta Chol-C, mostrando mayores niveles de GSSG debidos a la disminución de glutatión reductasa y el aumento de glutatión peroxidasa. Este aspecto ha sido encontrado de forma repetida por nuestro grupo en ratas alimentadas con colesterol (p.ej. o Vázquez-Velasco y cols., 2014). Por último, la lipoapoptosis, estrechamente relacionada tanto con el metabolismo lipoproteico (**artículo 7**) como con el estrés oxidativo (**artículo 8**), tiene un papel determinante en la progresión a NASH, tal y como se observa en la correlación positiva entre el TUNEL de hepatocitos y el índice NAS (**artículo 9**). Las ratas Chol-C tienen altos niveles de apoptosis. Esta apoptosis ocurre por mecanismos caspasa-dependiente, que afecta tanto a hepatocitos como a células inflamatorias infiltradas; y caspasa-independiente vía AIF que sólo se observa en hepatocitos. Dentro de las vías dependientes de caspasa, se detecta en las ratas Chol-C activación de la vía intrínseca por caspasa 9 (**artículo 9**), y de la vía extrínseca por caspasa 8 (datos no publicados).

Aunque no forma parte de los objetivos de la presente memoria de Tesis Doctoral, se debe tener en cuenta que las ratas Chol-C muestran RI provocada por la conjunción dieta saturada-edad y agravada por los altos niveles de colesterol en la dieta (datos de glucosa, niveles de insulina e índices HOMA no

mostrados). Uno de las primeras respuestas a la RI es la llegada masiva de AGL al hígado procedentes del tejido adiposo, originando un incremento de la síntesis de triglicéridos y esteatosis. Este mecanismo de almacenamiento en forma de triglicéridos podría considerarse protector, a pesar de favorecer la esteatosis hepática, ya que evitaría en último término la acumulación de otras sustancias como AGS o colesterol libre o esterificado, que son lipotóxicas y que se relacionan con la progresión de NAFLD a NASH (Alkhoury y cols., 2009). El aumento de triglicéridos en plasma observado en las ratas Chol-C respecto a las C está relacionado con la mayor liberación desde el hígado de la fracción VLDL plasmática, posiblemente como mecanismo paliativo frente a la esteatosis, y su menor recaptación promovida por los menores niveles de LDLr (**artículo 7**). A continuación, reseñamos algunas correlaciones encontradas entre las variables analizadas que permiten reafirmar los aspectos de esta discusión y aclarar los mecanismos por los que creemos se produce la progresión de NAFLD a NASH. Algunas de las más importantes son:

- Los triglicéridos en plasma, principalmente los transportados por VLDL e IDL+LDL, correlacionaron positiva y significativamente con marcadores de estrés oxidativo (glutathion peroxidasa y GSSG); y con marcadores de la vía intrínseca de la apoptosis (relación Bax/Bcl-2 en la mitocondria, niveles de AIF citosólico y caspasa 9 activa 26 kDa y 10 kDa). Esta relación de los triglicéridos de las VLDL con el estrés oxidativo y la vía intrínseca de la apoptosis parece indirecta y derivada del aumento de AGL que llegan al hígado, promoviendo ambos procesos: a) la síntesis de triglicéridos y por tanto de VLDL y b) la lipotoxicidad que conduce al estrés oxidativo y muerte celular por alteración mitocondrial. La translocación de Bax a la mitocondria favorecería la apertura de poros que permiten la salida de citocromo c y AIF responsables respectivamente de la vía intrínseca caspasa-dependiente y de la vía caspasa-independiente. Malhi y Gores (2008) sugieren que los AGL, fundamentalmente los AGS, promueven la formación de ROS y la permeabilización de la membrana mitocondrial. Es importante recordar en este punto que todas las dietas experimentales empleadas son ricas en AGS.
- El colesterol en plasma, y sobretodo el transportado por VLDL e IDL+LDL, está positivamente correlacionado con los parámetros histológicos (inflamación lobular, balonización e índice NAS); y con marcadores de apoptosis (TUNEL especialmente de células inflamatorias, caspasa 8 activa 18-kDa y caspasa 3 activa 10-kDa). En este sentido, el colesterol parece el responsable de perpetuar la respuesta inflamatoria característica de la progresión de NAFLD a NASH. Además, promueve la muerte celular a través de la vía extrínseca mediada por receptores de muerte e íntimamente relacionada con la inflamación. Farrell, y Van Rooyen (2012) relacionaron el colesterol del hígado con la infiltración inflamatoria y balonización de los hepatocitos. Vázquez-Velasco (2015) y González-Torres (2016) encontraron incrementos muy marcados de marcadores

inflamatorios en el hígado de ratas fa/fa alimentadas con dietas enriquecidas en grasa saturada y colesterol, reforzando los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

En la **Figura 15** se resumen las principales alteraciones provocadas por la dieta con colesterol y ácido cólico en el grupo Chol-C.

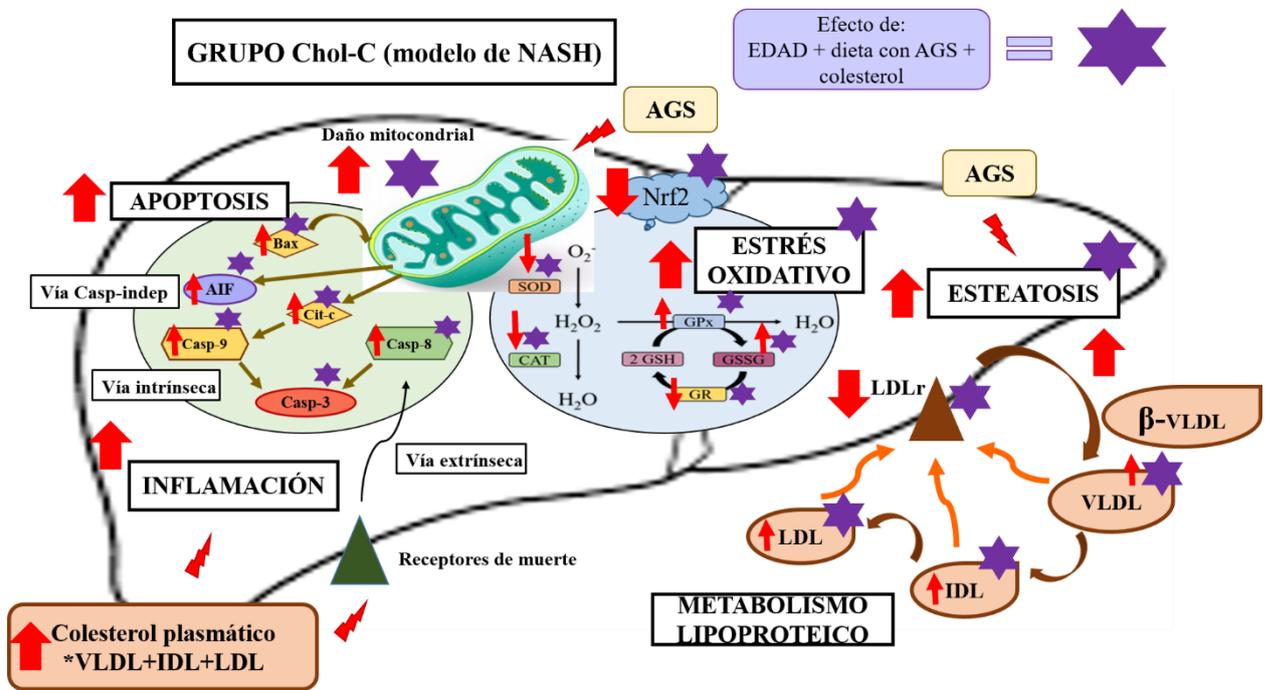


Figura 16. Principales alteraciones observadas en el grupo Chol-C tras la ingesta de una dieta rica en AGS, colesterol y ácido cólico.

Finalmente, la inclusión de silicio como ingrediente funcional en la dieta enriquecida en AGS y colesterol (Chol-Si) promovió una mejora significativa de muchos de los marcadores estudiados. La evaluación histológica del hígado de las ratas del grupo Chol-Si pone de manifiesto un descenso significativo del índice NAS por una disminución evidente de la inflamación lobular y la balonización, evitando incluso la progresión a NASH en un 25% de los animales que se mantienen en niveles 3-4 de índice NAS (**artículo 9**). Estos resultados coinciden con la reducción del índice hepatosomático, marcador de hepatomegalia y daño hepático (Sánchez-Muniz y cols., 2003) respecto a Chol-C (**artículo 8**). Se han detectado varios mecanismos que pueden participar en este efecto hepatoprotector. En primer lugar, las ratas Chol-Si presentan unos niveles de colesterol plasmático similares a los de las ratas C (que no habían consumido colesterol y ácido cólico en su dieta) y significativamente más bajos a los de las ratas Chol-C. A este efecto hipocolesterolemizante hay que sumar el marcado efecto hipotriglicéridemizante encontrado en el grupo Chol-Si, con niveles de triglicéridos plasmáticos muy por debajo de los de las ratas Chol-C e incluso de las C (**artículo 7**). En relación al perfil lipoproteico, los principales cambios se encuentran a nivel de la fracción VLDL, ya que la adición de silicio respecto al Chol-C reduce de forma significativa (2-3 veces) tanto la masa total de VLDL como su contenido en lípidos y proteínas, llegando

a niveles no significativamente diferentes a los de las ratas C. No obstante, las VLDL del grupo Chol-Si están enriquecidas en proteínas y fosfolípidos y reducidas en triglicéridos respecto a las VLDL del grupo C, sugiriendo ser algo más pequeñas y más metabolizadas (Carmena, 2009; Sánchez-Muniz, comunicación personal). También es relevante que el grado de oxidación de las mismas sea muy inferior al de las VLDL del grupo Chol-C y no significativamente diferente a las VLDL del grupo C. Entre las explicaciones a esta menor oxidación de las VLDL podríamos destacar los niveles más altos (expresión) de LDLr en comparación a los de Chol-C (**artículo 7**), lo que permitiría una mayor recaptación de las mismas a nivel hepático, favoreciendo un menor tiempo de permanencia en sangre y por tanto reduciendo su agresión por agente oxidantes. Además, se detecta en el grupo Chol-Si una actividad arilesterasa a nivel hepático significativamente más elevada que en el grupo Chol-C (**artículo 7**) cuya función parece ser pleiotrópica (Vázquez-Velasco, et al., 2011), no sólo protegiendo a todas las lipoproteínas de su oxidación (Canales y Sánchez-Muniz, 2003; Nus y cols., 2007; Nus y cols., 2008), sino actuando como una enzima suicida preservando los niveles de otras enzimas antioxidantes (Vázquez-Velasco, et al., 2011; Aviran y cols. 1998). La mejora del estatus antioxidante en el grupo Chol-Si se confirma además por el incremento observado en la expresión de Nrf2 y por consiguiente en la expresión y actividad de SOD, que garantiza la conversión del anión $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (**artículo 8**). La actividad del resto de enzimas antioxidantes y los niveles de GSSG sugieren que el silicio actúa como un antioxidante soluble eliminando el H_2O_2 , tanto el generado por la célula como el procedente del $O_2^{\cdot-}$. Este mecanismo del silicio encontrado en un modelo de NAFLD/NASH coincide con el propuesto en el **artículo 2** en las células SH-SY5Y tratadas con silicio orgánico. La hipótesis sobre la eliminación de H_2O_2 por parte del silicio explica que la cantidad de GSSG sea similar en las ratas Chol-Si y C, a pesar de que en las Chol-Si los niveles de glutation peroxidasa son marcadamente más bajos y los de glutation reductasa varían ligeramente. A su vez, la actividad catalasa se mantiene a niveles tan bajos como los de Chol-C, pero con una actividad SOD muy alta como ya hemos explicado, lo que apoya la idea de la eliminación de H_2O_2 por otro mecanismo.

