

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
EL SILICIO COMO TRATAMIENTO FRENTE A LA
ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA

Autor: Marina Hernández Martín

Tutor: M^a Elvira López-Oliva Muñoz

Convocatoria: Junio

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
1.1 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	4
1.2. PROGRESIÓN DE ESTEATOSIS A ESTEATOHEPATITIS	5
1.3. TRATAMIENTO DE HGNA Y EHNA.....	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	9
4.1. EL SILICIO EN LOS SERES VIVOS	10
4.2. EFECTO PROTECTOR DEL SILICIO EN DIVERSAS ENFERMEDADES	11
4.3. EL SILICIO COMO MICRONUTRIENTE	13
4.4. EL SILICIO EN HGNA Y SU PROGRESIÓN A EHNA.....	14
<i>Estudios “in vitro”</i>	15
<i>Estudios “in vivo”</i>	18
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

La esteatosis hepática no alcohólica (HGNA) es una patología asociada al síndrome metabólico de gran incidencia en los países desarrollados. Cursa con una infiltración lipídica en el hígado, provocando estrés oxidativo que puede progresar a esteatohepatitis (EHNA). En la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico aprobado para HGNA/EHNA y se recomienda la adopción de hábitos de vida saludables para revertir su evolución. Recientemente se ha demostrado la eficacia del Silicio como micronutriente en la formación de tejido conectivo y desarrollo del sistema inmune, así como su empleo en el tratamiento de diversas patologías como osteoporosis o enfermedades neurodegenerativas. Estudios “in vivo” e “in vitro” muestran su efecto terapéutico frente a las alteraciones hepáticas debido a su capacidad protectora frente al estrés oxidativo. Como agente antioxidante, el silicio favorece la expresión de las enzimas antioxidantes. Asimismo, muestra un efecto anti-apoptótico mediado por la inhibición de vía caspasa-dependiente, lo que favorece la viabilidad celular en hepatocitos tratados con H₂O₂ y además, reduce la oxidación de las LDL y los niveles del colesterol y triglicéridos en sangre actuando como agente hipolipémico. Por todo ello, el Silicio puede considerarse un excelente candidato para el tratamiento y prevención de la HGNA y su progresión.

ABSTRACT

Non-alcoholic hepatic steatosis is a pathology associated with the metabolic syndrome, with a high incidence in developed countries. It courses with a lipid infiltration in the liver, causing oxidative stress that will cause its progression to steatohepatitis. There are non-pharmacological treatments. The treatment consists of the adoption of healthy life habits. The effectiveness of Silicon as a micronutrient in the formation of connective tissue and in the development of the immune system and its use in the treatment of various pathologies such as osteoporosis or neurodegenerative diseases has been demonstrated. Recent studies "in vivo" and "in vitro" have shown the protective capacity of silicon against oxidative stress. As an antioxidant agent, silicon enhances the activation of antioxidant enzymes expression. It also shows an anti-apoptotic effect which is mediated by the inhibition of caspase-dependent pathway that improves cell viability in hepatocytes treated with H₂O₂. In addition, Si reduces the LDL oxidation and, cholesterol and triglycerides levels in serum acting as hypolipemic agent. Silicon can be considered an excellent candidate for the treatment and prevention of NAFLD and its progression.

1.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una enfermedad multifactorial caracterizada por una infiltración de grasa en los hepatocitos asociada al cuadro patológico del síndrome metabólico (resistencia a la insulina (RI), niveles de triglicéridos en sangre elevados, dislipemia y/o diabetes mellitus tipo 2), con ausencia de exposición a sustancias tóxicas como el alcohol u otras enfermedades del hígado (Brunt, 2004) . Comprende un amplio rango de enfermedades hepáticas que van desde la esteatosis macrovesicular (HGNA), es decir, el acúmulo graso en el hígado, hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), debida a la toxicidad provocada por el exceso de lípidos en la que interactúan determinantes metabólicos e inflamatorios progresando en un daño tisular que tendrá como manifestaciones la fibrosis y la cirrosis (López-Oliva & Muñoz-Martínez, 2014). Es conocida, por tanto, como la manifestación hepática del síndrome metabólico.

La incidencia de esta enfermedad hepática en la población se considera alta (20-30% en los adultos y 3-10% en los niños), según cifras de EEUU extrapolables a Europa y, por tanto, a España, lo cual además, se ve agravado por la obesidad (80-90%) y la diabetes tipo 2 (3-50%) que acentúan el problema, pudiendo desarrollar EHNA hasta en el 35% de los casos. La incidencia de estas enfermedades, junto con las cardiovasculares, se encuentra en aumento en la actualidad en las sociedades de países desarrollados, debido su estilo de vida sedentario y a la elevada ingesta calórica, por lo que la presencia de una de estas enfermedades irá acompañada del desarrollo de otras. Es lo que se conocerá como síndrome metabólico. Por lo tanto, las enfermedades derivadas de este estilo de vida como son la obesidad, dislipemias, hipertensión o diabetes, son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad del HGNA. Esto se traduce en que las cifras obtenidas de obesidad y diabetes pueden camuflar la prevalencia de esta enfermedad haciendo menos perceptible su gravedad. Asimismo, al mostrar un cuadro asintomático en muchos casos, unido a la ausencia de marcadores o alteraciones fisiológicas específicas, provoca que la enfermedad no se encuentre adecuadamente valorada (Nicholas y col., 2007).

