



Original

Artículo español

Ausencia de efecto antiadipogénico en pez cebra de los polifenoles de extracto de hueso de aceituna.

No antiadipogenic effect in zebrafish of polyphenols in an olive seed extract.

Carmen Veciana Galindo¹, Luís Torro Montell¹, Eliana Sirvent Segura¹, Antonio Palazón-Bru², María Mercedes Rizo-Baeza³, Francisco Vicente Gil-Guillén² y Ernesto Cortés-Castell⁴.

¹Laboratorio de Biotecnología y Proyectos. Biopartner S.L. España.

²Departamento Medicina Clínica. Universidad Miguel Hernández. España.

³Departamento de Enfermería y Nutrición. Universidad de Alicante. España.

⁴Departamento Farmacología, Pediatría y Q. Orgánica. Universidad Miguel Hernández. España.

Resumen

Introducción y objetivo. Los polifenoles de la oliva presentan actividad antiinflamatoria, previenen la apoptosis por estrés oxidativo favorecen el neurodesarrollo y neuroprotección y tienen efecto antiadipogénico en diferentes modelos celulares. Se pretende analizar este posible efecto antiadipogénico en pez cebra midiendo la ganancia de peso, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos.

Material y métodos. Se han utilizado huevos fecundados e incubados en placas de pocillos a 26±1°C durante 72 horas: Grupo control en agua con DMSO al 0,1%. Grupo intervención, añadiendo extracto polifenólico a 100mg/l. Al finalizar la incubación se procedió a la cuantificación en ambos grupos de la masa corporal de las larvas secas, proteínas, colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos.

Resultados y discusión. Los valores de peso analizados no muestran diferencias entre control e intervención, igualmente todos los demás parámetros analizados no han presentado diferencias significativas con la introducción del extracto durante la incubación. Estos resultados no son concluyentes debido posiblemente a que no se ha tenido en cuenta que el tejido adiposo aparece en el pez cebra a las 120 horas postfertilización. Esto abre nuevas perspectivas de estudio de nuestro extracto de polifenoles, ya mostrado como eficaz con efecto antiadipogénico en la diferenciación de fibroblastos de ratón a adipocitos.

Conclusión. Se deben realizar nuevos ensayos con el fin de confirmar o descartar el efecto sobre diferentes parámetros relacionados con el metabolismo lipídico, ensayos que tengan en cuenta las condiciones fisiológicas normales del modelo animal escogido.

Palabras clave

Polifenoles; olivo; antiadipogénesis; pez cebra.

Abstract

Background and aim. Olive polyphenols have anti-inflammatory activity, prevent apoptosis by oxidative stress, promote neuroprotection and neurodevelopment, and have antiadipogenic effect in different cell models. The aim of this study was to analyze the possible antiadipogenic effect of olive polyphenols in zebrafish, measuring weight gain, cholesterol, triglycerides and fatty acids.

Material and methods. Fertilized eggs were used and incubated in well plates with 26±1°C for 72 hours: Control group in water with dimethyl sulfoxide (0.1%); Intervention group, like the control group, but adding polyphenolic extract (concentration: 100 mg/l). After incubation we proceeded to measure body mass of dry larvae, proteins, total cholesterol, triglycerides and fatty acids.

Results and discussion. No differences were shown between control and intervention group in all the analyzed parameters. These results were inconclusive possibly because we did not take into account that adipose tissue appears in zebrafish within 120 hours post-fertilization. This opens new perspectives to study our extract, as we showed its antiadipogenic effectiveness in the differentiation of mouse fibroblasts to adipocytes.

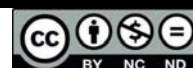
Conclusion. New studies should be performed in order to confirm or exclude the effect of olive polyphenols on lipid metabolism. These studies should take into account normal physiological conditions of the animal model chosen.

KEYWORDS

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ernesto.cortes@umh.es (Ernesto Cortés Castell).

Recibido el 22 de julio de 2016; aceptado el 30 de julio de 2016.



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia:
Articles published in this journal are licensed with a:
Creative Commons Attribution 4.0.
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
La revista no cobra tasas por el envío de trabajos,
ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

Polyphenols, olive tree, antiadipogenic, zebrafish.

Introducción:

Está ampliamente demostrada la acción de los polifenoles en diversos procesos beneficiosos para la salud como antiinflamación, antioxidantes, antimutagénicos, anticáncer, etc. También existen evidencias de los efectos beneficiosos sobre la obesidad, favoreciendo la apoptosis tanto a nivel del preadipocito como del adipocito, e inhibiendo la acumulación de lípidos⁽¹⁾.