Por último, cuando se analizaron los marcadores relacionados con la muerte celular en las ratas Chol-Si se detecta una disminución significativa de la apoptosis en comparación con Chol-C (**artículo 9**). Al estudiar los diferentes mecanismos de apoptosis encontramos en las vías caspasa-independiente e intrínseca, relacionadas con la mitocondria, que la dieta Chol-Si disminuye todos los marcadores de forma significativa en relación a Chol-C, mejorando incluso en algunos marcadores respecto a C. También, en las ratas Chol-Si observamos unos niveles más altos de citocromo c en la mitocondria, y más bajos de AIF en el citosol, lo que sugiere que la membrana mitocondrial se mantiene intacta, y en mejor estado que las de las ratas Chol-C e incluso que las del grupo C, lo que es a todas luces relevante. Como consecuencia de la menor salida de citocromo c se aprecia una menor activación de caspasa 9 (**artículo 9**). En un estudio complementario no publicado, hemos encontrado que la vía extrínseca de la apoptosis en las ratas Chol-Si está menos activada que en las Chol-C, tal como se sugiere por los niveles

significativamente más bajos de caspasa 8 activa. Todos los resultados de las vías apoptóticas en su conjunto explican que los niveles de caspasa 3 10-kDa sean similares a los de las ratas C (**artículo 9**), demostrando en último término el efecto antiapoptótico del silicio previamente discutido en células SH-SY5Y (**artículos 1 y 2**).

En la **Figura 17** se detallan los mecanismos por los que el silicio ejerce su efecto hepatoprotector, para el que se ha seguido el mismo planteamiento de las **Figura 15 y 16**, y basado en las correlaciones descritas anteriormente para los triglicéridos y colesterol plasmáticos.

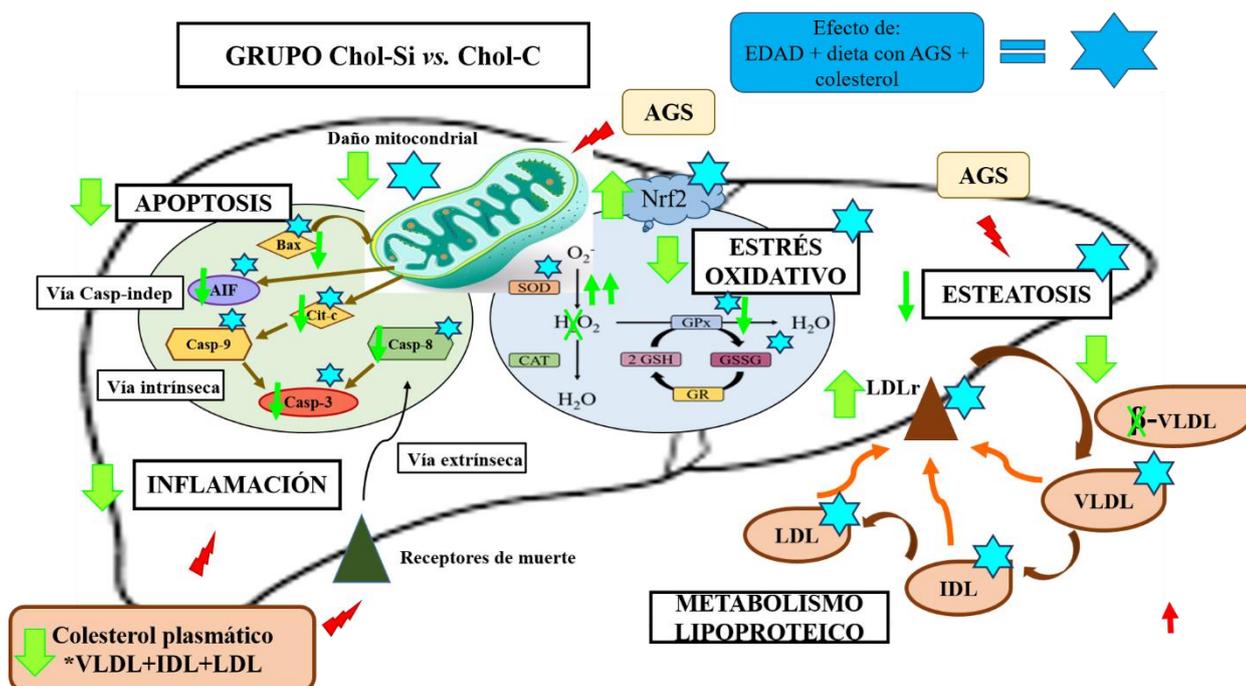


Figura 17. Cambios promovidos por el cárnico enriquecido en silicio en el grupo Chol-Si respecto al control Chol-C.

El consumo de un cárnico funcional enriquecido en silicio puede considerarse una buena estrategia nutricional en el tratamiento de pacientes con NAFLD. Según la **Figura 17** el silicio ejerce su efecto hepatoprotector principalmente por cuatro mecanismos: antioxidante, antiapoptótico, hipocolesterolemizante e hipotrigliceridemiante. Estos mecanismos se encuentran interrelacionados entre sí, ya que lógicamente el descenso en los niveles de colesterol implica, según lo explicado en las correlaciones, una reducción de la respuesta inflamatoria y de la apoptosis por vía extrínseca. A su vez, los menores niveles de triglicéridos plasmáticos pueden asociarse a menores niveles de estrés oxidativo y apoptosis por la vía mitocondrial.

3. Efecto hipoglucemiante e hipotrigliceridemiante del silicio en ratas jóvenes

El estado postprandial se considera un factor importante en las enfermedades crónicas y por ello se recomiendan terapias orientadas a la reducción de su intensidad y duración (Burton-Freeman, 2010). Más concretamente, la hiperglucemia e hipotrigliceridemia postprandiales se consideran factores de riesgo importantes de ECV y SM (Ceriello y cols., 2002). En vista de los resultados del estudio en ratas viejas con NAFLD (**capítulo 2**), nos planteamos que algunos de los mecanismos implicados en el papel hepatoprotector ya discutidos, se debían a un efecto del silicio sobre el estado postprandial. De forma más específica, se observó un efecto hipotrigliceridemiante muy intenso, que puede ser debido entre otros mecanismos a una reducción en la digestión y absorción de los lípidos de la dieta.

La administración de silicio orgánico en ratas sanas durante una semana produce un marcado descenso en los niveles de triglicéridos y glucosa en el periodo postprandial. El efecto hipotrigliceridemiante se produce desde la primera administración, sugiriendo que el silicio ejerce un efecto directo del sobre la digestión y absorción de lípidos. Además, después de una semana de administración los efectos son significativamente más potentes, demostrando que otros mecanismos están implicados además de los que se producen de forma local en la digestión. Estos resultados confirman los obtenidos en el capítulo anterior (**artículo 7**) en relación a la trigliceridemia. Por otra parte, la reducción de la glucemia parece estar mediada por mecanismos relacionados con la inhibición de la enzima α -glucosidasa y la disminución de los niveles del transportador SGLT1. Aunque no se ha comentado en el capítulo anterior, ya que no formaba parte de sus objetivos, la disminución de la hiperglucemia postprandial podría mejorar la resistencia a la insulina (Ceriello, 2005). Este efecto por tanto puede estar también involucrado en el efecto protector demostrado en el **capítulo 2**.

Reflexión final

Globalmente, los resultados obtenidos demuestran diferentes mecanismos del silicio que pueden ser parcialmente responsables de su efecto beneficioso en la EA, ECV y DM2 sugeridos por otros autores (véase subsecciones 4.2.2 y 4.2.3 de la introducción). Tal y como se han definido en la presente memoria de Tesis Doctoral, los mecanismos antiapoptóticos y antioxidantes parecen ser pleiotrópicos, ya que forman parte del efecto protector observado tanto en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (**capítulo 1**) como en el hígado de las ratas (**capítulo 2**). Por último, este estudio sugiere que los mecanismos de acción del silicio son independientes de la forma química en la que se administra, ya que las dos formas empleadas en esta Tesis Doctoral, silicio orgánico G57 (**capítulos 1 y 3**) y silicio amorfo micronizado (**capítulo 2**) actúan a través de mecanismos comunes (antiapoptótico, antioxidante e hipotrigliceridemiante).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El silicio es un micronutriente esencial con multitud de efectos sobre diferentes células y tejidos animales. Sin embargo, muchos de sus mecanismos son todavía desconocidos. Además, a pesar de que en la actualidad hay un interés creciente por el silicio, los estudios poblacionales son escasos y por tanto no se ha llegado a un consenso para fijar su ingesta de referencia. El silicio de la dieta procede fundamentalmente del agua, aunque también se encuentra en cantidades relativamente elevadas en la cerveza, café, y alimentos de origen vegetal. Su biodisponibilidad difiere enormemente de unos alimentos a otros y depende de la forma química en la que se encuentre. A su vez, la concentración de silicio en el agua es tremendamente variable entre zonas geográficas, y dependiente del silicio del suelo. Por otra parte, debido al ciclo biogeoquímico que presenta, la concentración de silicio disponible para los seres vivos es progresivamente más baja. Todo ello sugiere la necesidad de establecer una ingesta de referencia que permita detectar grupos de población con ingestas sub-óptimas que podrían beneficiarse de una suplementación adecuada.