A pesar de no tener un cuadro clínico con unas manifestaciones específicas en los primeros estadios de la enfermedad, gracias a la realización de numerosos ensayos clínicos se ha llegado a comprender su patogenia que tiene su origen en la RI. Este estado de RI da lugar a un elevado aporte de ácidos grasos libres (AGL) al hígado y un incremento de la lipogénesis *de novo* hepática y, en menor medida, causa una disfunción

en la oxidación de los ácidos grasos (AG) y/o de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado, produciéndose un desequilibrio que favorece el excesivo acúmulo de triglicéridos (TG) en el mismo (Donnelly y col. 2005). El aumento de la lipogénesis *de novo*, inducida por la hiperglucemia e hiperinsulinemia, provocará un incremento de la gluconeogénesis y glucogenólisis dando hiperglucemia que agravará la RI ya existente. Los productos del metabolismo de los AG también interfieren en la actividad de la insulina inhibiendo algunas cascadas de señalización o activando factores de transcripción (FT) como SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador del estero), ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) y LXR (receptor X hepático) que inducen la expresión de enzimas glucolíticas y lipogénicas (controlan genes del metabolismo del colesterol) dando un incremento en la lipogénesis *de novo* (López-Oliva & Muñoz-Martínez, 2014). Por ello, estos factores de transcripción están siendo investigados como posible diana terapéutica.

El incremento de lípidos a nivel hepático también es debido a la ingesta por una dieta hipercalórica. El incremento de las proteínas de transporte de AGL permite una mayor captación de los mismos por parte del hígado, así como de la sobreproducción de VLDL, con su consiguiente conversión en lipoproteínas de baja (LDL) e intermedia (IDL) densidad, que disminuirá la capacidad de hígado de exportar TG. Asimismo, las vías de utilización de AG como la β -oxidación mitocondrial se encuentran disminuidas debido a que el exceso lipídico ha sobrepasado su capacidad metabólica y también hay un descenso en la acción oxidativa de los peroxisomas (López-Oliva & Muñoz-Martínez, 2014).

Los AG son los compuestos que ocasionan la toxicidad en este grupo de patologías. En el hígado serán metabolizados a TG constituyendo las gotas de grasa que se aprecian en este órgano cuando se observa la esteatosis, tratándose de un mecanismo de defensa que permite eliminar los AGL tóxicos (Donnelly y col.,2005).

1.2. PROGRESIÓN DE ESTEATOSIS A ESTEATOHEPATITIS

El mecanismo de la progresión del HGNA a la EHNA todavía es desconocido. Se produce por interacción de diferentes factores, tanto genéticos como ambientales, de secuencia desconocida. Se explica tradicionalmente con la hipótesis del doble impacto “two-hit hypothesis” que postula que una dieta rica en grasas o la RI conducen a hígado graso (primer impacto). Este exceso de grasa sensibiliza al hígado frente a otros daños (segundo impacto) como el estrés oxidativo o las citoquinas y adipoquinas, que desencadenan el proceso inflamatorio y la fibrosis (Koo, 2013). En la actualidad esta teoría está siendo

reemplazada por el modelo de lipotoxicidad, que parte de la premisa de que todos los posibles determinantes metabólicos e inflamatorios de la EHNA no actúan por separado, sino que son interactivos y colaboran en la progresión al daño tisular (Tilg & Moschen, 2010) (López-Oliva & Muñoz-Martínez, 2014).

Los factores que contribuyen a la progresión de la HGNA a EHNA son: la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la disminución de la capacidad de defensa antioxidante. Se ha postulado como uno de los elementos que indica la progresión de la enfermedad, la aparición de cambios estructurales y funcionales en las mitocondrias hepáticas. Se observa también un aumento en la oxidación de AG por vía mitocondrial que generará especies libres de oxígeno (ROS), cuyo mayor exponente clínico es el H₂O₂, y su consiguiente estrés oxidativo. Esto tiene como causa directa la disfunción mitocondrial puesto que interfieren en la cadena respiratoria e integridad del DNA mitocondrial, lo cual contribuirá al desarrollo de la esteatosis, puesto que inhibe la β-oxidación. Se aprecia un aumento en los productos de la peroxidación que amplificarán el efecto de las ROS al dañar membranas e inactivar compuestos celulares, intensificando la disfunción mitocondrial y perpetuando la elevada concentración de ROS. El aumento consecutivo de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial permitirá la liberación al citosol de proteínas proapoptóticas, que inducen la muerte de los hepatocitos y favorecen el desarrollo de la inflamación y la fibrosis. Las ROS inducirán, por tanto, la síntesis de citoquinas proinflamatorias el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) e interleuquina 6 y 8 (IL-6, IL-8) que propiciarán el mantenimiento de la RI, la muerte celular, la quimiotaxis de neutrófilos, la formación del infiltrado inflamatorio y la activación de las células de Kupffer, cuyo reclutamiento es crítico para la propagación de la inflamación y del daño tisular. A su vez inducen fibrosis por estimulación de las células estrelladas que proliferan y se activan, transformándose en microfibriloblastos que incrementarán la matriz extracelular con su producción de colágeno (López-Oliva & Muñoz-Martínez, 2014).

