



MÁSTER OFICIAL EN NUTRICIÓN Y METABOLISMO

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**EFFECTO DE UNA SUPLEMENTACIÓN CON SOFRITO SOBRE MARCADORES
DEL ENVEJECIMIENTO Y DAÑO EN EL DNA EN UN MODELO DE OBESIDAD
CON RATAS ZUCKER**

MARCELA MARIEL HERNÁNDEZ GARCÍA

DIRIGIDO POR:
DRA. JOANA RELAT PARDO

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN Y
GASTRONOMÍA FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA
ALIMENTACIÓN UNIVERSIDAD DE BARCELONA

JUNIO 2022

RESUMEN

Introducción: La obesidad acelera los procesos característicos del envejecimiento y podría ser considerada como una disfunción metabólica prematura. El envejecimiento puede ser modulado por intervenciones dietéticas. La dieta mediterránea se asocia con un menor riesgo de enfermedades relacionadas con la vejez y con una mayor longevidad. El sofrito, una salsa característica de la cocina mediterránea, rica en compuestos bioactivos con efecto antioxidante y antiinflamatorio, podría tener un impacto beneficioso en el envejecimiento. *Objetivo:* Evaluar el efecto de una suplementación con sofrito en marcadores del envejecimiento y daño oxidativo del DNA en un modelo de obesidad con ratas Zucker. *Materiales y Métodos:* Ratas Zucker delgadas y obesas fueron alimentadas con una dieta control suplementada o no con 2% p/p de sofrito durante 8 semanas; posteriormente fueron sacrificadas. Se midió la expresión hepática relativa de los genes *Rap1* y *p53* mediante RT-qPCR a partir de muestras de RNA aislado. Adicionalmente se evaluó el daño oxidativo del DNA de tejido hepático de las distintas muestras por medio de una ELISA competitiva. *Resultados:* Se encontró una tendencia a una mayor expresión de *Rap1* en las ratas obesas en comparación con las delgadas. El daño oxidativo del DNA fue mayor en el grupo de ratas obesas suplementadas con sofrito en relación con el del grupo de ratas obesas alimentadas con la dieta control. Igualmente, la expresión de *p53* fue mayor en el grupo de ratas obesas suplementadas con sofrito comparada con la del grupo de ratas delgadas alimentadas con la dieta control. *Conclusiones:* El consumo de sofrito aumenta los niveles de daño oxidativo en tejido hepático de ratas Zucker obesas y podría incrementar la expresión hepática de *p53*. Se requieren más estudios que permitan dilucidar cómo el sofrito, y la dieta en general, podrían modular los procesos relacionados con el envejecimiento.

Palabras clave: dieta mediterránea, envejecimiento, obesidad, senescencia, sofrito, enfermedad degenerativa

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	5
2.1 OBJETIVO GENERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1 ANIMALES Y DIETAS.....	5
3.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y RT-PCR CUANTITATIVA	6
3.3 EXTRACCIÓN Y DIGESTIÓN DEL DNA.....	6
3.4 ELISA COMPETITIVA DEL DAÑO DEL DNA	7
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	7
4. RESULTADOS.....	8
4.1 LA SUPLEMENTACIÓN CON SOFRITO NO TIENE EFECTO EN LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE RAP1	9
4.2 LA SUPLEMENTACIÓN CON SOFRITO AUMENTA LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE P53.....	10
4.3 LA SUPLEMENTACIÓN CON SOFRITO AUMENTA LOS NIVELES DE DAÑO OXIDATIVO DEL DNA.....	11
5. DISCUSIÓN	12
6. CONCLUSIÓN	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18
ANEXO I.....	22
ANEXO II.....	23

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos dos siglos la esperanza y calidad de vida han mejorado; sin embargo, la prevalencia de obesidad también ha ido en aumento, minimizando los beneficios de salud que brindan las civilizaciones modernas. La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de condiciones asociadas a la vejez como son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, los desórdenes neurodegenerativos, la sarcopenia y la diabetes mellitus. Hay estudios que demuestran que la obesidad acelera los procesos característicos del envejecimiento e incluso existe evidencia que sugiere que la obesidad y el envejecimiento son regulados por vías similares (1). Algunos autores han postulado que la obesidad debe ser considerada como una disfunción metabólica prematura, semejante al envejecimiento; y que de seguir aumentando su incidencia la esperanza de vida podría comenzar a disminuir, sobre todo en países desarrollados (2,3).