En concreto, los polifenoles del té verde presentan actividad antiobesidad en cultivos celulares y modelos animales al incrementar la oxidación de grasa y el efecto termogénico⁽²⁾. El resverastrol frena la diferenciación de las células mesenquimales a adipocitos y osteoblastos, con efecto antiadipogénico⁽³⁾, además de tener una función deslipidemiante durante la maduración de los preadipocitos mediante reducción del receptor de proliferación peroxisomal PPAR y la expresión de lipoproteína lipasa⁽⁴⁾. Así, los extractos de la piel de uva ricos en polifenoles administrados en la alimentación a ratones tienen un efecto antiobesidad, con efecto supresor de la actividad de enzimas lipogénicas mediante cambios en la expresión de genes relacionados con la lipogénesis y la oxidación en tejido adiposo e hígado⁽⁵⁾. También los polifenoles de manzana previenen la adiposidad actuando a nivel de PPAR y en parte mediante procesos epigenéticos⁽⁶⁾. Por último, en ratones, la oleuropeína reduce la acumulación de grasa en las células 3T3-L1 durante la diferenciación del preadipocito, posiblemente mediante regulación de genes que contribuyen a reducir la masa corporal y la acumulación de grasa⁽⁷⁾.

Nosotros hemos demostrado previamente que extractos de huesos de oliva, en los que los polifenoles más abundantes son la oleuropeína y el hidroxitirosol, presentan actividad antiinflamatoria en monocitos humanos⁽⁸⁾, previenen la apoptosis de neuroblastoma humano por estrés oxidativo⁽⁹⁾, tienen efecto positivo sobre el neurodesarrollo y neuroprotección en pez cebra⁽¹⁰⁾ y, especialmente relacionado con el presente trabajo, un efecto antiadipogénico en la diferenciación de fibroblastos de ratón a adipocitos⁽¹¹⁾.

En el presente trabajo se ha analizado el posible efecto antiadipogénico del extracto de oliva en pez cebra (*Danio rerio*), analizando ganancia de peso, cantidad de grasa acumulada y tipo de ácidos grasos presentes, empleando concentraciones de polifenoles previamente demostradas como bioseguras en el mismo modelo animal, el pez cebra⁽¹²⁾.

Material y métodos:

Sujetos. Se escogieron huevos inmediatamente después de ser fecundados, sin ninguna anomalía externa o con membranas dañadas, y se transfirieron a placas de 24 pocillos.

Métodos. Las placas fueron incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas bajo las siguientes condiciones experimentales: 1) Grupo control: en 3 pocillos se colocaron los huevos fecundados en agua con dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich D2438) al 0,1%; 2) Grupo intervención: en 51 pocillos, idénticos a los anteriores, salvo que se coloca además el extracto polifenólico a concentración biosegura para los peces cebra (100 mg/l). Al finalizar la incubación durante 72 horas se procedió a la cuantificación de las diferentes variables.

Variables analizadas. Masa corporal, mediante medida en balanza de 0,1 mg de precisión de un total de 40 larvas en tubo ependorf previamente calibrado, revisando previamente que todas ellas estaban en perfectas condiciones. No se pudo realizar con un menor número de larvas por límite de precisión de la balanza. Las larvas, antes de su pesado, fueron fijadas en etanol absoluto (1 ml por tubo) durante 30 min, después se retiró el alcohol y se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

Colesterol total, mediante técnica fluorimétrica⁽¹³⁾, colocando 6 embriones en 300 μl de solución de fosfato monobásico 0,1 M pH 7 y 0,5% Tritóm X-100. Se homogeniza en molino vibratorio a 30 vibraciones/s durante 30 s, y se centrifuga 5 minutos a 10000 rpm. Se recogen 25 μl del sobrenadante a los que se añaden 2,5 ml del reactivo de cuantificación, se agita en vortex, se incuba 5 min a 37°C y se mide la absorbancia a 500 nm. Los valores de colesterol se obtienen por interpolación con curva de estándares.

Triglicéridos, se procede con las larvas de forma análoga a la medida de colesterol y se procede a la determinación de triglicéridos mediante reacción colorimétrica⁽¹⁴⁾. Para ello, se toman 50 μl del sobrenadante y se añaden 5 ml de reactivo de medida, se agita en vortex, se incuba 5 min a 37°C y se mide absorbancia a 500 nm.