Además, ha sido encontrado un mecanismo de estrés del retículo endoplásmico (RE) que está implicado en la progresión de esta patología y es debido a alteraciones en la homeostasis que afectan a la capacidad de plegado de proteínas del RE (Malhi & Kaufman, 2011). Esto es provocado por los AGL que actúan de forma tóxica alterando este mecanismo de plegado, lo que derivará en daño hepático y apoptosis de los hepatocitos (Zhang y col. 2014).

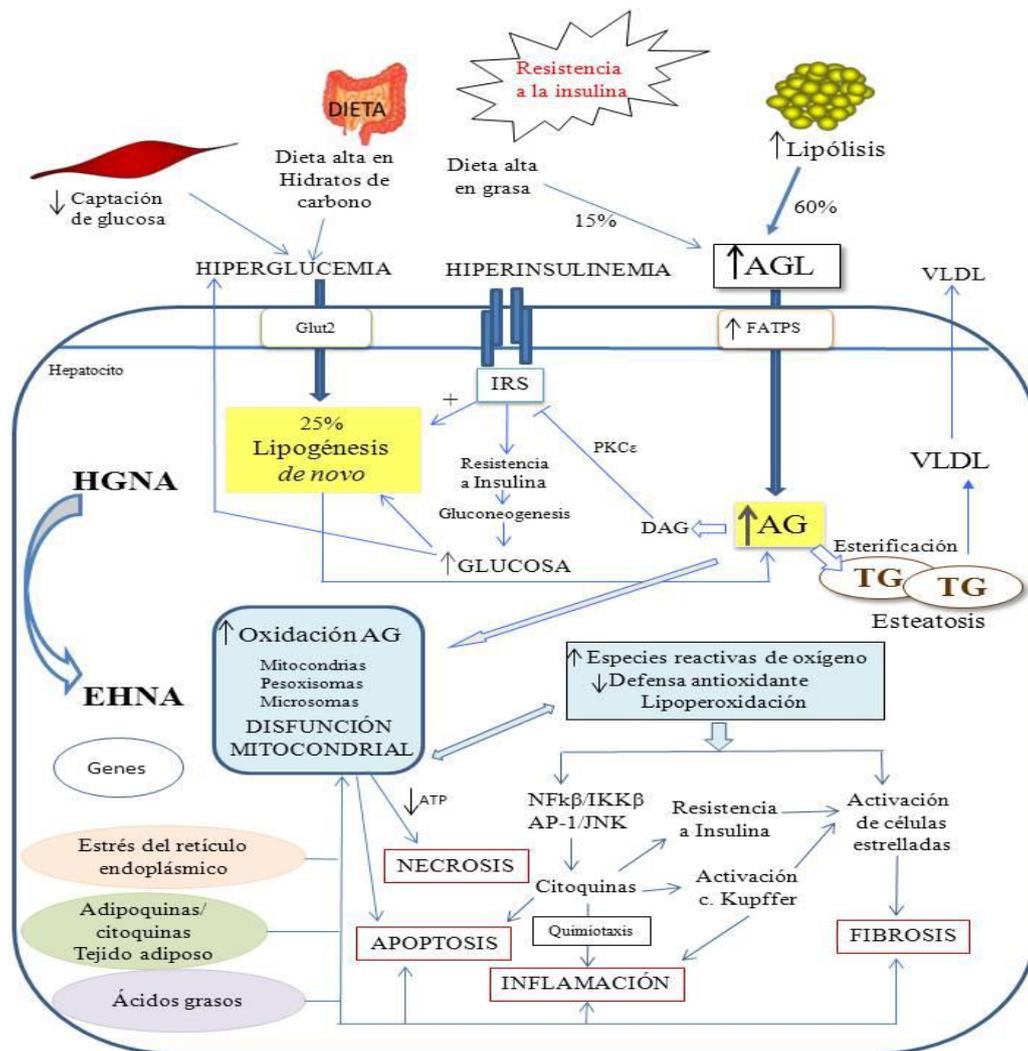


Fig 1. Mecanismos patológicos de la esteatosis hepática no alcohólica (López-Oliva & Muñoz-Martínez, 2014).