Uno de los mecanismos mediante el cual la obesidad podría acelerar el envejecimiento es a través del acortamiento de la longitud de los telómeros inducido por un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) (3). La atrición telomérica desencadena cambios metabólicos incluyendo disfunción mitocondrial, agotamiento de células madre y comunicación intercelular alterada (1). Los telómeros, localizados en las terminaciones de los cromosomas y cuya función es prevenir la pérdida de DNA genómico, se componen de repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG unidas por un complejo proteico conocido como *shelterin*, el cual protege estas terminaciones y regula la actividad de la enzima encargada de compensar la atrición telomérica, la telomerasa. Este complejo está formado por seis proteínas: TRF1, *telomere repeat binding factor 1*; TRF2, *telomere repeat binding factor 2*; TIN2, *TRF1 interacting nuclear factor 2*; POT1, *protection of telomeres 1*; TPP1, *TIN2 interacting protein 1*; y RAP1, *repressor / activator protein 1* (4,5). Existe evidencia que sugiere que RAP1, podría tener un papel en la regulación de la longitud telomérica (LT) en un contexto de deficiencia de telomerasa. En un estudio reciente (4) con ratones knockout para *Rap1* y *Terc*, *telomerase RNA component*,

uno de los dos genes que codifican para la telomerasa, se observó una LT reducida y disminución en la supervivencia y esperanza de vida en comparación con aquellos ratones que eran únicamente deficientes para *Terc*. Por otra parte, RAP1 desempeña un rol extratelomérico al regular la expresión de genes implicados en la inflamación, estrés oxidativo y metabolismo, como el *peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara)* y el *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1 α)* (4–6). En un estudio realizado por Martínez *et al.* (5) se demostró que ratones knockout para *Rap1*, desarrollan obesidad más tempranamente y muestran desregulaciones metabólicas, por lo que se propone que RAP1 podría tener un papel protector ante la obesidad. Los niveles de RAP1 podrían ser modulados por un acortamiento de la LT y por la respuesta al daño del DNA, situaciones que se observan tanto en el envejecimiento como en la obesidad (7).

La disfunción telomérica se ha relacionado con muchos aspectos del proceso de envejecimiento. Un acortamiento de la LT es percibido como daño del DNA y puede desencadenar la respuesta al daño del DNA, la cual ocasiona una cascada de señalización centrada en la *ATMK, ataxia-telangiectasia mutated kinase*, que finalmente activa a la proteína supresora de tumores 53, p53. Al ser activada, p53 puede ocasionar apoptosis o senescencia celular dependiendo del tipo de célula y el contexto fisiológico. La senescencia celular es un programa genético complejo que establece un arresto del crecimiento celular permanente, y cuyo propósito principal es prevenir la propagación de células dañadas y evitar su transformación neoplásica. Se ha demostrado que las células senescentes se acumulan con la edad, y en vista de que pierden su capacidad para proliferar estas son incapaces de participar en los procesos necesarios de reparación y renovación de los tejidos para su correcto funcionamiento (1,8,9). Además, de acuerdo a López-Otín *et al.* (1), las células senescentes experimentan alteraciones dramáticas en su secretoma, el cual se caracteriza por ser rico en citoquinas proinflamatorias, y recibe el nombre de “fenotipo secretor asociado a la senescencia”; este es capaz de modificar el microambiente de los tejidos disminuyendo su función, aumentando la

inflamación, ocasionando efectos perjudiciales en células adyacentes y un agotamiento de células madre, de tal manera que se propicia el desarrollo de enfermedades y fenotipos relacionados al envejecimiento.

Por otra parte, según Sahin *et al.* (10) la disfunción telomérica, a través de p53, también reprime PGC-1 α y PGC-1 β ocasionando una disminución en la biogénesis y masa mitocondrial, la producción de energía y defensa oxidativa; proponiendo que el eje telómero-p53-PGC se asocia a una atrofia progresiva, disminución funcional y falla metabólica. Estos hallazgos relacionan el daño del DNA, la mitocondria y el envejecimiento, y demuestran que la regulación de la respiración mitocondrial mediante p53 afecta la longevidad (8). Por lo tanto, a pesar de su importante papel como supresor tumoral, una activación excesiva de p53 podría ser perjudicial para el envejecimiento.

En la actualidad, es necesario identificar estrategias que promuevan un envejecimiento saludable (11), el cual de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define como “desarrollar y mantener la capacidad funcional que permite el bienestar en la vejez” (12). Cada vez surge más evidencia de que el proceso de envejecimiento puede ser modulado mediante intervenciones dietéticas (13). La Dieta Mediterránea (MedDiet) se caracteriza por una alta ingesta de frutas, verduras, nueces, leguminosas y granos enteros; además de una alta ingesta de aceite de oliva y pescado, un consumo regular pero moderado de alcohol y una ingesta reducida de productos lácteos, aves y carnes rojas. La evidencia sugiere que la MedDiet se asocia con un menor riesgo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y con una mayor longevidad (11,14); asimismo, hay estudios que demuestran que la MedDiet protege a las células del estrés oxidativo de tal manera que previene la senescencia celular, la apoptosis y la atrición telomérica (15). El sofrito es una salsa compuesta de tomate, cebolla, aceite de oliva y en ocasiones ajo, comúnmente utilizada en la preparación de platillos en la cocina mediterránea. Se ha visto que su alto contenido de compuestos bioactivos, como el licopeno, la naringenina y el hidroxitirosol, le confieren una actividad antioxidante y

antiinflamatoria; y que gracias a que su método de preparación aumenta la bioaccesibilidad de algunos de estos compuestos, el sofrito puede tener efectos beneficiosos para la salud, con una menor incidencia de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con el envejecimiento (16–18).