Ácidos grasos, se determinaron mediante extracción previa con 800 μl de metanol por cada ml de sobrenadante de las larvas homogeneizadas, agitando a 60°C durante 10 min bajo atmósfera de nitrógeno, se filtra en fibra de vidrio, se lava repetidas veces con la mezcla metanol/agua (8/10) y todas las fracciones metanólicas se evaporan bajo corriente de nitrógeno. El extracto se metila con metanol a 100°C durante 1 h en tubos herméticamente cerrados y agitando cada 10 min. Se deja enfriar y se lleva a sequedad con nitrógeno. Se resuspende en 0,5 ml de n-hexano y se separan los ácidos grasos en columna Supelco SP-2380 (60 m x 0,25 mm x 0,2 μm) mediante cromatografía de gases (Agilent 7890 A Series GC) con detección de ionización de llama⁽¹⁵⁾.

Estudio estadístico. El grupo control se conformó con 3 réplicas y el grupo de intervención se realizaron 51 repeticiones. El estudio estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student para comparar medias entre grupo intervención y grupo control. Las rectas de calibrado fueron ajustadas mediante el método de ajuste lineal de Ellman modificado. Se utilizó el programa estadístico Epidat versión 3.1 y se consideraron diferencias significativas para $p < 0,05$.

Resultados:

En la Tabla 1 se expresan los porcentajes de cada uno de los parámetros estudiados frente al grupo control, observándose que no existen diferencias significativas ni el peso de los embriones, ni en sus niveles de colesterol o de triglicéridos.

Variable	Control (n=3)	Intervención (n=51)	P
Peso (g)	0,023 (0,001)	0,023(0,001)	0,75
Proteínas (µg/ml)	475(172)	452(120)	0,841
Colesterol (µg/ml)	11(3)	10(2)	0,626
Triglicéridos (µg/ml)	58(48)	34(13)	0,479
Colesterol/proteína	0,025(0,008)	0,025(0,007)	0,848
Triglicéridos/proteína	0,099(0,047)	0,118(0,067)	0,576

Respecto a los ácidos grasos determinados, los mayoritarios están expresados en la Tabla 2, en la que se observa un ligero aumento del palmítico, oleico y linoléico a expensas de la reducción del esteárico y del docosahexaenoico, sin diferencias significativas.

Ácido graso % p/p	Control (n=3)	Intervención (n=51)	P
Palmítico	32,8(1,0)	32,5(1,0)	0,75
Esteárico	13,2(0,8)	13,0(0,9)	0,709
Oleico	20,9(1,2)	20,9(1,1)	0,625
Linoléico	9,9(1,2)	10,6(1,3)	0,432
Docosahexaenoico	23,2(1,0)	22,6(1,0)	0,75

Discusión:

En este estudio se analizó el efecto de la suplementación con el extracto polifenólico de huesos de oliva sobre factores relacionados con la obesidad en larvas de pez cebra, durante las 72 horas postfertilización. Se han determinado peso corporal, grasa total, colesterol, triglicéridos y perfil de ácidos grasos, no encontrándose diferencias con las larvas del grupo control.

El pez cebra se ha postulado como buen modelo animal, al presentar homología fisiológica significativa con los mamíferos, incluyendo al hombre⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, con las ventajas frente a otros animales de experimentación de un desarrollo más rápido, mayor tasa de reproducción, menor coste, entre otras. Además, algunos estudios apuntan a que la obesidad inducida por la dieta en pez cebra comparte rutas fisiológicas con los mamíferos⁽¹⁹⁻²¹⁾, sugiriéndose que puede ser utilizado como modelo alternativo para estudios de obesidad.

Así, ha sido utilizado como modelo para el estudio de la aterosclerosis inducida por una dieta alta en colesterol⁽²²⁾ y en la obesidad inducida por la sobreexpresión de la proteína endógena antagonista de melanocortina (AgRP)⁽²¹⁾. Por otro lado, también ha sido utilizado el pez cebra adulto en el estudio de la obesidad inducida a través de la dieta y el efecto sobre la misma del extracto rico en polifenoles de té verde durante 40 días, disminuyendo el peso corporal, la acumulación de grasa y la expresión de genes del metabolismo lipídico⁽²²⁾.