Se da, por último, un desequilibrio en la razón adipoquinas/citoquinas que es la encargada de regular la señalización insulínica y la inflamación. Hay una proliferación de citoquinas proinflamatorias y disminuye la concentración de adiponectina, enzima encargada de aumentar la β -oxidación, de regular la sensibilidad a la insulina y de activar el factor PPAR α (hepatocitos sanos), además de reducir la inflamación. Por todo ello, la inducción de adiponectina constituye una alternativa como tratamiento para esta enfermedad (Stojsavljević y col. 2014). También, cuando se produce la esteatosis se da una activación de la PPAR γ , otra posible diana terapéutica (Tailleux y col. 2012). La resistina tiene efectos contrarios a la adiponectina, empeorando el cuadro clínico de la esteatosis y la leptina, sin embargo, reduce la toxicidad lipídica y aumenta la inflamación.

La aparición del estrés oxidativo se da por el acúmulo de ciertas circunstancias: por un lado el aumento en la actividad pro-oxidante, no solo mediada por las mitocondrias si no

también acompañada por los peroxisomas (lipoperoxidación), una disminución en el potencial antioxidante debido al declive en la actividad de los antioxidantes naturales del organismo como son el superóxido dismutasa o catalasa y del sistema redox del glutatión y la activación de las células de Kupffer que aumentan la concentración de ROS. Todo ello produce inflamación hepática, lo que atraerá citoquinas a la zona que provocarán necrosis y apoptosis, ambos mecanismos de muerte celular, y que además, irá acompañada de fibrosis que podrá desembocar con el tiempo en una cirrosis. La apoptosis que se da en este caso está producida por el depósito de lípidos, por lo que será conocida como lipoapoptosis (Cazanave & Gores, 2010).

1.3. TRATAMIENTO DE HGNA Y EHNA

Debido a que los mecanismos moleculares de la patogénesis de EHNA no han sido totalmente definidos, la terapia se dirige directamente al tratamiento de los factores de riesgo y a evitar los tóxicos hepáticos. Por lo tanto, los blancos de la terapia son la RI y el estrés oxidativo. Si bien actualmente se están evaluando varias opciones de tratamiento, la eficacia de la mayoría de los tratamientos es incierta, o sus efectos revierten al interrumpirlos. Las metas del tratamiento para EHNA son reducir las características histológicas y mejorar la RI y los niveles de las enzimas hepáticas. Por ello, son recomendables las modificaciones en el estilo de vida, incluyendo hábitos dietarios y la práctica de ejercicio. En la actualidad, no existe una terapia específica de EHNA que haya mostrado ser universalmente eficaz y los fármacos que muestran algún beneficio presentan muchos efectos adversos. Dada la estrecha relación entre EHNA, obesidad (con los elevados niveles de colesterol) y RI, en la terapia farmacológica se han utilizado agentes sensibilizadores a la insulina (metformina, tiazolidindionas) y antilipémicos (fibratos), además de antioxidantes (vitamina E), inhibidores de TNF α , ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) etc... para combatir la necroinflamación y la fibrosis hepática (Dyson & Day, 2014).

Uno de los principios activos que actualmente se está investigando como opción terapéutica tanto para prevenir como para tratar la enfermedad es el Silicio (Si). El Si tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y se ha demostrado que tiene efecto sobre el tejido conectivo y sistema inmune y es eficaz en el tratamiento de algunas enfermedades como la arteriosclerosis, la hipertensión, la osteoporosis o en procesos neurodegenerativos como el Alzheimer, por lo que podría ser un buen candidato para ser utilizado en el tratamiento de HGNA y su progresión a EHNA.

2. OBJETIVOS

En esta revisión bibliográfica se desarrollan y aplican conocimientos, capacidades y competencias adquiridos en las asignaturas de la titulación de Grado de Farmacia para profundizar en el estudio de los mecanismos patogénicos de HGNA y su progresión hacia EHNA, ambas enfermedades sin tratamiento específico hasta la fecha. Nos centramos en examinar el potencial terapéutico del Silicio sobre la enfermedad del hígado graso. Se hace una revisión sobre las propiedades y el papel de este elemento en la salud humana y su empleo en el tratamiento de otras patologías para, finalmente, definir los mecanismos de acción por los que el Si podría ser una buena alternativa para el tratamiento de la enfermedad del HGNA y su progresión. Para lograr los objetivos, se describirán estudios previos y resultados obtenidos de experiencias “*in vitro*” e “*in vivo*” en el laboratorio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda documental informatizada para la identificación y manejo de fuentes bibliográficas y recursos de información utilizando las bases de datos: Medline, Pubmed y Elsevier o buscadores como Google académico.