Por lo tanto, en el presente trabajo se estudiará el efecto de una suplementación con sofrito sobre marcadores del envejecimiento y daño en el DNA en un modelo de ratas Zucker obesas. Nuestra hipótesis es que la suplementación con sofrito podría mejorar los efectos del envejecimiento a nivel transcriptómico y oxidativo en las ratas obesas. Finalmente, este estudio está relacionado con dos investigaciones previas donde se demostró el efecto protector de sofrito contra la resistencia a la insulina (19) y las alteraciones vasculares (20); y con un Trabajo de Fin de Máster realizado en el 2021 (21), en el cual se evidenció que la suplementación con sofrito aumenta la expresión hepática del gen *Terc* en ratas Zucker obesas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la suplementación con sofrito en marcadores de envejecimiento y daño en el DNA.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos se plantean:

- Evaluar la expresión de genes relacionados con el envejecimiento y metabolismo en ratas Zucker obesas. Específicamente, se determinarán los niveles relativos de mRNA de los genes *Rap1* y *p53* a partir de muestras de hígado de ratas Zucker alimentadas con una dieta control suplementada o no con sofrito y se analizarán las diferencias entre los grupos.
- Cuantificar los niveles del daño oxidativo del DNA de tejido hepático de los distintos grupos mediante la medición de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales y dietas

Los procedimientos de los animales utilizados en este trabajo fueron previamente descritos en Rodríguez-Rodríguez *et al.* (20). En resumen, ratas Zucker macho, obesas y delgadas, fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos distintos a las 8 semanas de edad ($n=8$): ratas delgadas alimentadas con dieta control (LC), ratas obesas alimentadas con dieta control (OC), ratas delgadas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito al 2% (p/p) (LS) y ratas obesas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito al 2% (p/p) (OS). La dieta control (Tekland Global 2018) fue proporcionada por Harlan Laboratories (Milán, Italia) y el sofrito por Gallina Blanca-Star (Barcelona, España). La composición nutricional del sofrito se encuentra descrita en el Anexo I. El porcentaje de la suplementación con sofrito (2%) fue calculado considerando un consumo humano de una porción de sofrito por

día con las comidas. Se utilizó el contenido de licopeno en hígado como biomarcador de la ingesta de sofrito.

Se evaluó semanalmente el peso y la ingesta de alimento. Tras 8 semanas de intervención nutricional, los animales fueron sacrificados y se recolectaron muestras de sangre, hígado y tejido adiposo visceral perirenal y retroperitoneal. El protocolo para el manejo y experimentación animal fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona (557/16).

3.2 Transcripción Reversa y RT-PCR cuantitativa

A partir de muestras de RNA aislado de tejido hepático se sintetizó cDNA utilizando 1,5 ug de RNA total usando el kit de transcripción reversa de cDNA de alta capacidad (4368814, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Posteriormente se midieron los niveles relativos de mRNA de los genes *Rap1* y *p53* mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) utilizando SYBR™ Select Master MIX para CFX (4472942, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La amplificación y detección se realizó utilizando el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). Las secuencias de los cebadores utilizados en la RT-qPCR se presentan en el ANEXO II. Los resultados se normalizaron respecto al gen *B2m*. Los niveles relativos de expresión de mRNA se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (22).

3.3 Extracción y Digestión del DNA

Se realizó la extracción del DNA a partir de muestras de hígado congeladas a -80°C. Posteriormente se hizo la digestión con Nucleasa P1 (M0660S, New England Biolabs, Ipswich, EUA) para después ser tratado con Fosfatasa Alcalina Termosensible (EF0651, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.4 ELISA competitiva del daño del DNA

Para determinar y cuantificar el nivel de daño oxidativo del DNA se midió la cantidad de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo) usando el kit de ELISA competitiva del daño del DNA (EIADNAD, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Se utilizó un lector de placas multimodo (Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) para medir la absorbancia a 450 nm y se realizó una curva sigmoideal de 4 parámetros con GraphPad Prism 9.3.1.

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con GraphPad (GraphPad, Prism versión 9.3.1). Todos los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Los ensayos de expresión génica se presentan como niveles relativos de mRNA y se refieren a 1 asignado al grupo control, LC. Para evaluar las diferencias significativas entre los diferentes grupos de intervención se utilizaron las pruebas ANOVA y t de student, según el caso. Un p -valor $<0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

Se midió la expresión relativa de mRNA de los genes *Rap1* y *p53* en todas las muestras de hígado disponibles de los cuatro grupos de intervención: ratas delgadas alimentadas con dieta control (LC) ($n=8$), ratas delgadas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito (LS) ($n=4$) ratas obesas alimentadas con dieta control (OC) ($n=7$) y ratas obesas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito (OS) ($n=8$) .

A continuación se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Expresión relativa de mRNA en hígado tras la intervención en ratas Zucker delgadas y obesas.