Entre los efectos más importantes del silicio destacan los relacionados con a) la salud ósea y prevención de osteoporosis; b) la mejora de la enfermedad de Alzheimer (EA) por la capacidad del silicio para reducir los niveles tóxicos de aluminio en los tejidos; y c) la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Los beneficios del silicio están, por tanto, ligados a enfermedades crónico-degenerativas muy prevalentes en los países desarrollados, asociadas al proceso de envejecimiento. Además, se ha observado una disminución de silicio en los tejidos relacionada con la edad, que sugiere que las personas de edad avanzada podrían beneficiarse especialmente del consumo adecuado de este mineral.

Teniendo en cuenta estas premisas, se hipotetiza: a) que dependiendo de la dosis ensayada, el silicio puede promover efectos tóxicos o beneficiosos; b) que a dosis adecuadas el silicio ejerce efectos protectores *in vitro e in vivo* diferentes de los reseñados en la bibliografía con especial enfoque a la protección neuronal y hepática, así como a nivel digestivo y postprandial.

Por ello, en esta Tesis Doctoral se han estudiado los mecanismos relacionados con el efecto neuroprotector del silicio adicionales a su interacción con el aluminio en una línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) en ausencia y presencia de estrés oxidativo. En una segunda parte, se han evaluado los efectos hepatoprotectores de un cárnico funcional enriquecido con silicio en un modelo de NAFLD en ratas Wistar de un año. En relación con el estatus postprandial alterado en la DM2, se examina en ratas jóvenes sanas los efectos de la administración aguda y subcrónica de silicio en la digestión de hidratos de carbono y la glucemia y trigliceridemia postprandial.

Los resultados obtenidos han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. El silicio actúa como un agente neuroprotector o neurotóxico en función de su concentración. Como neuroprotector presenta propiedades antioxidantes y antiapoptóticas en células SH-SY5Y

de neuroblastoma humano en ausencia y presencia de H_2O_2 como modelo de estrés oxidativo. La neurotoxicidad por elevados niveles de silicio induce muerte celular por apoptosis vía extrínseca y necrosis con elevados niveles de peroxidación lipídica.

2. El silicio bloquea el efecto activador del H_2O_2 sobre la actividad de enzima acetilcolinesterasa, evitando el déficit colinérgico en el SNC.
3. El uso de silicio como ingrediente funcional incluido en una matriz cárnica es una estrategia tecnológica y nutricional eficaz para asegurar el aporte dietético de silicio.
4. El consumo de un cárnico funcional enriquecido en silicio bloquea parcialmente la progresión de NAFLD a NASH, actuando principalmente por cuatro mecanismos: antioxidante, antiapoptótico, hipocolesterolemizante e hipotriglicéridemizante.
5. La administración de silicio afecta al estatus postprandial, mostrando un potente efecto hipotriglicéridemizante e hipoglucémico en ratas jóvenes y sanas.
6. Los mecanismos antiapoptótico y antioxidante parecen ser pleiotrópicos, ya que participan en el efecto protector observado tanto en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y como en el hígado de las ratas.
7. Los mecanismos de acción del silicio son independientes de la forma química en la que se administra, ya que las dos formas empleadas, silicio orgánico G57 y silicio amorfo micronizado promueven mecanismos comunes, no obstante, la dosis debe ser convenientemente ajustada considerando la biodisponibilidad del silicio ensayado.

Conclusión general y futuras aplicaciones

Las conclusiones obtenidas permiten afirmar que el silicio tanto orgánico como inorgánico, ejerce efectos pleiotrópicos beneficiosos mediando mecanismos con base molecular y metabólica común, de enorme importancia en la iniciación y progresión de las enfermedades crónicas degenerativas tan prevalentes en la sociedad actual. Deben ser potenciadas y completadas por investigaciones posteriores donde se relacionen niveles de marcadores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas en modelos animales o en pacientes, buscando la prevención y el tratamiento con dietas individualizadas y optimizadas en silicio.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Silicon is an essential micronutrient displaying many associated effects in different animal cells and tissues. Nonetheless, many of its mechanisms are still unknown. Despite growing interest in silicon properties, epidemiological studies are scarce and hence there is no consensus on reference intakes. The main source of dietary silicon is tap water, although beer, coffee, and plant foods also contain substantial concentrations. The concentration of silicon in water varies between geographical areas and depends on the concentration found in the soil. In addition, due to the characteristics of its biogeochemical cycle, the available silicon concentrations for living organisms are becoming progressively smaller. All this indicates a need to establish silicon reference intakes, so as to be able to detect populations with sub-optimal consumption which could benefit from supplementation.

The most important benefits of silicon are: a) bone health and prevention of osteoporosis; b) amelioration of Alzheimer's disease (AD) due to the ability of silicon to limit toxic aluminium levels; and, c) reduction of risk of cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes mellitus (DM2). Thus, the benefits of silicon appear to lie in the sphere of chronic diseases, which are highly prevalent in developed countries and are associated with ageing. In this regard, it has been reported that silicon levels decrease with age, suggesting that consumption of this mineral could be especially beneficial in aged people.

In view of all this, we hypothesized that:

- Silicon exerts toxic or protective effects depending on its concentration
- Adequate doses promote protective *in vitro* and *in vivo* effects through unexplored mechanisms, especially those involved in neuron and liver protection, as well as in management of postprandial state.

The present Doctoral Thesis studied possible neuroprotective mechanisms in silicon, as separate from the known silicon-aluminium interaction, on the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line in the absence or presence of oxidative stress. Also, the hepatoprotective role of silicon contained in a meat matrix was analysed in a NAFLD model using one-year-old Wistar rats. Finally, the effect of silicon on postprandial state was evaluated after acute and one-week administration in young healthy rats.

From these results we conclude:

1. Depending on the concentration, silicon acts as a neuroprotective or neurotoxic agent. As a neuroprotector it presents antioxidant and antiapoptotic properties in human neuroblastoma SH-SY5Y cells in the presence or absence of H₂O₂. High silicon levels originate neurotoxicity, which in turn induces cell death extrinsically via apoptosis and necrosis, with high lipid peroxidation levels.
2. Silicon blocks the activating effect of H₂O₂ on acetylcholinesterase activity, palliating the cholinergic deficit in the central nervous system.

3. The inclusion of silicon in a meat matrix as a functional ingredient is an effective technological and nutritional strategy to assure dietary silicon intake.
4. Consumption of a silicon-enriched functional meat product partially arrested the progression of NAFLD to NASH, through four main mechanisms: antioxidant, antiapoptotic, hypocholesterolaemic, and hypotriglyceridaemic.
5. Silicon administration affects postprandial status, showing a potent hypotriglyceridaemic and hypoglucaemic effect in young, healthy rats.
6. The antiapoptotic and antioxidant effects appear to be pleiotropic, as they were found in both neuroblastoma SH-SY5Y human cells and in rat liver.
7. The mechanisms of silicon action are independent of its chemical form, as both organic silicon G57 and micronized and amorphous silicon work through common mechanisms; however, dosages have to be adequately adjusted according to silicon bioavailability.

General conclusion and future applications

We conclude from the results that both the organic and inorganic forms of silicon exert beneficial pleiotropic effects through various mechanisms with common molecular and metabolic bases, which in turn appears to be crucial in the initiation and progression of chronic degenerative diseases that are highly prevalent nowadays. This research needs to be taken further by identifying markers of cardiovascular and neurodegenerative disease risk in animal models or in patients, with a view to prevention and treatment with individualized silicon-optimized diets.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, A., Das, I., Chandhok, D., y Saha, T. (2010). Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(1), 23-34.
- Aguirre, C., Chávez, T., García, P., y Raya, J. C. (2007). El silicio en los organismos vivos. *Interciencia*, 32(8), 504-509.
- Ahmad, A., Khan, M. M., Javed, H., Raza, S. S., Ishrat, T., Khan, M. B., y cols. (2012). Edaravone ameliorates oxidative stress associated cholinergic dysfunction and limits apoptotic response following focal cerebral ischemia in rat. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 367(1-2), 215-225.
- Ahmed, M. H., Barakat, S., y Almobarak, A. O. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: has the time come for cardiologists to be hepatologists? *Journal of Obesity*, 2012, 483135.
- Akagiri, S., Naito, Y., Ichikawa, H., Mizushima, K., Takagi, T., Handa, O., y cols. (2008). A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue precedes the development of fatty liver and insulin resistance in high-fat diet-fed male KK/Ta mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 42(2), 150-157.
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., y Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic Medicine*, 23(5), 469-480.
- Aleixandre, A., y Miguel, M. (2008). Zucker rats as an experimental model for the study of various diseases. *Endocrinología y Nutrición: órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*, 55(5), 217-222.
- Alkhoury, N., Dixon, L. J., y Feldstein, A. E. (2009). Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 3(4), 445-451.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37, S81-S90.
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*, 5, S18-S25.
- Anderson, S. H. C., Elliott, H., Wallis, D. J., Canham, L. T., y Powell, J. J. (2003). Dissolution of different forms of partially porous silicon wafers under simulated physiological conditions. *Physica Status Solidi (a)*, 197(2), 331-335.
- Angulo, P. (2010). Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology*, 51(2), 373-375.
- Antonini, J. M., Roberts, J. R., Yang, H. M., Barger, M. W., Ramsey, D., Castranova, V., y cols. (2000). Effect of silica inhalation on the pulmonary clearance of a bacterial pathogen in Fischer 344 rats. *Lung*, 178(6), 341-350.
- Armstrong, M. J., Houlihan, D. D., Bentham, L., Shaw, J. C., Cramb, R., Olliff, S., y cols. (2012). Presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in a large prospective primary care cohort. *Journal of Hepatology*, 56(1), 234-240.