La búsqueda de artículos se llevó a cabo mediante el empleo de palabras clave en inglés: "Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)", "Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)", "fatty liver", "insulin resistance" "Silicon". Se incluye la bibliografía empleada que se presenta siguiendo las reglas de Vancouver. Las referencias bibliográficas fueron ordenadas y clasificadas mediante el programa de gestión de citas bibliográficas Ednote para dar formato a las citas y crear listados bibliográficos en Microsoft Office™ Word. Por otra parte, se han estudiados los mecanismos protectores del Si frente a la oxidación inducida por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en cultivos de hepatocitos, que permite reproducir la situación patológica de EHGA, mediante la determinación de la viabilidad celular utilizando la técnica del MTT (Denizot & Lang, 1986).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Silicio (Si) es el segundo elemento mayoritario después del oxígeno y comprende al menos la tercera parte de la corteza terrestre. No se suele encontrar en forma pura como elemento debido a que sus características fisicoquímicas lo hacen reaccionar fácilmente con el O_2 y el H_2O . Estará por tanto, formando óxidos o ácidos (óxido de silicio SiO_2 , ácido ortosilícico monomérico H_4SiO_4) o combinaciones con metales y no-metales, con los cuales puede polimerizarse reduciendo su solubilidad en agua lo que limita su

absorción cuando es ingerido (Figura 2). Por sus distintas formas químicas y su capacidad de reacción presenta numerosas propiedades tanto tóxicas como saludables. En concreto el H_4SiO_4 , soluble en agua y diversas soluciones acuosas, juega un papel crucial en la aportación de Si a las células de los organismos vivos y por lo tanto, representa la principal fuente de silicio para los seres humanos y animales (Raya & Aguirre, 2012). Aunque inicialmente fue visto como un contaminante ambiental, se comprobó que se trataba de un micronutriente esencial, cuyo deficiente aporte en la dieta podía llevar a problemas de crecimiento y desarrollo del cuerpo humano, debido al papel fundamental que ejerce en muchas de las estructuras que lo componen.

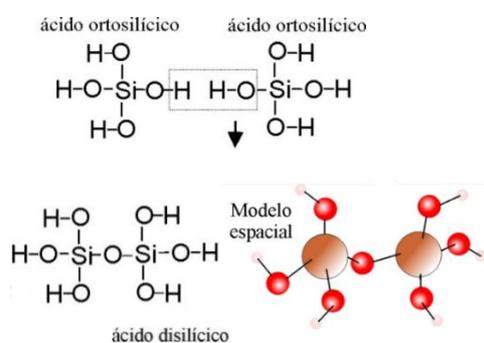


Figura 2. Estructura química del ácido ortosilícico y sus polímeros

4.1. EL SILICIO EN LOS SERES VIVOS

El Si tiene un papel estructural en diatomeas, esponjas y protozoos en forma de ácido silícico (H_4SiO_4). También tiene un papel indiscutible en algunas plantas superiores, ya que forma parte del tejido de sostén y aumenta su resistencia contra enfermedades y parásitos (Raya, JC & Aguirre C, 2012).

En el cuerpo humano, el Si es el tercer elemento traza más abundante. Está presente en el pelo, uñas, epidermis y cutículas. Numerosas fuentes muestran su relación con el tejido conectivo, como su actividad en la mineralización ósea y la síntesis de colágeno y elastina. Así, forma parte estructural en la aorta, tráquea, huesos, tendones, además de la piel, donde forma parte de la matriz extracelular. Asimismo, también se ha comprobado su función en el sistema inmune estimulando la proliferación de linfocitos y regulando la respuesta inflamatoria (Nielsen FH, 2014). Por ello, se está probando la eficacia del efecto inmunomodulador del Si introducido en los seres vivos mediante nanopartículas.

En ayunas los niveles de Si en plasma oscilan entre 10 a 31 $\mu\text{g}/\text{dl}$ y los niveles de excreción urinaria del Si se encuentran por debajo de 14 mg/dL . Concentraciones por debajo de

estas indicarán niveles subóptimos para la vida. Aunque sus concentraciones en sangre y en orina son similares a las de otros elementos como el calcio (Ca) y el zinc (Zn), se distingue del resto en que no se encuentra asociado a proteínas plasmáticas y no ha sido identificado su sitio de unión, favoreciendo su biodisponibilidad. El mantenimiento de estos niveles indica una correcta ingesta de Si que son dependientes del estilo de vida, la edad y el sexo. Con la edad se reduce la capacidad del cuerpo para absorber y utilizar este oligoelemento, al tiempo que aumenta el requerimiento de dosis en ancianos (Bisse y col., 2005). Es especialmente significativo su aporte en mujeres en las etapas de embarazo y menopausia, pues pueden presentar un déficit que debe ser suplementado. En la menopausia, el Si tiene especial importancia debido al gran riesgo de osteoporosis que lleva asociada y frente a la que el Si tiene un efecto protector (Pepa & Brandi, 2016).