Grupo de intervención	<i>Rap1</i>	<i>p53</i>
LC ($n=8$)	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,11
LS ($n=4$)	0,87 ± 0,36	1,19 ± 0,30
OC ($n=7$)	1,97 ± 0,34	1,08 ± 0,12
OS ($n=8$)	2,05 ± 0,23*	1,59 ± 0,13

LC, ratas delgadas alimentadas con dieta control; LS, ratas delgadas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito; OC, ratas obesas alimentadas con dieta control; OS, ratas obesas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito.

Los resultados se expresan como la media ± SEM. Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de un factor. * $p < 0,05$ contra LC.

4.1 La suplementación con sofrito no tiene efecto en la expresión hepática de *Rap1*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión hepática de *Rap1* entre los distintos grupos después de la intervención (LC vs LS p -valor= 0,993; LC vs OC p -valor= 0,146; LC vs OS p -valor= 0,092; LS vs OC p -valor= 0,085; LS vs OS p -valor=0,051; OC vs OS p -valor =0,995). Sin embargo; como se puede observar en la Figura 1, hubo una tendencia a una mayor expresión de *Rap1* en las ratas obesas, tanto en el grupo alimentado con la dieta control (OC) como en el que recibió la dieta control más la suplementación con sofrito (OS). La suplementación con sofrito no tuvo efectos significativos entre los grupos de ratas delgadas ni en los de ratas obesas.

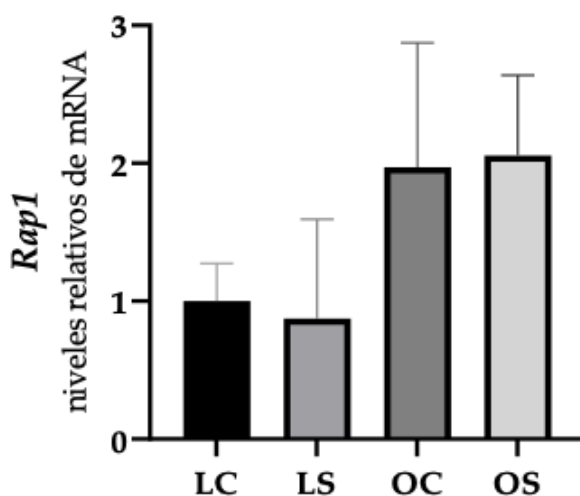


Figura 1. Niveles de expresión relativa de *Rap1* en hígado tras la intervención con sofrito en ratas Zucker delgadas y obesas. LC, ratas delgadas alimentadas con dieta control; LS, ratas delgadas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito; OC, ratas obesas alimentadas con dieta control; OS, ratas obesas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito. Los datos se expresan como la media \pm SEM (n = 4–8). Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de un factor.

4.2 La suplementación con sofrito aumenta la expresión hepática de p53

Como se muestra en la Figura 2, el grupo de ratas obesas suplementadas con sofrito (OS) tuvo una mayor expresión hepática de p53 en comparación con el grupo de ratas delgadas control (LC) (p -valor=0,019). Además se observó una tendencia a un aumento en la expresión de p53 en el grupo de ratas obesas suplementadas con sofrito (OS) en comparación con las ratas obesas que recibieron únicamente la dieta control (OC) (p -valor= 0,079). No se encontraron diferencias significativas entre los otros grupos (LC vs LS p =0,815; LC vs OC p =0,973; LS vs OC p =0,962; LS vs OS p =0,326).

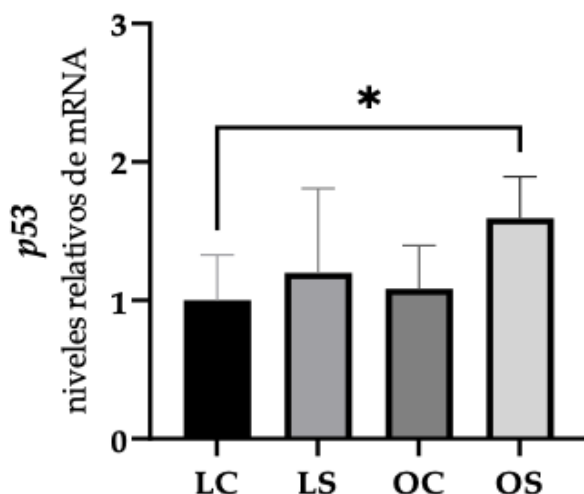


Figura 2. Niveles de expresión relativa de p53 en hígado tras la intervención con sofrito en ratas Zucker delgadas y obesas. LC, ratas delgadas alimentadas con dieta control; LS, ratas delgadas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito; OC, ratas obesas alimentadas con dieta control; OS, ratas obesas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito.

Los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 4-8$). Análisis estadístico realizado con la prueba ANOVA de un factor. * $p < 0,05$ contra LC.

4.3 La suplementación con sofrito aumenta los niveles de daño oxidativo del DNA

Adicionalmente se cuantificaron los niveles de 8-oxo, un biomarcador del daño oxidativo, en el DNA de tejido hepático. El grupo de ratas obesas suplementadas con sofrito (OS) presentó mayores niveles de 8-oxo en comparación con las ratas obesas alimentadas únicamente con la dieta control (OC) (p -valor= 0,028) (Figura 3). Respecto a los grupos de ratas delgadas, LC y LS, los niveles de 8-oxo fueron similares a los del grupo OC (datos no mostrados).