- Arner, P. (2002). Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 18(S2), S5-S9.
- Ashwell, M. (2002). ILSI Europe Concise monograph series Concepts of functional foods. *ILSI Europe Concise Monograph series Volume 40 S*, 7894-10.
- Asrih, M., y Jornayvaz, F. R. (2015). Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: is insulin resistance the link? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 55-65.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Parmo, S. L., y La Du, B. N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonasa. *Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1581-1590.
- Ballenger, J. F. (2006). Progress in the history of Alzheimer's disease: The importance of context. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(3 Supplement), 5-13.
- Barel, A., Calomme, M., Timchenko, A., Paepe, K. D., Demeester, N., Rogiers, V., y cols. (2005). Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on skin, nails and hair in women with photodamaged skin. *Archives of Dermatological Research*, 297(4), 147-153.
- Barnett, P. R., Skougstad, M. W., y Miller, K. J. (1969). Chemical Characterization of a Public Water Supply (PDF). *Journal-American Water Works Association*, 61(2), 60-67.
- Bays, H. E. (2009). "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis. *The American Journal of Medicine*, 122(1), S26-S37.
- Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 107(11), 1325-1344.
- Begrache, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2006). Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*, 6(1), 1-28.
- Bellia, J., Birchali, J., y Roberts, N. (1994). Beer: a dietary source of silicon. *Lancet*, 343, 235.
- Bellia J. P., Birchall, J. D., Roberts, N.B. (1996). The role of silicic acid in the renal excretion of aluminium. *Annual Clinical Laboratory Science*, 26(3), 227-33.
- Bendz, G. (Ed.). (2013). *Biochemistry of silicon and related problems* (Vol. 40). Springer Science & Business Media, New York.
- Bennett, P. C., Rogers, J. R., Choi, W. J., y Hiebert, F. K. (2001). Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18(1), 3-19.
- Bettermann, K., Hohensee, T., y Haybaeck, J. (2014). Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9924-9944.
- Bilheimer, D. W., Eisenberg, S., y Levy, R. I. (1972). The metabolism of very low density lipoprotein proteins I. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 260(2), 212-221.
- Birchall, J.D., y Exley, C. (1992). En: Merian, E., y Haerdi, W. (Eds.). *Metal Compounds in Environment and Life*, vol. 4, Science and Technology Letters, Northwood, pp. 411-420.

- Birchall, J. D. (1995). The essentiality of silicon in biology. *Chemical Society Reviews*, 24(5), 351-357.
- Bissé, E., Epting, T., Beil, A., Lindinger, G., Lang, H., y Wieland, H. (2005). Reference values for serum silicon in adults. *Analytical Biochemistry*, 337(1), 130-135.
- Blunder, M., Natascha, H., Spirk, S., Martina List, M., y Pietschnig, R. (2011). Silanetriols as in vitro inhibitors for AChE. *Bioorganic & Medical Chemistry Letter*, 21(1): 363-365.
- Boguszewska-Czubara, A., y Pasternak, K. (2011). *Silicon in Medicine and Therapy*. En: *Quarterly Reports issued by the Polish Society for Magnesium Research and University of Warmia and Mazury in Olsztyn*, 16(3), 489.
- Bonda, D. J., Wang, X., Perry, G., Nunomura, A., Tabaton, M., Zhu, X., y cols. (2010). Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology*, 59(4), 290-294.
- Bowen, H. J. M., y Peggs, A. (1984). Determination of the silicon content of food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(11), 1225-1229.
- Brea, A., y Puzo, J. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *International Journal of Cardiology*, 167(4), 1109-1117.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., y cols. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biology*, 2(9), 645-652.
- Brunt, E. M., y Tiniakos, D. G. (2010). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 16(42), 5286-5296.
- Bugianesi, E., Leone, N., Vanni, E., Marchesini, G., Brunello, F., Carucci, P., y cols. (2002). Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 123(1), 134-140.
- Burns, L., Ashwell, M., Berry, J., Bolton-Smith, C., Cassidy, A., Dunnigan, M., y cols. (2003). UK Food Standards Agency Optimal Nutrition Status Workshop: environmental factors that affect bone health throughout life. *British Journal of Nutrition*, 89(6), 835-840.
- Burton-Freeman, B. (2010). Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. *The British Journal of Nutrition*, 104(Suppl 3), S1-S14.
- Cali, A. M., Zern, T. L., Taksali, S. E., De Oliveira, A. M., Dufour, S., Otvos, J. D., y cols. (2007). Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents a perfect proatherogenic state. *Diabetes Care*, 30(12), 3093-3098.
- Campanari, M. L., García-Ayllón, M. S., Blazquez-Llorca, L., Luk, W. K., Tsim, K., y Sáez-Valero, J. (2014). Acetylcholinesterase protein level is preserved in the Alzheimer's brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53(3), 446-453.
- Canales, A., y Sanchez-Muniz, F. J. (2003). Paraoxonasa ¿algo más que un enzima? [Paraoxonase, something more than an enzyme?]. *Medicina Clinica*, 121(14), 537-548.
- Canham, L. (ed.) (2014). *Handbook of porous silicon*. Springer, Switzerland.

- Carbajal-Azcona, A. (2004). Consumo de carne y tendencias. Calidad de vida y epidemiología de enfermedades asociadas. En: Jiménez Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. J., Olmedilla, B. (eds.). *La Carne y productos cárnicos como alimentos funcionales*. Fundación Española de la Nutrición. Editec@RED, S.L. Madrid, pp. 15-38.
- Cariou, B., Charbonnel, B., y Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(5), 205-215.
- Carlisle, E. M. (1972). Silicon: an essential element for the chick. *Science*, 178(4061), 619-621.
- Carlisle, E. M. (1976). In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *The Journal of Nutrition*, 106(4), 478-484.
- Carlisle, E. M. (1980). Biochemical and morphological changes associated with long bone abnormalities in silicon deficiency. *The Journal of Nutrition*, 110(5), 1046-1056.
- Carlisle, E. M. (1984). Silicon. En: Frieden, E. (ed.) *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. Springer US, New York, pp. 257-291.
- Carlson, L. A., Fröberg, S. O., y Nye, E. R. (1968). Effect of age on blood and tissue lipid levels in the male rat. *Gerontology*, 14(2), 65-79.
- Carmena, R. (2010). Dyslipemia in Type 2 Diabetes Mellitus. En: Type 2 Diabetes Mellitus. Serrano Ríos, M y Gutiérrez Fuentes, J. A. (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 219-230.
- Carmienke, S., Freitag, M. H., Pischon, T., Schlattmann, P., Fankhaenel, T., Goebel, H., y cols. (2013). General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67(6), 573-585.
- Cascales-Angosto, M. (2015). Obesidad: Pandemia del siglo XXI. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, pp. 14-46.
- Castro, L., y Silva, G. (2015). Hígado graso no alcohólico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(5), 600-612.
- Cava, F. (1986). Inducción de hipercolesterolemia en ratas. Su prevención mediante consumo de sardinas fritas en aceite de oliva. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Tesis doctoral.
- Celada, P., Delgado-Pando, G., Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., Ruperto, M.; Sánchez-Muniz, F. J. (2015). Impact of improved fat-meat products consumption on anthropometric markers and nutrient intakes of male volunteers at increased cardiovascular risk. *Nutrición Hospitalaria*, 32, 710-721.
- Celada, P., Bastida, S., y Sánchez-Muniz, F. J. (2016a). To eat or not to eat meat. That is the question. *Nutrición Hospitalaria*, 33(1), 177-181.
- Celada, P., y Sánchez-Muniz, F. J. (2016) Are meat and meat product consumptions harmful? Their relationship with the risk of colorectal cancer and other degenerative diseases. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 82, 68-90.

- Celada, P., Sánchez-Muniz, F. J., Bastida, S.; Delgado-Pando, G., Esparrago-Rodilla, M., Jiménez-Colmenero, F., Olmedilla-Alonso, B. (2016b). Effects of improved fat meat products consumption on emergent cardiovascular disease markers of male volunteers at cardiovascular risk. *Journal of Physiology and Biochemistry*, Jul 4. [Epub ahead of print].
- Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A. M., y cols. (2013). Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17643-17663.
- Ceriello, A., Taboga, C., Tonutti, L., Quagliari, L., Piconi, L., Bais, B., y cols. (2002). Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation*, 106(10):1211-1218.
- Ceriello, A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications is it time to treat? *Diabetes*, 54(1), 1-7.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., y cols. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 55(6), 2005-2023.
- Chan, D. C., Watts, G. F., Gan, S., Wong, A. T., Ooi, E. M., y Barrett, P. H. R. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease as the transducer of hepatic oversecretion of very-low-density lipoprotein-apolipoprotein B-100 in obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(5), 1043-1050.
- Chen, S. W., Park, S. W., Kim, M., Brown, K. M., D'Agati, V. D., y Lee, H. T. (2009). Human heat shock protein 27 overexpressing mice are protected against hepatic ischemia and reperfusion injury. *Transplantation*, 87(10), 1478.
- Chopra, K., Misra, S., y Kuhad, A. (2011). Neurobiological aspects of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(5), 535-555.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 621s-629s.
- Cilla, A., Alegría, A., Barberá, R., y Lagarda, M. J. (2013). Foods or bioactive constituents of foods as chemopreventives in cell lines after simulated gastrointestinal digestion: a review. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Disease—A Role for Antioxidants*, InTech, 131-151.
- Cofrades, S., Sandoval, L. S., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., y Jiménez-Colmenero, F. (2011). Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 129, 429-436.
- Cohen, D. E., y Fisher, E. A. (2013). Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. En: *Seminars in liver disease* (Vol. 33, No. 4), Thieme Medical Publisher, pp. 380-388.

- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 621S-629S.
- Curnow, P., Senior, L., Knight, M. J., Thamtrakoln, K., Hildebrand, M., y Booth, P. J. (2012). Expression, purification, and reconstitution of a diatom silicon transporter. *Biochemistry*, 51(18), 3776-3785.
- Dahlgren, R. A. (1993). Comparison of soil solution extraction procedures: effect on solute chemistry. *Communications in Soil Science & Plant Analysis*, 24(15-16), 1783-1794.
- Darreh-Shori, T., Hellström-Lindahl, E., Flores-Flores, C., Guan, Z. Z., Soreq, H., y Nordberg, A. (2004). Long-lasting acetylcholinesterase splice variations in anticholinesterase-treated Alzheimer's disease patients. *Journal of Neurochemistry*, 88(5), 1102-1113.
- Davenward, S., Bentham, P., Wright, J., Crome, P., Job, D., Polwart, A., y cols. (2013). Silicon-rich mineral water as a non-invasive test of the 'aluminum hypothesis' in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(2), 423-430.
- Day, C. P., y James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.
- Day, C. P. (2002). Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 16(5), 663-678.
- DeFilippis, A. P., Blaha, M. J., Martin, S. S., Reed, R. M., Jones, S. R., Nasir, K., y cols. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 227(2), 429-436.
- De la Torre, A. M. (2004). *Nutrición y metabolismo en trastornos de la conducta alimentaria*. Editorial Glosa, SL. Barcelona.
- Delgado-Pando, G.; Celada, P.; Sánchez-Muniz, F.J.; Jiménez-Colmenero, F.; Olmedilla-Alonso, B. (2014). Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk: a placebo-controlled study. *European Journal of Nutrition*, 53, 83-93.
- D'Haese, P. C., Shaheen, F. A., Huraib, S. O., Djukanovic, L., Polenakovic, M. H., Spasovski, G., y cols. (1995). Increased silicon levels in dialysis patients due to high silicon content in the drinking water, inadequate water treatment procedures, and concentrate contamination: a multicentre study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 10(10), 1838-1844.
- Di Domenico, F., Barone, E., Perluigi, M., y Butterfield, D. A. (2015). Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(1), 19-40.
- DiNicolantonio, J.J., Bhutani, J., y O'Keefe, J.H. (2015). Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Open Heart*, 2, e000327.

- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., y Roberfroid, M. (1999). The European commission concerted action on functional foods science in Europe (FUFOSE). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1-S27.
- Dobbie, J. W., y Smith, M. J. (1982). The silicon content of body fluids. *Scottish Medical Journal*, 27(1), 17-19.
- Drüeke, T. B., Jouhannau, P., Banide, H., Lacour, B., Yiou, F., y Raisbeck, G. (1997). Effects of silicon, citrate and the fasting state on the intestinal absorption of aluminium in rats. *Clinical Science*, 92(1), 63-67.
- Dyson, J. K., Anstee, Q. M., y McPherson, S. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterology*, 5(4), 277-286.
- Edwardson, J. A., Moore, P. B., Ferrier, I. N., Lilley, J. S., Barker, J., Templar, J., y cols. (1993). Effect of silicon on gastrointestinal absorption of aluminium. *The Lancet*, 342(8865), 211-212.
- EFSA. Scientific opinion 2004. Safety of organic silicon (monomethylsilanetriol, MMST) as a novel food ingredient for use as a source of silicon in food supplements and bioavailability of orthosilicic acid from the source. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food.
- EFSA. Scientific opinion 2009. Monomethylsilanetriol added for nutritional purposes to food supplements. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food.
- Ehrlich, H. L. (1996) (ed.). Geomicrobiology, 3rd edn. Marcel Dekker, New York
- Eisinger, J., y Clairet, D. (1993). Effects of silicon, fluoride, etidronate and magnesium on bone mineral density: a retrospective study. *Magnesium Research*, 6(3), 247-249.
- Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Ruitenber, A., van Swieten, J. C., Hofman, A., Witteman, J. C., y cols. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *The Journal of American Medical Association*, 287(24), 3223-3229.
- Erdinçler, D. S., Seven, A., Inci, F., Beğler, T., y Candan G. (1997). Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clinica Chimica Acta*, 265(1), 77-84.
- Estudio ENIDE (2011). Página web consultada:
http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/participacion_proyecto_europeo. (25 de Mayo 2012)
- EGIR. Balkau, B., y Charles, M. A. (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetes Medicine* 16(5), 442-443.
- Etxeberria, U., Milagro Fermín, I., González-Navarro, C. J., Martínez, J. A. (2016). Papel en la obesidad de la microbiota intestinal. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. En Prensa*.
- Exley, C. (1998). Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69(3), 139-144.

- Exley, C., Korchazhkina, O., Job, D., Strekopytov, S., Polwart, A., y Crome, P. (2006). Non-invasive therapy to reduce the body burden of aluminium in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 10(1), 17-24.
- Expert group on vitamins and minerals (2003). Food Standards Agency, London.
<https://cot.food.gov.uk/committee/committee-on-toxicity/cotreports/cotjointreps/evmreport>
- Farmer, V. C., y Lumsdon, D. G. (1994). An assessment of complex formation between aluminium and silicic acid in acidic solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(16), 3331-3334.
- Farrell, G. C., y Larter, C. Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S99-S112.
- Farrell, G. C., y Van Rooyen, D. (2012). Liver cholesterol: is it playing possum in NASH? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(1), G9-G11.
- Faure-Nogueras, E. (2006). Hiperglucemia postprandial: importancia y tratamiento. *Endocrinología y Nutrición*, 53(2), 137-142.
- Feldstein, A. E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L. J., Lindor, K. D., y cols. (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 125(2), 437-443.
- Feldstein, A. E., y Gores, G. J. (2005). Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Bioscience*, 10(1), 3093-3099.
- Finelli, C., Padula, M. C., Martelli, G., y Tarantino, G. (2014). Could the improvement of obesity-related co-morbidities depend on modified gut hormones secretion? *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16649-16664.
- Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., y Saso, L. (2011). Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Current Medicinal Chemistry*, 18(25), 3871-3888.
- Floreani, A. (2007). Liver diseases in the elderly: an update. *Digestive Diseases*, 25(2), 138-143.
- Flores Balcázar, C. H. (2015). Apoptosis: regulación molecular con componentes dietéticos. En: Gordillo Bastidas, D., y Gordillo Bastidas, E. (eds.). *Nutrición molecular*. Mc Graw Hill education, México, pp. 100-111.
- Floyd, R. A., y Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 795-807.
- Fontana, L., Zhao, E., Amir, M., Dong, H., Tanaka, K., y Czaja, M. J. (2013). Aging promotes the development of diet-induced murine steatohepatitis but not steatosis. *Hepatology*, 57(3), 995-1004.
- Freire, J., Ajona, D., de Biurrun, G., Agorreta, J., Segura, V., Guruceaga, E., y cols. (2013). Silica-induced chronic inflammation promotes lung carcinogenesis in the context of an immunosuppressive microenvironment. *Neoplasia*, 15(8), 913-IN18.
- Friedman, J. M. (2003). A war on obesity, not the obese. *Science*, 299(5608), 856.

- Frisardi, V., Solfrizzi, V., Capurso, C., Kehoe, P. G., Imbimbo, B. P., Santamato, A., y cols. (2010). Aluminum in the diet and Alzheimer's disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(1), 17-30.
- Fuhrman, B., Volkova, N., y Aviram, M. (2002). Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*, 161(2), 307-316.
- Gambino, R., Musso, G., y Cassader, M. (2011). Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(5), 1325-1365.
- Ganske, F., y Dell, E.J. (2006). ORAC assay on the FLUOstar OPTIMA to determine antioxidant capacity. BMG LABTECH Application Notes.
- García-Ayllón, M. S., Small, D. H., Avila, J., y Sáez-Valero, J. (2011). Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-tau and β -amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 22.
- García, A. E., Kasim, N., Tamboli, R. A., Gonzalez, R. S., Antoun, J., Eckert, E. A., y cols. (2015). Lipoprotein Profiles in Class III Obese Caucasian and African American Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PloS one*, 10(11), e0142676.
- García-Quismondo Fernández, A. (2016). Proteína C reactiva, índice de conicidad y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- Gesteiro Alejos, E. (2015). Factores nutricionales, lipoproteicos y hormonales como marcadores precoces de insulinoresistencia y enfermedad cardiovascular en recién nacidos. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Getman, D. K., Eubanks, J. H., Camp, S., Evans, G. A., y Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics*, 51(1), 170-177.
- Giacobini, E. (1990). The cholinergic system in Alzheimer disease. *Progress in Brain Research*, 84, 321-332.
- Gillette-Guyonnet, S., Andrieu, S., y Vellas, B. (2007). The potential influence of silica present in drinking water on Alzheimer's disease and associated disorders. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 11(2), 119-124.
- Golde, T. E. (2009). The therapeutic importance of understanding mechanisms of neuronal cell death in neurodegenerative disease. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 8.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., y Zhang, C. (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169(2), 313-321.

- González-Muñoz, M. J., Pena, A., y Meseguer, I. (2008a). Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 49-56.
- Gonzalez-Muñoz, M. J., Meseguer, I., Sanchez-Reus, M. I., Schultz, A., Olivero, R., Benedí, J., y cols. (2008b). Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 1111-1118.
- González Torres, L. (2016). Efectos sobre el metabolismo lipoproteico y estrés oxidativo en ratas Zucker fa/fa de cárnicos enriquecidos con glucomanano y espirulina. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- González-Torres, L., Vázquez-Velasco, M., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedí, J., Raposo González, R., y cols. (2015). Glucomannan and glucomannan plus spirulina added to pork significantly block dietary cholesterol effects on lipoproteinaemia, arylesterase activity and CYP7A1 expression in Zucker fa/fa rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71, 773-784.
- Greenwood, N. N., y Earnshaw, A. (eds.) (2012). *Chemistry of the Elements*. Elsevier, Amsterdam.
- Gupta, V. B., Anitha, S., Hegde, M. L., Zecca, L., Garruto, R. M., Ravid, R., y cols. (2005). Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(2), 143-158.
- Gupte, A. A., Liu, J. Z., Ren, Y., Minze, L. J., Wiles, J. R., Collins, A. R., y cols. (2010). Rosiglitazone attenuates age-and diet-associated nonalcoholic steatohepatitis in male low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Hepatology*, 52(6), 2001-2011.
- Hanley, A. J., Karter, A. J., Williams, K., Festa, A., D'Agostino, R. B., Wagenknecht, L. E., y cols. (2005). Prediction of type 2 diabetes mellitus with alternative definitions of the metabolic syndrome the insulin resistance atherosclerosis study. *Circulation*, 112(24), 3713-3721.
- Hennekens, C. H., y Andreotti, F. (2013). Leading avoidable cause of premature deaths worldwide: case for obesity. *American Journal of Medicine*, 126(2), 97-98.
- Hossain, N., Kanwar, P., y Mohanty, S. R. (2016). A comprehensive updated review of pharmaceutical and nonpharmaceutical treatment for NAFLD. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 7109270.
- Huang, Z. E. (1995). Determination of silicon in serum and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 50(11), 1383-1393.
- Iantomasi, T., Favilli, F., Marraccini, P., Stio, M., Treves, C., Quatrone, A., y cols. (1993). Age and GSH metabolism in rat cerebral cortex, as related to oxidative and energy parameters. *Mechanisms of Ageing and Development*, 70(1), 65-82.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., y Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59(1), 5-13.

- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, 18(11), 567-578.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 56-66.
- Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. J., y Olmedilla-Alonso, B. (2010). Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry*, 123(4), 959-967.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., y Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1-2), 91-104.
- Jugdaohsingh, R. (2007). Silicon and bone health. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 11(2), 99-110.
- Jugdaohsingh, R., Reffitt, D. M., Oldham, C., Day, J. P., Fifield, L. K., Thompson, R. P., y cols. (2000). Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(4), 944-949.
- Jugdaohsingh, R., Anderson, S. H., Tucker, K. L., Elliott, H., Kiel, D. P., Thompson, R. P., y cols. (2002). Dietary silicon intake and absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 887-893.
- Jugdaohsingh, R., Tucker, K. L., Qiao, N., Cupples, L. A., Kiel, D. P., y Powell, J. J. (2004). Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(2), 297-307.
- Jugdaohsingh, R., Calomme, M. R., Robinson, K., Nielsen, F., Anderson, S. H., D'Haese, P., y cols. (2008). Increased longitudinal growth in rats on a silicon-depleted diet. *Bone*, 43(3), 596-606.
- Jugdaohsingh, R., Sripanyakorn, S., y Powell, J. J. (2013). Silicon absorption and excretion is independent of age and sex in adults. *British Journal of Nutrition*, 110(6), 1024-1030.
- Jurkić, L. M., Capanec, I., Pavelić, S. K., y Pavelić, K. (2013). Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: new perspectives for therapy. *Nutrition & Metabolism (London)*, 10(1), 2.
- Kang, Q., y Chen, A. (2009). Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. *British Journal of Pharmacology*, 157(8), 1354-1367.
- Kawahara, M., y Kato-Negishi, M. (2011). Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 276393.
- Kim, H. J., Kim, H. J., Lee, K. E., Kim, D. J., Kim, S. K., Ahn, C. W., y cols. (2004). Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. *Archives of Internal Medicine*, 164(19), 2169-2175.

- Kim, E. J., Bu, S. Y., Sung, M. K., Kang, M. H., y Choi, M. K. (2013). Analysis of antioxidant and anti-inflammatory activity of silicon in murine macrophages. *Biological Trace Element Research*, 156(1-3), 329-337.
- King, S. J., Day, J. P., Oldham, C., Popplewell, J. F., Ackrill, P., Moore, P. B., y cols. (1997). The influence of dissolved silicate on the physiological chemistry of aluminium, studied in humans using tracer ²⁶Al and accelerator mass spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 123(1), 254-258.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., y cols. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321.
- Koo, H., Ryu, S. H., Ahn, H. J., Jung, W. K., Park, Y. K., Kwon, N. H., y cols. (2006). Immunostimulatory effects of the anionic alkali mineral complex BARODON on equine lymphocytes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(11), 1255-1266.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., y Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Elsevier Health Sciences, Amsterdam.
- Kumar, A., y Singh, A. (2015). A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 206.
- Landis, W. J., Lee, D. D., Brenna, J. T., Chandra, S., y Morrison, G. H. (1986). Detection and localization of silicon and associated elements in vertebrate bone tissue by imaging ion microscopy. *Calcified Tissue International*, 38(1), 52-59.
- Lee, J. Y., y Parks, J. S. (2005). ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 19-25.
- Liang, Y. (1999). Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil*, 209(2), 217-224.
- Liang, Y., Chen, Q. I. N., Liu, Q., Zhang, W., y Ding, R. (2003). Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare*L.). *Journal of Plant Physiology*, 160(10), 1157-1164.
- Loeper, J., y Lemaire, A. (1966). [Study of silicon in human atherosclerosis]. *Giornale di Clinica Medica*, 47(7), 595-605.
- Loeper, J., Loeper, J., y Fragny, M. (1977). The physiological role of the silicon and its antiatheromatous action. Biochemistry of silicon and related problems. En: *Proceedings of a Nobel Symposium, Idingo, Sweden* (Vol. 40), pp. 281-296.
- Loeper, J., Goy-Loeper, J., Rozensztajn, L., y Fragny, M. (1979). The antiatheromatous action of silicon. *Atherosclerosis*, 33(4), 397-408.
- Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., y Loria, P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease*, 47(3), 181-190.

- López-Oliva, M. E., y Muñoz Martínez, E. (2014). SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 80(1), 14-48.
- Macdonald, H. M., Hardcastle, A. C., Jugdaohsingh, R., Fraser, W. D., Reid, D. M., y Powell, J. J. (2012). Dietary silicon interacts with oestrogen to influence bone health: evidence from the Aberdeen Prospective Osteoporosis Screening Study. *Bone*, 50(3), 681-687.
- Mackness, B., Durrington, P. N., y Mackness, M. I. (1998). Human serum paraoxonase. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(3), 329-336.
- Mackness, B., Hine, D., Liu, Y., Mastorikou, M., y Mackness, M. (2004). Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(3), 680-683.
- Maehira, F., Miyagi, I., y Eguchi, Y. (2009). Effects of calcium sources and soluble silicate on bone metabolism and the related gene expression in mice. *Nutrition*, 25(5), 581-589.
- Maehira, F., Ishimine, N., Miyagi, I., Eguchi, Y., Shimada, K., Kawaguchi, D., y cols. (2011). Anti-diabetic effects including diabetic nephropathy of anti-osteoporotic trace minerals on diabetic mice. *Nutrition*, 27(4), 488-495.
- Maehira, F., Motomura, K., Ishimine, N., Miyagi, I., Eguchi, Y., y Teruya, S. (2011). Soluble silica and coral sand suppress high blood pressure and improve the related aortic gene expressions in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition Research*, 31(2), 147-156.
- Malhi, H., y Gores, G. J. (2008). Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. En: *Seminars in liver disease* (Vol. 28, 4), Thieme Medical Publishers, pp. 360-369.
- Mancinella, A. (1991). [Silicon, a trace element essential for living organisms. Recent knowledge on its preventive role in atherosclerotic process, aging and neoplasms]. *La Clinica Terapeutica*, 137(5), 343-350.
- Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A., y Mecocci, P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Journal of Chromatography B*, 827(1), 65-75.
- Martin, K. R. (2007). The chemistry of silica and its potential health benefits. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 11(2), 94.
- Martin, K. R. (2013). Silicon: The health benefits of a metalloid. In *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases* (pp. 451-473). Springer Netherlands.
- Martínez Cayuela, M. (2010). Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante. En: Gil, A. (ed.). *Tratado de Nutrición. Vol 1. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. Sánchez de Medina F (coordinador). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 455-480.
- Massoulié, J., Sussman, J., Bon, S., y Silman, I. (1993). Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Progress in Brain Research*, 98, 139-146.

- Mataix Verdú, J., Rodríguez Huertas, J., Quiles Morales, J. L., Ochoa herrera, J. J., Battino, M., y López Frías, M. (2001). Aceite de oliva y estado oxidativo celular. En: Mataix Verdú, J. (ed.). Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Vol 2. Universidad de Granada y Puleva Food. Granada, pp. 37-78.
- McNaughton, S. A., Bolton-Smith, C., Mishra, G. D., Jugdaohsingh, R., y Powell, J. J. (2005). Dietary silicon intake in post-menopausal women. *British Journal of Nutrition*, 94(05), 813-817.
- Merget, R., Bauer, T., Küpper, H., Philippou, S., Bauer, H., Breitstadt, R., y cols. (2002). Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Archives of Toxicology*, 75(11-12), 625-634.
- Meunier, J. D. (2003). Le rôle des plantes dans le transfert du silicium à la surface des continents. *Comptes Rendus Geoscience*, 335(16), 1199-1206.
- Miura, Y., Nakai, K., Suwabe, A., y Sera, K. (2002). Trace elements in renal disease and hemodialysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 189(1), 443-449.
- Morgan, A. E., Mooney, K. M., Wilkinson, S. J., Pickles, N. A., y Mc Auley, M. T. (2016). Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Research Reviews*, 27, 108-124.
- Mossman, B. T., y Churg, A. (1998). Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(5), 1666-1680.
- Musso, G., Gambino, R., Bo, S., Uberti, B., Biroli, G., Pagano, G., y cols. (2008). Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, 31(3), 562-568.
- Nassir, F., y Ibdah, J. A. (2014). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8713-8742.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2002). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106(25), 3143-3421
- Nakamuta, M., Fujino, T., Yada, R., Yada, M., Yasutake, K., Yoshimoto, T., y cols. (2009). Impact of cholesterol metabolism and the LXRalpha-SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 23(5), 603-608.
- Nascimbeni, F., Pais, R., Bellentani, S., Day, C. P., Ratziu, V., Loria, P., y cols. (2013). From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *Journal of Hepatology*, 59(4), 859-871.
- Nesic, D. M., Stevanovic, D. M., Stankovic, S. D., Milosevic, V. L., Trajkovic, V., Starcevic, V. P. y cols. (2013). Age-dependent modulation of central ghrelin effects on food intake and lipid metabolism in rats. *European Journal of Pharmacology*, 710(1-3), 85-91.

- Nus, M., Sánchez-Muniz, F. J. y Sánchez-Montero, J.M. (2007). Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 74, 5-27.
- Nus, M., Sánchez-Muniz, F.J. y Sánchez-Montero, J.M. (2008). Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte II. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 74, 181-201.
- O'Connell, B. S. (2001). Select vitamins and minerals in the management of diabetes. *Diabetes Spectrum*, 14(3), 133-148.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K., y Flegal, K. M. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *The Journal of the American Medical Association*, 311(8), 806-814.
- Olivero-David, R., Paduano, A., Fogliano, V., Vitaglione, P., Bastida, S., González-Muñoz, M. J., y cols. (2011). Effect of thermally oxidized oil and fasting status on the short-term digestibility of ketolinoleic acids and total oxidized fatty acids in rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59, 4684-4691.
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., y Sánchez-Muniz, F. J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95(4), 919-930.
- Okada, K., Warabi, E., Sugimoto, H., Horie, M., Tokushige, K., Ueda, T., y cols. (2012). Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology*, 47(8), 924-935.
- OMS (1999). *diagnostico SM OMS*, W. H. O. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report in English of a WHO Consultation. . Retrieved from Geneva:
- Öner, G., Cirrik, S., Bulbul, M., y Yuksel, S. (2006). Dietary Silica Modifies the Characteristics of Endothelial Dilation in Rat Aorta. *Endothelium*, 13(1), 17-23.
- Orgaz Gallego, M. P., Bermejo López, P., Tricio Armero, M. A., Abellan Aleman, J., Solera Albero, J., y Tarraga López, P. J. (2015). Metabolic syndrome and its components in Spanish postmenopausal women. *Nutrición Hospitalaria*, 32(n2), 656-666.
- Oschilewski, U., Kiesel, U., y Kolb, H. (1985). Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. *Diabetes*, 34(2), 197-199.
- Pallottini, V., Martini, C., Cavallini, G., Donati, A., Bergamini, E., Notarnicola, M., y cols. (2006). Modified HMG-CoA reductase and LDLr regulation is deeply involved in age-related hypercholesterolemia. *Journal of Cell Biochemistry*, 98(5), 1044-1053.
- Park, S. E., Kim, N. D., y Yoo, Y. H. (2004). Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Research*, 64(8), 2652-2655.