Como hemos indicado el Si se absorbe en forma de ácido ortosilícico (H_4SiO_4) que es soluble en agua pero presenta una muy baja biodisponibilidad en el organismo. Aproximadamente sólo un 50% del Si consumido se absorbe en el intestino delgado (Jugdaohsingh y col. 2002). Además, Tartara y col., (2015) demuestran la importancia de las funciones exocrinas y endocrinas del estómago para el mantenimiento de la homeostasis del Si y su biodisponibilidad. Se ha demostrado que en plantas el Si se transporta gracias a proteínas incluidas en la membrana, acuoporinas, que están también presentes en animales, aunque en una menor proporción, lo que sería otra de las razones de su escasa biodisponibilidad. También se han descubierto acuogliceroporinas que son capaces de actuar como transportadores del Si en los humanos, por lo que serán las encargadas de regular su acceso a las distintas partes del organismo e incrementarán la eficacia de sus funciones (Alexandre y col., 2015).

4.2. EFECTO PROTECTOR DEL SILICIO EN DIVERSAS ENFERMEDADES

Debido a la importancia estructural y funcional del Si en el organismo, por lo que modificaciones en los niveles y transporte plasmáticos, o en su biodisponibilidad y su excreción provocan disfunción y patología. Además, el efecto protector se ha evaluado como respuesta al daño oxidativo que se observa en algunas patologías como son el neuroblastoma, la aterosclerosis o la esteatosis que se estudia en esta revisión (Martin, 2013).

Se ha observado que el consumo de un suplemento de Si en la dieta tiene un papel en la mejora de la función del sistema inmune, puesto que regula el ciclo celular de los

linfocitos, aumentando su proliferación así como la síntesis de las inmunoglobulinas y disminuye los procesos inflamatorios gracias a la significativa reducción de las citoquinas inflamatorias (IL6, Cox2)(Se-Yune Kim y col., 2016).

También, el Si disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular, mejorando la arterioesclerosis, la hipertensión arterial y previniendo el envejecimiento vascular (Buffoli, 2013). Está indicado en la prevención de la formación de ateromas debido al efecto protector que ejerce sobre las paredes arteriales, inhibiendo la acumulación de colesterol en ellas, lo que también reducirá, en última instancia, la hipertensión.

Se ha demostrado también su papel en procesos neurodegenerativos como el Alzheimer, ya que el consumo de Si reduce la absorción de aluminio (Al) por el tracto digestivo y facilita su excreción, disminuyendo su biodisponibilidad y evitando que se acumule en el tejido cerebral, lo cual, se encuentra asociado a la enfermedad de Alzheimer, por lo que constituye una terapia no invasiva en estos enfermos. El Si, por tanto, bloquea parcialmente el daño celular derivado del estrés oxidativo, una de las mayores causas de muerte celular en enfermedades neurodegenerativas. Por ello, se ha demostrado que el Si inducirá un aumento clínicamente relevante en el desarrollo cognitivo de aquellos pacientes que padecen Alzheimer. Asimismo, el Si también mejora la memoria y protege frente esclerosis múltiple (Jones y col. 2017). Garcimartín y col., (2014, 2015) demuestran que el Si puede actuar como un agente neuroprotector a bajas dosis, reduciendo la inflamación, disminuyendo la expresión del TNF α y los mecanismos apoptóticos, o como un agente neurotóxico a dosis altas, puesto que puede estimular la vía de las caspasas (apoptosis) y aumentar la muerte celular (necrosis) y la fragmentación del DNA. Es reseñable que se ha encontrado que aunque a dosis tóxicas el Si lleva a cabo su mecanismo reduciendo las ROS, también las genera, en este caso OH $^-$, lo que provoca una peroxidación lipídica. Por lo tanto, la dualidad en los efectos del Si orgánico, tanto beneficiosos como perjudiciales dependerá de la dosis administrada y las concentraciones alcanzadas en el organismo.

Por otra parte, la suplementación con Si en la dieta puede utilizarse para aliviar los problemas osteomusculares tales como artritis, artrosis, discopatía, osteoporosis (característica en mujeres durante la menopausia), fracturas y enfermedades del tejido conjuntivo y piel (Alexandre, 2016). Así, la suplementación con Si reduce el número de células osteoclastos, previniendo la reabsorción y pérdida de hueso, además de estimular

la síntesis de DNA en los osteoblastos, previniendo la pérdida de hueso (Pepa & Brandi, 2016).

Por último, el Si actúa como un ingrediente dietético que mejora el síndrome metabólico y enfermedades asociadas como diabetes, dislipemia y la esteatosis hepática cuyos mecanismos de acción son el objetivo de este Trabajo Fin de Grado. Asimismo, el efecto hipolipidémico del Si esta relacionado con el catabolismo del colesterol y su conversión a ácidos biliares, la inhibición de la síntesis de colesterol y el incremento en el aclaramiento de las concentraciones de colesterol sérico (Santos-Lopez y col., 2016).