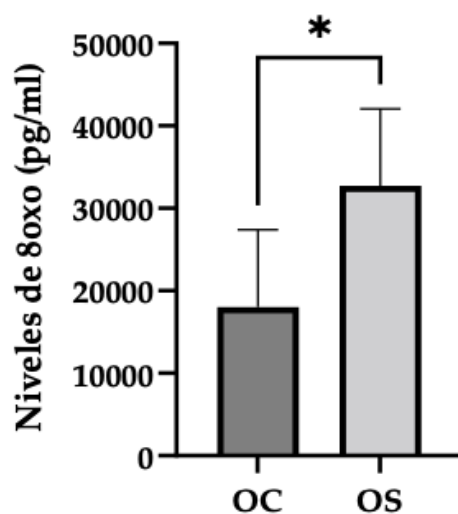


Figura 3. Niveles de 8-oxo en el DNA de tejido hepático de ratas Zucker obesas tras la intervención. OC, ratas obesas alimentadas con dieta control; OS, ratas obesas alimentadas con dieta control suplementada con sofrito.

Los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 5-6$). Análisis estadístico realizado con la prueba t-student de dos colas. $*p < 0,05$ contra OC.

5. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso multifactorial y su curso es modificable. Los factores dietéticos y de estilo de vida son de gran importancia ya que pueden modular este procedimiento (1).

Se piensa que la obesidad podría ser capaz de aumentar la edad biológica de células y tejidos, o por lo menos influir en los procesos de envejecimiento (2), por lo tanto, en el presente trabajo se estudió el efecto de una suplementación con sofrito, un componente de la MedDiet, la cual es reconocida por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, en la expresión hepática de genes relacionados con el envejecimiento y metabolismo y en los niveles de daño oxidativo del DNA de tejido hepático en un modelo de obesidad con ratas Zucker.

La obesidad induce un acortamiento de la LT a través de un exceso de estrés oxidativo y acelerando la tasa de erosión de los telómeros por replicación; de tal manera que puede desencadenar el comienzo de enfermedades asociadas al envejecimiento (9). También existe evidencia de que RAP1 se asocia a TRF2 y protege las terminaciones teloméricas, por lo que podría tener un papel en la regulación de la LT (4,23). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la expresión hepática de *Rap1* tiende a ser mayor en los grupos OC y OS, es decir en las ratas obesas, en comparación con los grupos LC y LS, las ratas delgadas, independientemente de la suplementación con sofrito. Considerando el papel protector de RAP1 y que en la obesidad se observa un acortamiento de la LT, estos resultados podrían indicar un posible mecanismo compensatorio para prevenir la progresión del acortamiento de la LT a través de una mayor expresión de *Rap1*. Por otra parte, la sobreproducción de ROS que se presenta en la obesidad también puede inducir un estado proinflamatorio mediado a través de la activación del factor nuclear kB (NF-kB). El NF-kB regula la expresión génica de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-1 β (IL-1 β) (24), por lo que el NF-kB funciona como enlace entre la obesidad y la inflamación. Teo *et al.* (25) demostraron en un estudio realizado con células 293T y ratones heterocigoto deficientes de un alelo funcional de *Rap1* que

la activación del NF- κ B ocasiona un aumento de la expresión de RAP1 tanto a nivel de mRNA como de proteína, de modo que los niveles elevados de *Rap1* observados en los grupos OC y OS podrían estar relacionados a un estado proinflamatorio asociado a la obesidad. No obstante, se necesitan más estudios que permitan explicar los mecanismos mediante los cuales la obesidad podría aumentar la expresión de *Rap1*.

Además de tener un papel en el mantenimiento de la LT, RAP1 también ha demostrado tener funciones relacionadas con el metabolismo energético. En una investigación realizada por Martínez *et al.* (5), evidenciaron que RAP1 puede regular la transcripción de *Ppara* y *Pgc-1 α* , genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos. Por lo tanto, sería interesante analizar en el futuro la expresión de genes que son regulados por este complejo, por ejemplo: CPT1, la enzima limitante de la velocidad de la oxidación de ácidos grasos; o proteínas transportadoras de ácidos grasos como CD36 y SLC27a2.