Nuestros resultados no pueden considerarse concluyentes, siendo posiblemente la causa de no observarse cambios a que el tiempo de exposición ha sido muy pequeño en comparación con los 40 días utilizados con los polifenoles de té verde⁽²²⁾, pero también a que el tejido adiposo aparece en el pez cebra a las 120 horas postfertilización^(24,25). Esto abre nuevas perspectivas de estudio de nuestro extracto de polifenoles, ya mostrado como eficaz con efecto antiadipogénico en la diferenciación de fibroblastos de ratón a adipocitos expresado como disminución del porcentaje de grasa acumulada y expresión de los genes de leptina y PPAR γ ⁽¹¹⁾.

Como conclusión, se deben realizar nuevos ensayos con el fin de confirmar o descartar el efecto sobre diferentes parámetros relacionados con el metabolismo lipídico, mediante ensayos que tengan en cuenta las condiciones fisiológicas normales del modelo animal escogido.

Referencias

1. Hsu CL, Yen GC. Phenolic Compounds: Evidence for Inhibitory Effects against Obesity and Their Underlying Molecular Signalling Mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:53-61.

2. Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50:176-87.
3. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Synergism between resveratrol and other phytochemicals: implications for obesity and osteoporosis. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:1177-85.
4. Lasa A, Churrua I, Eseberri I, Andrés-Lacueva C, Portillo MP. Delipidating effect of resveratrol metabolites in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 2012; ;56:1559-68.
5. Park HJ, Jung UJ, Lee MK, Cho SJ, Jung HK, Hong JH et al. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:360-4.
6. Boqué N, de la Iglesia R, de la Garza AL, Milagro FI, Olivares M, Bañuelos O et al. Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:1473-8.
7. Kuem N, Song SJ, Yu R, Yun JW, Park T. Oleuropein attenuates visceral adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b- and galanin-mediated signalings. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58:2166-76.
8. Cortés-Castell E, Veciana C, Torró L, Sirvent E, Rizo-Baeza MM, Gil-Guillén VF. Actividad antiinflamatoria de un extracto polifenólico de huesos de oliva en la línea celular de monocitos humanos THP1-XBLUE-CD14. *Nutr Hosp* 2014; 30:113-7.
9. Cortés-Castell E, Veciana C, Torró L, Palazón-Bru A, Sirvent E, Gil-Guillén VF et al. Protection by polyphenol extract from olive stones against apoptosis produced by oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Nutr Hosp* 2016; 33:118-22.
10. Cortés-Castell E, Veciana C, Torró L, Sirvent E, Rizo-Baeza MM, Gil-Guillén VF. Efecto sobre el neurodesarrollo y neuroprotección en pez cebra de un extracto polifenólico de huesos de aceituna. *Nutr Hosp* 2014; 30:338-42.
11. Veciana C, Cortés-Castell E, Torró L, Palazón-Bru A, Sirvent E, Rizo-Baeza MM et al. Antiadipogenic activity of an olive seed extract in mouse fibroblasts. *Nutr Hosp* 2015; 31:2747-51.
12. Veciana C, Cortés-Castell E, Torró L, Sirvent E, Rizo-Baeza MM, Gil-Guillén FV. Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutr Hosp* 2014; 29: 1388-93.
13. Mizoguchi T, Edano T, Koshi T. A method of direct measurement for the enzymatic determination of cholesteryl esters. *J Lipid Res* 2004; 45:396-401.
14. Nanjee MN, Miller NE. Sequential microenzymatic assay of cholesterol, triglycerides, and phospholipids in a single aliquot. *Clin Chem* 1996; 42:915-26.
15. Coudere F. Gas chromatography/tandem mass spectrometry as an analytical tool for identification of fatty acids. *Lipids* 1995; 30:691-9.
16. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 2000; 10:1351-8.
17. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 2002; 3:717-24.
18. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007; 8:353-67.
19. Henderson RJ, Tocher DR. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog Lipid Res* 1987; 26:281-347.
20. Hölttä-Vuori M, Salo VT, Nyberg L, Brackmann C, Enejder A, Panula P et al. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem J* 2010; 429:235-42.
21. Song Y, Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J* 2007; 21:2042-9.
22. Stoletov K, Fang L, Choi SH, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res* 2009; 104:952-60.
23. Hasumura T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Nishimura Y, Meguro S, Takema Y et al. Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9):73.
24. Flynn EJ, Trent ChM, Rawls JF. Ontogenic and nutritional control of adipogenic in zebrafish. *Lipid Res* 2009; 50:1641-52.
25. Imrie D, Sadler KC. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Dev Dyn* 2010; 239:3013-23.