- Partridge, L. (2014). Intervening in ageing to prevent the diseases of ageing. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(11), 555-557.
- Peluso, M. R., y Schneemann, B. O. (1994). A food-grade silicon dioxide is hypocholesterolemic in the diet of cholesterol-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 124(6), 853-860.
- Pennington, J. A. T. (1991). Silicon in foods and diets. *Food Additives & Contaminants*, 8(1), 97-118.
- Perazzo, H., Munteanu, M., Ngo, Y., Lebray, P., Seurat, N., Rutka, F., y cols. (2014). Prognostic value of liver fibrosis and steatosis biomarkers in type-2 diabetes and dyslipidaemia. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40(9), 1081-1093.
- Perry, C. C., y Keeling-Tucker, T. (2000). Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(5), 537-550.
- Pimplikar, S. W. (2009). Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(6), 1261-1268.
- Pollard, K. M. (2016). Silica, silicosis, and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 7, 97.
- Polimeni, L., Del Ben, M., Baratta, F., Perri, L., Albanese, F., Pastori, D., y cols. (2015). Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *World Journal of Hepatology*, 7(10), 1325-1336.
- Popplewell, J. F., King, S. J., Day, J. P., Ackrill, P., Fifield, L. K., Cresswell, R. G., y cols. (1998). Kinetics of uptake and elimination of silicic acid by a human subject: a novel application of ³²Si and accelerator mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69(3), 177-180.
- Powell, J. J., McNaughton, S. A., Jugdaohsingh, R., Anderson, S. H. C., Dear, J., Khot, F., y cols. (2005). A provisional database for the silicon content of foods in the United Kingdom. *British Journal of Nutrition*, 94(05), 804-812.
- Pruksa, S., Siripinyanond, A., Powell, J. J., y Jugdaohsingh, R. (2014). Silicon balance in human volunteers; a pilot study to establish the variance in silicon excretion versus intake. *Nutrition & Metabolism (London)*, 11(1), 4.
- Puri, P., Baillie, R. A., Wiest, M. M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., y cols. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 46(4), 1081-1090.
- Quiles Morales, J. J., Ochoa Herrera, J. J., y Ramírez-Tortosa, M. C. (2010). Bases biológicas del envejecimiento. En: Gil, A. (ed.). Tratado de Nutrición. Vol 1. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Sánchez de Medina F (coordinador). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 835-864.
- Rahati, S., Shahraki, M., Arjomand, G., y Shahraki, T. (2014). Food pattern, lifestyle and diabetes mellitus. *International Journal of High Risk Behaviors and Addiction*, 3(1), e8725.
- Rao, A. V., y Balachandran, B. (2002). Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutritional Neuroscience*, 5(5), 291-309.

- Reaven, G. M. (2005). Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Medica*, 47(4), 201-210.
- Reffitt, D. M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H. F. J., Evans, B. A. J., Thompson, R. P. H., y cols. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, 32(2), 127-135.
- Reincke, T., y Barthel, D. (1997). Silica uptake kinetics of *Halichondria panicea* in Kiel Bight. *Marine Biology*, 129(4), 591-593.
- Robberecht, H., Van Cauwenbergh, R., Van Vlaslaer, V., y Hermans, N. (2009). Dietary silicon intake in Belgium: Sources, availability from foods, and human serum levels. *Science of the Total Environment*, 407(16), 4777-4782.
- Rodella, L. F., Bonazza, V., Labanca, M., Lonati, C., y Rezzani, R. (2014). A review of the effects of dietary silicon intake on bone homeostasis and regeneration. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 18(9), 820-826.
- Rondeau, V., Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Helmer, C., y Dartigues, J. F. (2009). Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *American Journal of Epidemiology*, 169(4), 489-496.
- Rozenberg, O., Rosenblat, M., Coleman, R., Shih, D. M., y Aviram, M. (2003a). Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 774-784.
- Rozenberg, O., Shih, D. M., y Aviram, M. (2003b). Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 461-467.
- Sáez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C. A., y Small, D. H. (1999). Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1600-1608.
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., Siti Nor Akmar, A., Rafii, M. Y., Azizi, P., Tengoua, F. F., y cols. (2015). Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *BioMed Research International*, 2015, 396010.
- Sánchez-Chávez, G., y Salceda, R. (2008). Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *REB*, 27(2), 44-51.
- Sánchez Pozo, A., y Gil Hernández, A. (2010). Metabolismo de las lipoproteínas. En: Gil, A. (ed.). *Tratado de Nutrición*. Vol 1. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Sánchez de Medina F (coordinador). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 257-276.

- Sánchez-Muniz, F. J. (2004). Alimentos funcionales: Carne y derivados cárnicos. Presente y perspectivas. En: Jiménez Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. J., Olmedilla, B. (eds.). *La Carne y productos cárnicos como alimentos funcionales*. Fundación Española de la Nutrición. Editec@RED, S.L. Madrid., pp. 39-58.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2005). Nuevos alimentos. Realidad y perspectivas de la carne y sus derivados como alimentos funcionales. En: *Derivados cárnicos funcionales: Estrategias y perspectivas*, 1ª edición. Fundación Española de Nutrición (FEN). Madrid, pp. 43-54.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2016). Obesidad un grave problema de salud pública. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. En prensa.
- Sánchez-Muniz, F. J., y Bastida, S. (2008). Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(4), 295-301.
- Sánchez-Muniz, F. J., García Linares, M. C., García Arias, M. T., Bastida, S. y Viejo, J. (2003). Fat and protein from olive oil fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *The Journal of Nutrition*, 133, 2302-2308.
- Sánchez-Muniz, F.J.; Olivero-David, R.; Triki, M.; Salcedo, L.; González-Muñoz, M.J.; Cofrades, S.; y cols. (2012). Antioxidant activity of Hypericum perforatum L. extracts in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Research International*, 48, 909-915.
- Sánchez-Muniz, F. J., Bocanegra de Juana, A., Bastida, S., y Benedi, J. (2013). Algae and cardiovascular health. En: Domínguez, H. (ed.). *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Capítulo 11, Woohhead Publishing, Oxford, pp. 369-415.
- Sánchez-Muniz, F. J., y Sáenz Pérez, B. (2015). Importancia de la dieta en la Obesidad. En: Cascales, M., Ribas Ozonas, B., Sánchez-Muniz F. J. (eds.). *Segundo Curso Avanzado sobre Obesidad*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. ISBN. 978-84-938865-2-3
- Sánchez-Muniz, F. J., y Sáenz Pérez, B. (2016). Hidratación y dieta en la prevención y tratamiento de la obesidad Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. En prensa.
- Santos, L. F., Hernández, G., Varón, A., Beltrán, O., Botero, R. C., y Mejía, G. (2010). Enfermedad hepática por infiltración grasa no alcohólica: La nueva pandemia del milenio. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 25(4), 380-398.
- Schiano, A., Eisinger, F., Detolle, P., Laponche, A. M., Brisou, B., y Eisinger, J. (1979). [Silicon, bone tissue and immunity]. *Revue du Rhumatisme et des Maladies Osteo-articulaires*, 46(7-9), 483-486.
- Schliebs, R., y Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 113(11), 1625-1644.
- Schröder, H. C., Wiens, M., Schloßmacher, U., Brandt, D., y Müller, W. E. (2012). Silicatein-mediated polycondensation of orthosilicic acid: modeling of a catalytic mechanism involving ring formation. *Silicon*, 4(1), 33-38.

- Schultz, A., González-Torres, L.; Olivero David, R., Bastida, S., Benedí, J., y Sánchez-Muniz, F. J. (2010). Wakame and Nori in restructured meat included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods in Human Nutrition* 65, 295-298.
- Schultz Moreira, A. R., García-Fernández, R. A., Bocanegra, A., Méndez, M. T., Bastida, S., Benedí, J., y cols. (2013). Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolaemia and liver damage. *Food Chemical and Toxicology*, 56, 223-230.
- Schultz Moreira, A. R., Garcimartin, A., Benedí, J., Bastida, S., Jiménez-Escrig, A., Ruperez, P., y cols. (2014). Effects of *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* and *Porphyra umbilicalis* extracts on in vitro alfa-glucosidase activity and glucose diffusion. *Nutrición Hospitalaria*. 29, 1434-1446.
- Schultz Moreira, A., Olivero David, R., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Benedí, J., Bastida, S. y cols. (2014b) Protective effects of Sea Spaghetti-enriched restructured pork against dietary cholesterol. Effects on arylesterase and lipoprotein profile and composition of growing rats. *Journal of Medicinal Food*, 17, 921-928.
- Schwarz, K., y Milne, D. B. (1972). Growth-promoting effects of silicon in rats.
- Schwarz, K. (1977). Silicon, fibre, and atherosclerosis. *The Lancet*, 309(8009), 454-457.
- Schwarz, K., Ricci, B., Punsar, S., y Karvonen, M. (1977). Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in Finland. *The Lancet*, 309(8010), 538-539.
- Seaborn, C. D., y Nielsen, F. H. (1994). High dietary aluminum affects the response of rats to silicon deprivation. *Biological Trace Element Research*, 41(3), 295-304.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M. y cols. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618), 50-56.
- Sheedfar, F., Biase, S. D., Koonen, D., y Vinciguerra, M. (2013). Liver diseases and aging: friends or foes? *Aging Cell*, 12(6), 950-954.
- Serrano-Ríos, M., y Gutiérrez Fuentes, J. A. (2011). Obesity and type 2 diabetes mellitus. The reciprocal impact. *Obesity. Elsevier*, Amsterdam, pp. 215-232.
- Serrano Ríos, M., y Cascales Angosto, M. (2015). Resistencia a la insulina, inflamación y obesidad. En: Doadrio Villarejo, A. L. (ed.) *Segundo Curso Avanzado sobre obesidad*. Monografía XXXIX. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, pp. 374-401.
- Shabir, Q., Skaria, C., Brien, H. O., Loni, A., Barnett, C., y Canham, L. (2012). Taste and mouthfeel assessment of porous and non-porous silicon microparticles. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 1-6.
- Shim, K. H., Hulme, J., Maeng, E. H., Kim, M. K., y An, S. S. A. (2014). Analysis of SiO₂ nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate. *International Journal of Nanomedicine*, 9(Suppl 2), 207-215.
- Sinn, D. H., Gwak, G. Y., Park, H. N., Kim, J. E., Min, Y. W., Kim, K. M., y cols. (2012). Ultrasonographically detected non-alcoholic fatty liver disease is an independent predictor for