Como se ha mencionado anteriormente, la obesidad se relaciona con una pérdida del equilibrio redox; las ROS producidas pueden oxidar los ácidos nucleicos y dañar el DNA de los organismos. El 8-oxo es la lesión del DNA mejor caracterizada y resulta de la oxidación directa de las bases de guanina. Debido a esto el 8-oxo es utilizado como biomarcador de daño oxidativo y estrés en el organismo (26). En los resultados de este trabajo se demuestra que el grupo OS tuvo mayores niveles de 8-oxo en comparación con el grupo OC (p -valor=0,028); los resultados de los grupos LC y LS fueron muy similares a los del grupo OC (datos no mostrados). Inesperadamente parece que el consumo del sofrito tiene un efecto oxidativo que se observa exacerbado en condiciones de obesidad. En un estudio previo relacionado con el presente trabajo (19) se observó que el grupo OS no aumentó de peso aunque consumió más kcal en comparación con el grupo OC. Considerando que la cuantificación de 8-oxo fue realizada en muestras de hígado este resultado podría ser consecuencia de un metabolismo incrementado, que contribuye al mantenimiento del peso pero resulta en un mayor metabolismo oxidativo en los tejidos. En este caso, un aumento en el metabolismo oxidativo

hepático implicaría una mayor actividad de la fosforilación oxidativa y un mayor riesgo de generar ROS y estrés oxidativo en el hígado de las ratas obesas suplementadas con sofrito (OS) que podría explicar el incremento en 8-oxo observado. En futuros análisis sería interesante medir los niveles de 8-oxo en plasma u otros tejidos para poder ampliar estas observaciones. Por otro lado, algunos estudios realizados en núcleo aislado de hígados de ratas (27–30) han evaluado el efecto independiente de algunos compuestos bioactivos presentes en el sofrito, entre ellos: naringenina, quercetina, miricetina, kaempferol y los ácidos cafeico, ferúlico y gálico; y se ha reportado que estos pueden tener un efecto pro-oxidativo dependiendo de su concentración y la presencia de metales como el hierro y el cobre. Por el contrario, Storniolo *et al.* mencionan en dos estudios (31,32) realizados con cultivos celulares que es importante considerar las interacciones sinérgicas de los diferentes compuestos bioactivos para investigar los efectos beneficiosos de las preparaciones culinarias, y en este sentido han demostrado que el sofrito es capaz de reducir el estrés oxidativo. Y finalmente, desde una perspectiva más general, Mitjavila *et al.* demostraron en una investigación (33) que la MedDiet reduce los niveles de 8-oxo en orina de individuos obesos con síndrome metabólico. De tal manera que de acuerdo a los resultados del presente trabajo y la bibliografía se requieren más estudios que expliquen las vías y los mecanismos de acción mediante los cuales el sofrito podría estar aumentando los niveles de 8-oxo en el DNA hepático.

Por otra parte, existe evidencia de que p53 aumenta en obesidad tanto a nivel de mRNA como de proteína. Igualmente, se ha demostrado en ratones genéticamente obesos que los niveles de proteína de p53, de ROS, y de la expresión de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias se encuentran aumentados (34). En los resultados de este trabajo se observó que el grupo OS tuvo una mayor expresión hepática de p53 en comparación con el grupo LC (p -valor=0,019). Considerando que los niveles de p53 son determinados por señales ambientales y de estrés, este aumento podría estar relacionado a la obesidad. Estos resultados son de gran relevancia puesto que se ha descrito que niveles elevados de p53 se asocian con

el desarrollo prematuro del envejecimiento (35). Adicionalmente, se observó una tendencia a un aumento en la expresión de *p53* en el grupo OS en comparación con el grupo OC (p -valor= 0,079), demostrando que el sofrito puede ser el causante de este incremento. Una posible explicación de esto podría ser el aumento de los niveles de estrés oxidativo en el grupo OS que se evidenciaron anteriormente con la cuantificación de 8-oxo, ya que este estímulo puede aumentar la expresión de *p53*. Tomando en cuenta que *p53* es una proteína supresora de tumores, capaz de inducir apoptosis y senescencia celular, podría ser que, debido al incremento del daño oxidativo causado por el sofrito, *p53* se esté sobreexpresando para limitar el daño y prevenir una transformación neoplásica, puesto que existe evidencia de una fuerte relación entre la obesidad, el envejecimiento y el cáncer (34). Los niveles de expresión de *p53* del grupo OC fueron ligeramente inferiores en comparación con los del grupo LS; sin embargo, es necesario considerar que este grupo tenía en particular un tamaño muestral pequeño y presentó una gran dispersión en sus resultados, por lo que estos deben ser interpretados con discreción. Por lo tanto, se necesitan más estudios que permitan explicar los mecanismos moleculares mediante los cuales el sofrito aumenta la expresión hepática de *p53* en las ratas obesas.

Finalmente, en una investigación con ratones realizada por Sahin *et al.* (10), evidenciaron que *p53* puede reprimir la expresión de PGC-1 α y PGC-1 β y por consecuencia afectar la función y biogénesis mitocondrial, la gluconeogénesis y la defensa oxidativa, ocasionando así una disminución funcional y falla metabólica que se puede observar tanto en la obesidad como en el envejecimiento. En un estudio previo, relacionado con el presente trabajo, realizado por Sandoval *et al.* (19) se evidenció que el grupo OS tuvo una menor expresión de *Pgc-1 β* en comparación con el grupo OC, esto podría estar relacionado a la tendencia de una mayor expresión de *p53* en el grupo OS; sin embargo, este resultado no fue significativo. Sería interesante analizar en el futuro la expresión de *Pgc-1 α* para investigar si existe una asociación directa en la muestra estudiada.