4.3. EL SILICIO COMO MICRONUTRIENTE

El consumo del Si se realiza con la ingesta de alimentos como cereales y vegetales que son sus principales fuentes. Esto es debido a que este elemento se encuentra en los suelos, por lo que estará presente en las semillas, que lo emplean como nutriente, y en la planta adulta. Sin embargo, los mayores niveles de este elemento se alcanzan en el agua de consumo, dependiendo su proporción de la procedencia geológica del agua. Se puede adquirir por exposición medioambiental o a través de la dieta, aunque no está clara su función como micronutriente esencial. Pese a que muchos organismos oficiales (RDA) todavía no lo consideran nutriente, se han encontrado beneficios derivados de su presencia en la alimentación sobre todo en sus formas solubles, como el ácido ortosilícico, que se puede encontrar en aguas minerales, con el que se logra una mayor biodisponibilidad. El agua enriquecida en Si constituye, por tanto, un tipo de terapia no invasiva que ofrece protección frente a las enfermedades producidas por daño oxidativo. Pero a su vez, el Si insoluble (coloidal y gel) por su composición en cristales, produce asbestosis lo que aumenta el riesgo de cáncer (Martin, 2014).

Por lo tanto, las fuentes más importantes de Si, provienen del agua y de los alimentos, fundamentalmente de origen vegetal, siendo los cereales (30%), seguidos de los productos derivados de frutas, bebidas y verduras en general las principales fuentes de Si de la dieta. Además, se ha observado su presencia en la cerveza en una cantidad reseñable. Todo ello, en conjunto, proporciona alrededor del 75% del total de Si ingerido por el hombre (Jugdaohsingh y col., 2002, Powell y col., 2005). (Tabla 1).

La elevada ingesta de carne en muchos países desarrollados en detrimento de una mayor proporción de verduras y cereales ha llevado a la aparición de enfermedades como el cáncer de colon o cardiovasculares causadas por el exceso de grasas saturadas y colesterol presentes en la carne de cerdo, o la esteatohepatitis ligada a las carnes rojas. Numerosas investigaciones se han orientado a la obtención de alimentos funcionales de origen animal enriquecidos en Si, de forma que puedan suplir las necesidades de este micronutriente en estas sociedades adaptándose a su dieta (Nielsen, (2014), Garcimartin y col.2017).

Tabla 1: Principales alimentos ricos en Si

- Cebada perlada 40 mg.	- Pan de grano entero...200 gr... 4.50 mg.
- Remolacha 38 mg.	- Agua mineral... 0.5 L...0-40 mg
- Judías verdes 36 mg.	- Arroz integral con cáscara. 100 gr. 2.07 mg.
- Plátano 35 mg.	- Salvado de avena integral 30 mg.
- Guisante 35 mg.	- Pan y pasta. Una media de 30-40 mg.
- Brócoli 36 mg.	- Espinacas 27 mg.
- Salvado de trigo 68 mg.	- Nabo 45 mg.
- Calabacín 47 mg.	- Fresas 45 mg.
- Uvas sultanas 45 mg.	- Salvado de avena integral 30 mg.
- Piña 45 mg.	- Pan y pasta. Una media de 30-40 mg.
- Tahin 45 mg.	- Espinacas 27 mg.
- Alubias 45 mg.	- Cerveza... 333... 8.25 mg.
- Manzana 42 mg.	- Vino tinto... 120 cc... 1.70 mg.
- Garbanzo 40 mg.	- Pasas... 100 gr... 8.25 mg.
- Lentejas 42 mg.	- Judías verdes... 250 gr... 6.10 mg.
- Arroz integral 40 mg.	- Cereal alto en salvado...100... gr.10.17 mg.

Como se ha visto, es necesario un aporte mínimo de Si que, en muchas ocasiones, la ingesta diaria de alimentos puede no llegar a cubrir. Por esa razón se recurre al empleo de suplementos alimenticios como pueden ser el ácido ortosilícico estandarizado, el extracto de Si herbal de *Equisetum arvense* o el Si coloidal. También se ha estudiado el empleo de microalgas (*Spirulina*) enriquecidas en Si como suplemento nutricional que permita la introducción de este elemento en el organismo debido a que la dieta habitual no aporta las cantidades necesarias del mismo (Vidé y col., 2015). Estos organismos contienen elementos nutricionales bioactivos capaces de acumular elementos traza como el Si.

4.4. EL SILICIO EN HGNA Y SU PROGRESIÓN A EHNA

Como hemos indicado, debido a que los mecanismos moleculares de la patogénesis de EHNA no han sido totalmente definidos, la terapia se dirige directamente al tratamiento de los factores de riesgo como son la RI y el estrés oxidativo. Evaluando la eficacia del Si como antioxidante en el tratamiento del HGNA y su progresión a EHNA, se observa que su mecanismo de acción está orientado a evitar el daño producido por el estrés oxidativo e inhibir la apoptosis, normalizando la expresión de citoquinas como TNF α y de enzimas antioxidantes. También se ha demostrado su capacidad de regular los niveles de colesterol e inhibir su acumulación, siendo considerado un agente

hipocolesterolemiante por lo que podría revertir la EHNA a HGNA. A continuación, se describen los estudios que demuestran los mecanismos de acción del Si *in vitro* e *in vivo*.