- identifying patients with insulin resistance in non-obese, non-diabetic middle-aged Asian adults. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(4), 561-567.
- Smil, V. (1997). Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American*, 277(1), 76-81.
- Smith, L. C., Pownall, H. J., y Gotto Jr, A. M. (1978). The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 47(1), 751-777.
- Soreq, H., y Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294-302.
- Spahis, S., Delvin, E., Borys, J. M., y Levy, E. (2016). Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*, doi:10.1089/ars.2016.6776.
- Sripanyakorn, S., Jugdaohsingh, R., Elliott, H., Walker, C., Mehta, P., Shoukru, S., y cols. (2004). The silicon content of beer and its bioavailability in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*, 91(3), 403-409.
- Sripanyakorn, S., Jugdaohsingh, R., Thompson, R. P., y Powell, J. J. (2005). Dietary silicon and bone health. *Nutrition Bulletin*, 30(3), 222-230.
- Sripanyakorn, S., Jugdaohsingh, R., Dissayabutr, W., Anderson, S. H., Thompson, R. P., y Powell, J. J. (2009). The comparative absorption of silicon from different foods and food supplements. *British Journal of Nutrition*, 102(06), 825-834.
- Stanković, M. N., Mladenović, D. R., Đuričić, I., Šobajić, S. S., Timić, J., Jorgačević, B., y cols. (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. *Archives of Medical Research*, 45(2), 116-124.
- Stein, Y., Dabach, Y., Hollander, G., Halperin, G., y Stein, O. (1983). Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 752(1), 98-105.
- Sumida, Y., Niki, E., Naito, Y., y Yoshikawa, T. (2013). Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radical Research*, 47(11), 869-880.
- Surh, Y. J., Kundu, J. K., y Na, H. K. (2008). Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*, 74(13), 1526-1539.
- Syn, W. K., Choi, S. S., y Diehl, A. M. (2009). Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 13(4), 565-580.
- Takahashi, Y., Soejima, Y., y Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2300-2308.
- Takizawa, Y., Hirasawa, F., Noritomi, E., Aida, M., Tsunoda, H., y Uesugi, S. (1988). Oral ingestion of silyoid to mice and rats and its chronic toxicity and carcinogenicity. *Acta Medica et Biologica*, 36(1), 27-56.

- Tale Ahmad, S., y Haddad, R. (2011). Study of silicon effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47(1), 17-27.
- Taylor, G. A., Newens, A. J., Edwardson, J. A., Kay, D. W., y Forster, D. P. (1995). Alzheimer's disease and the relationship between silicon and aluminium in water supplies in northern England. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 49(3), 323-324.
- Terpstra, A. H. M., Woodward, C. J. M. Sánchez-Muniz, F. J. (1981). Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum *Analytical Biochemistry*, 111, 149-157.
- Thamatrakoln, K., y Hildebrand, M. (2005). Approaches for functional characterization of diatom silicic acid transporters. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(1), 158-166.
- Than, N. N., y Newsome, P. N. (2015). A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, 239(1), 192-202.
- Toyota, Y., Yamamura, T., Miyake, Y., y Yamamoto, A. (1999). Low density lipoprotein (LDL) binding affinity for the LDL receptor in hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 147(1), 77-86.
- Trauner, M., Arrese, M., y Wagner, M. (2010). Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 299-310.
- Treguer, P., Nelson, D. M., Van Bennekom, A. J., y DeMaster, D. J. (1995). The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science*, 268(5209), 375.
- Trincă, L., Popescu, O., y Palamaru, I. (1999). Serum lipid picture of rabbits fed on silicate-supplemented atherogenic diet. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 103(1-2), 99-102.
- Tubek, S. (2006). Role of trace elements in primary arterial hypertension. *Biological Trace Element Research*, 114(1-3), 1-5.
- Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, M., Takase, H., Takano, K., y Takeuchi, N. (1978). Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *Journal of Lipid Research*, 19(5), 544-552.
- Unger, R. H. (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144(12), 5159-5165.
- Valero Zanuy, M. A., y León Sanz, M. (2010). Nutrición en la diabetes mellitus. En: Gil, A. (ed.). Tratado de Nutrición. Vol IV. Nutrición Clínica. Planas, M., Álvarez, J., Culebras, J. M., García de Lorenzo, A., León, M., Maldonado, A., y Montejo, J. C. (coordinadores). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 471-490.
- Van Dyck, K., Van Cauwenbergh, R., Robberecht, H., y Deelstra, H. (1999). Bioavailability of silicon from food and food supplements. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363(5-6), 541-544.

- Van Dyck, K., Robberecht, H., Van Cauwenbergh, R., Van Vlaslaer, V., y Deelstra, H. (2000). Indication of silicon essentiality in humans. *Biological Trace Element Research*, 77(1), 25-32.
- Vázquez-Velasco, M. (2015). Efectos del surimi de calamar enriquecido con glucomanano y/o espirulina sobre marcadores del síndrome metabólico en ratas Zucker fa/fa. Tesis Doctoral Europea. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Vázquez-Velasco, M., Lucas, R., Díaz, L.E., Gómez-Martínez, S., Bastida, S., Marcos, A., y cols. (2011). Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on cardiovascular disease risk factors. *British Journal of Nutrition*, 105, 1448-1452. Corrigendum in *British Journal of Nutrition*, 105, (2011), 1712.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., López-Gasco, P., Bastida, S., Benedí, J., y cols. (2014). Liver oxidation and inflammation in Fa/Fa rats fed glucomannan spirulina-surimi. *Food Chemistry* 159, 215-221.
- Velázquez (2014). *Farmacología Básica y Clínica*. Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A. y Portoles, A. (eds.) 18ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Verma, S., Jensen, D., Hart, J., y Mohanty, S. R. (2013). Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver International*, 33(9), 1398-1405.
- Villagrán Pérez, S., Rodríguez-Martín, A., Novalbos Ruiz, J. P., Martínez Nieto, J. M., y Lechuga Campoy, J. L. (2010). Hábitos y estilos de vida modificables en niños con sobrepeso y obesidad. *Nutrición Hospitalaria*, 25(5), 823-831.
- Villota, R., Hawkes, J. G., y Cochrane, H. (1986). Food applications and the toxicological and nutritional implications of amorphous silicon dioxide. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 23(4), 289-321.
- Wachter, H., Lechleitner, M., Artner-Dworzak, E., Hausen, A., Jarosch, E., Widner, B., y cols. (1998). Diatomaceous earth lowers blood cholesterol concentrations. *European Journal of Medical Research*, 3(4), 211-215.
- Wang, G. (2013). Hormesis, cell death, and regenerative medicine for neurodegenerative diseases. *Dose-Response*, 11(2), 238-254.
- Webber, L., Divajeva, D., Marsh, T., McPherson, K., Brown, M., Galea, G., y cols. (2014). The future burden of obesity-related diseases in the 53 WHO European-Region countries and the impact of effective interventions: a modelling study. *British Medical Journal Open*, 4(7), e004787.
- Willhite, C. C., Ball, G. L., y McLellan, C. J. (2012). Total allowable concentrations of monomeric inorganic aluminum and hydrated aluminum silicates in drinking water. *Critical Reviews in Toxicology*, 42(5), 358-442.
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M., y cols. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely

- middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, *140*(1), 124-131.
- Winkler, C., Wirleitner, B., Schroecksnadel, K., Schennach, H., y Fuchs, D. (2006). Beer down-regulates activated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *International Immunopharmacology*, *6*(3), 390-395.
- Wong, V. W. S., Chu, W. C. W., Wong, G. L. H., Chan, R. S. M., Chim, A. M. L., Ong, A., y cols. (2012). Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in Hong Kong Chinese: a population study using proton-magnetic resonance spectroscopy and transient elastography. *Gut*, *61*(3), 409-415.
- Wouters, K., van Gorp, P. J., Bieghs, V., Gijbels, M. J., Duimel, H., Lütjohann, D., y cols. (2008). Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, *48*(2), 474-486.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., y cols. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, *334*(6052), 105-108.
- Sureda, F. X., Junyent, F., Verdaguer, E., Auladell, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., y cols. (2011). Antiapoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(3), 230-245.
- Xie, J., Jiang, H., Wan, Y. H., Du, A. Y., Guo, K. J., Liu, T., y cols. (2011). Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*, *3*(4), 250-259.
- Yamagishi, S. I., Nakamura, N., y Matsui, T. (2016). Glycation and cardiovascular disease in diabetes: A perspective on the concept of metabolic memory. *Journal of Diabetes*, Aug 24. doi: 10.1111/1753-0407.12475. [Epub ahead of print].
- Yoo, B. W., Choi, S. I., Kim, S. H., Yang, S. J., Koo, H. C., Seo, S. H., y cols. (2001). Immunostimulatory effects of anionic alkali mineral complex solution Barodon in porcine lymphocytes. *Journal of Veterinary Science*, *2*(1), 15-24.
- Yuan, Y. V., y Kitts, D. D. (1997). Endogenous antioxidants: Role of antioxidant enzymes in biological systems. En: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, AOCs Press, Champaign, Illinois: 15, 258-270.
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Halpern, Z., y Oren, R. (2006). Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver International*, *26*(7), 856-863.
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Blendis, L., Halpern, Z., y cols. (2007). Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *Journal of Hepatology*, *47*(5), 711-717.

- Zhang, W., Bai, M., Xi, Y., Hao, J., Liu, L., Mao, N., y cols. (2012). Early memory deficits precede plaque deposition in APP^{swE}/PS1^{dE9} mice: involvement of oxidative stress and cholinergic dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8), 1443-1452.
- Zhu, X., Raina, A. K., Perry, G., y Smith, M. A. (2004). Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *The Lancet Neurology*, 3(4), 219-226.
- Zhu, X., Lee, H. G., Perry, G., y Smith, M. A. (2007). Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(4), 494-502.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., y Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus L.*). *Plant Science*, 167(3), 527-533.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., y Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782-787.
- Zimmet, P., Alberti, M. M., George, K., y Serrano Ríos, M. (2005). Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Revista Española de Cardiología*, 58(12), 1371-1376.