Limitaciones del estudio y futuras investigaciones

El presente trabajo tiene algunas limitaciones que pudieron haber influido en su interpretación: un tamaño muestral pequeño, el sexo de las ratas (sólo se analizaron machos) y el uso de ratas Zucker como modelo, las cuales son genéticamente obesas. En el futuro, serían de gran utilidad investigaciones que evalúen el efecto de la suplementación con sofrito en la expresión de genes diana de RAP1 y p53, analizar los niveles de proteína de p53, realizar cuantificaciones de daño oxidativo en otros tejidos, medir la expresión de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y estudios donde se analice el efecto del sofrito en la longitud de los telómeros. Además de acuerdo a Rodríguez-Rodríguez *et al.* (20) un periodo más largo de suplementación con sofrito podría permitir mejores apreciaciones.

6. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se analizó el efecto de una suplementación con sofrito sobre marcadores del envejecimiento y daño en el DNA en un modelo de obesidad. Sorpresivamente se observó que el consumo de sofrito aumenta los niveles de daño oxidativo en ratas Zucker obesas, indicando que este podría ser el motivo del aumento de la expresión de *p53* que se presentó en las ratas obesas que recibieron la suplementación. Es importante no descartar otros mecanismos mediante los cuales el sofrito podría estar produciendo este efecto, por lo que se requieren más estudios que permitan dilucidar cómo el sofrito, y la dieta en general, podrían modular los procesos relacionados con el envejecimiento y posteriormente replicarlo en humanos. Finalmente mencionar que para mantener la salud y reducir el riesgo de enfermedades no es suficiente con consumir ciertos productos, preparaciones culinarias o compuestos bioactivos reconocidos por sus beneficios sino que se debe de perseguir un estilo de vida saludable que involucre actividad física y una dieta balanceada que permita desarrollar y mantener la capacidad funcional que favorece el bienestar a lo largo de la vida.

BIBLIOGRAFÍA

1. López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. Metabolic Control of Longevity. *Cell*. 2016 Aug 11;166(4):802–21.
2. Jura M, Kozak LP. Obesity and related consequences to ageing. *Age*. 2016 Feb 1;38(23).
3. Tam BT, Morais JA, Santosa S. Obesity and ageing: Two sides of the same coin. *Obes Rev*. 2020 Apr 1;21(4).
4. Martínez P, Gómez-López G, Pisano DG, Flores JM, Blasco MA. A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1 in telomere maintenance. *Aging Cell*. 2016 Dec 1;15(6):1113–25.
5. Martínez P, Gómez-López G, García F, Mercken E, Mitchell S, Flores JM, et al. RAP1 Protects from Obesity through Its Extratelomeric Role Regulating Gene Expression. *Cell Rep*. 2013 Jun 27;3(6):2059–74.
6. Cai Y, Liu H, Song E, Wang L, Xu J, He Y, et al. Deficiency of telomere-associated repressor activator protein 1 precipitates cardiac aging in mice via p53/PPAR α signaling. *Theranostics*. 2021 Mar 4;11(10):4710–27.
7. Duong MLT, Sahin E. RAP1: Protector of Telomeres, Defender against Obesity. *Cell Rep*. 2013 Jun 27;3(6):1757–8.
8. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: The critical roles of p53. *Oncogene*. 2013 Feb 18;32(43):5129–43.
9. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: Aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*. 2007 Oct 16;35(22):7475–84.
10. Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Müller FL, Guo M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 2011 Feb 17;470(7334):359–65.
11. Crous-Bou M, Molinuevo JL, Sala-Vila A. Plant-Rich Dietary Patterns, Plant Foods and Nutrients, and Telomere Length. *Adv Nutr*. 2019 Nov 1;10:S296–303.
12. Decade of healthy ageing 2020-2030 [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 5]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/decade-of-healthy-ageing-plan-of-action>

13. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell*. 2015 Mar 26;161(1):106–18.
14. Shannon OM, Ashor AW, Scialo F, Saretzki G, Martin-Ruiz C, Lara J, et al. Mediterranean diet and the hallmarks of ageing. *Eur J Clin Nutr*. 2021 Jan 29;75(8):1176–92.
15. Boccardi V, Esposito A, Rizzo MR, Marfella R, Barbieri M, Paolisso G. Mediterranean Diet, Telomere Maintenance and Health Status among Elderly. *PLoS ONE*. 2013 Apr 30;8(4).
16. Vallverdú-Queralt A, Alvarenga JFR de, Estruch R, Lamuela-Raventos RM. Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito. *Food Chem*. 2013 Jun 14;141(4):3365–72.
17. Storniolo CE, Sacanella I, Mitjavila MT, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Bioactive compounds of cooked tomato sauce modulate oxidative stress and arachidonic acid cascade induced by oxidized LDL in macrophage cultures. *Nutrients*. 2019 Aug 1;11(8).
18. Hurtado-Barroso S, Martínez-Huélamo M, de Alvarenga JFR, Quifer-Rada P, Vallverdú-Queralt A, Pérez-Fernández S, et al. Acute effect of a single dose of tomato sofrito on plasmatic inflammatory biomarkers in healthy men. *Nutrients*. 2019 Apr 1;11(4).
19. Sandoval V, Rodríguez-Rodríguez R, Martínez-Garza Ú, Rosell-Cardona C, Lamuela-Raventós RM, Marrero PF, et al. Mediterranean Tomato-Based Sofrito Sauce Improves Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Signaling in White Adipose Tissue of Obese ZUCKER Rats. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Feb 1;62(4).
20. Rodríguez-Rodríguez R, Jiménez-Altayó F, Alsina L, Onetti Y, Rinaldi de Alvarenga JF, Claro C, et al. Mediterranean tomato-based sofrito protects against vascular alterations in obese Zucker rats by preserving NO bioavailability. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Sep 1;61(9).
21. Comesañó D. Efecto del consumo regular de sofrito en la expresión de genes relacionados con el envejecimiento y el metabolismo en ratas Zucker obesas. [Barcelona]: Universitat de Barcelona; 2021.

22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
23. Sfeir A, Kabir S, van Overbeek M, Celli GB, de Lange T. Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science*. 2010 Mar 26;327(5973):1657–61.
24. Nani A, Murtaza B, Khan AS, Khan NA, Hichami A. Antioxidant and anti-inflammatory potential of polyphenols contained in Mediterranean diet in obesity: Molecular mechanisms. *Molecules*. 2021 Feb 12;26(985).
25. Teo H, Ghosh S, Luesch H, Ghosh A, Wong ET, Malik N, et al. Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF- κ B-dependent gene expression. *Nat Cell Biol*. 2010 Jul 11;12(8):758–67.
26. Mikkelsen L, Bialkowski K, Risom L, Løhr M, Loft S, Møller P. Aging and defense against generation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jun 21;47(5):608–15.
27. Sahu SC, Gray GC. Lipid Peroxidation and DNA Damage Induced by Morin and Naringenin in Isolated Rat Liver Nuclei. *Food Chem Toxicol*. 1997;35:443–7.
28. Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett*. 1996;104:193–6.
29. Maurya DK, Devasagayam TPA. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol*. 2010 Dec;48(12):3369–73.
30. Abarikwu SO, Durojaiye M, Alabi A, Asonye B, Akiri O. Curcumin protects against gallic acid-induced oxidative stress, suppression of glutathione antioxidant defenses, hepatic and renal damage in rats. *Ren Fail*. 2016 Feb 7;38(2):321–9.
31. Storniolo CE, Sacanella I, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Bioactive Compounds of Mediterranean Cooked Tomato Sauce (Sofrito) Modulate Intestinal Epithelial Cancer Cell Growth through Oxidative Stress/Arachidonic Acid Cascade Regulation. *ACS Omega*. 2020 Jul 9;5(28):17071–7.

32. Storniolo CE, Sacanella I, Mitjavila MT, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Bioactive compounds of cooked tomato sauce modulate oxidative stress and arachidonic acid cascade induced by oxidized LDL in macrophage cultures. *Nutrients*. 2019 Aug 13;11(8).
33. Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvadó J, Covas MI, Borrego S, Estruch R, et al. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr*. 2013;32(2):172–8.
34. Krstic J, Reinisch I, Schupp M, Schulz TJ, Prokesch A. P53 functions in adipose tissue metabolism and homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 4;19(2622).
35. Labuschagne CF, Zani F, Vousden KH. Control of metabolism by p53 – Cancer and beyond. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Jun 5;1870(1):32–42.

ANEXO I

Composición nutricional del sofrito

Ingredientes: Tomate (pulpa y concentrado) 50%, cebolla 37%, aceite de oliva virgen extra (12%) y sal.

	Información nutricional		
	100g	Por porción*	%**
Calorías	536kJ/136Kcal	281kJ/68Kcal	3%
Grasa Total	12g	6,0g	9%
Saturada	1,7g	0,9g	5%
Sodio	0,5g	0,25g	1%
Carbohidratos Totales	5,5g	2,8g	2%
Fibra Dietética	1,0g	0,5g	
Azúcares	4,0g	2,0g	1%
Proteína	1,0g	0,5g	4%

** Los valores porcentuales diarios están basados en 2000 kcal

Fuente: Sandoval V, Rodríguez-Rodríguez R, Martínez-Garza Ú, Rosell-Cardona C, Lamuela-Raventós RM, Marrero PF, et al. Mediterranean Tomato-Based Sofrito Sauce Improves Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Signaling in White Adipose Tissue of Obese ZUCKER Rats. Mol Nutr Food Res. 2018;62(4):1–6.

ANEXO II

Secuencias de los cebadores utilizados en las RT-qPCR

Gen		Secuencia (5'-3')
<i>B2m</i>	Forward	CGTCGTGCTTGCCATTCAGA
	Reverse	AGGAAGTTGGGCTTCCCATTC
<i>Rap1</i>	Forward	GGCGGAGGTAATGGATCTGG
	Reverse	CCGCACGTAAAACGACATGG
<i>p53</i>	Forward	CCTATCCGGTCAGTTGTTGGA
	Reverse	TTGCAGAGTGGAGGAAATGG