Estudios “*in vitro*”

Los estudios “*in vitro*” comprenden un conjunto de experimentos que permiten valorar la eficacia del Si sobre la viabilidad celular en la línea celular de hepatocitos HEPG2 que han sido tratados con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como agente oxidante. Este experimento permite comprender los efectos del Si frente a la apoptosis y/o proliferación de las células hepáticas expuestas a condiciones de estrés oxidativo, similares a lo que sucedería “*in vivo*” durante la EHNA. Los estudios “*in vitro*” se han realizado en el laboratorio del Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Facultad de Farmacia de la UCM.

Se utiliza H₂O₂ debido a que es la ROS más estable, lo que permite que el experimento sea reproducible. El H₂O₂ pasa fácilmente a través de las membranas y, por ello, estos radicales son los que provocan enfermedades degenerativas comunes como el Parkinson, Esclerosis múltiple o Alzheimer.

Para el entendimiento de los mecanismos que se describirán es necesario establecer la diferencia entre apoptosis y necrosis, siendo la primera un mecanismo fisiológico de muerte celular programada (vía intrínseca o extrínseca) y la segunda, la muerte de células que han sido dañadas. Es reseñable el hecho de que en el caso de la necrosis, al “explotar” la célula se liberan enzimas de su interior que provocarán que el daño se siga extendiendo a las células vecinas, mientras que en el caso de la apoptosis al estar programada solo se formarán cuerpos apoptóticos. Por ejemplo, el estrés oxidativo producido por H₂O₂ en células de neuroblastoma SH-SY5Y humano induce muerte celular mediante los mecanismos de la apoptosis y la necrosis. La primera se producirá por vía extrínseca, puesto que se une al receptor de muerte celular activando con ello la vía de la caspasa-8 que activará a su vez la caspasa-3, ejecutora final de la apoptosis. No se observa activación de la caspasa-9 por lo que se deduce que no interviene la vía intrínseca. La necrosis es provocada por la liberación de LDH producida por la peroxidación lipídica (Garcimartín y col. 2014, 2015)

Uno de los mecanismos por el que se observa el efecto antiapoptótico del Si es su capacidad de reaccionar con los radicales libres de anión superóxido (O₂⁻) que son responsables de la apoptosis de las membranas de los hepatocitos, reduciendo su

toxicidad. Esto es debido a su estructura química, que le ayudará a establecer enlaces de hidrógeno con los radicales OH^- libres del H_2O_2 , lo que le permitirá secuestrar estos radicales evitando su acumulación en los tejidos y facilitando su expulsión (al igual que hace con el Al y otros metales). Otro de sus mecanismos consiste en la disminución de la apoptosis basal de las células lo que explica los beneficios de su empleo en individuos sanos. Así, el Si disminuye la inflamación y la apoptosis y necrosis, aumentando, por tanto la viabilidad celular, no así la proliferación, mediante la eliminación de las ROS y el estrés oxidativo.

El MTT es una técnica empleada para cuantificar la viabilidad celular, es decir, la capacidad de supervivencia y proliferación de las células. Brevemente, este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La lectura de densidad óptica (DO) se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de coloración producida. El porcentaje de viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$\% \text{ Viabilidad} = \text{DO células tratadas} \times 100 / \text{DO células control}$ (Denizot & Lang, 1986)

Los hepatocitos HEPG2 se siembran en placas de 96 pocillos de forma que cada uno de ellos es tratado con unas concentraciones de tóxico (H_2O_2), protector (Si) o ambos, lo que permite observar las diferencias en su viabilidad según el tratamiento administrado. A estos hepatocitos se les induce apoptosis con la administración de H_2O_2 , que permite recrear las condiciones del estrés oxidativo sufrido en EHNA. La concentración de tóxico empleada en estos ensayos es la misma y lo que varía son las concentraciones de Si orgánico para comprobar la dosis eficaz de este compuesto. Se obtienen los siguientes grupos experimentales: **control**, no llevan tratamiento y son necesarios para interpretar los datos obtenidos, **Si**, tratados con distintas concentraciones de Si orgánico G57 y **tóxico**, tratados con H_2O_2 , y con distintas concentraciones de Si orgánico G57. De esta forma se puede estudiar el efecto del Si en células sanas y en aquellas a las que se les ha inducido estrés oxidativo. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y la Figura 3.

Tabla 2: Efecto del Silicio sobre la viabilidad celular en cultivos celulares de hepatocitos HEPG2 tratados con o sin peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Dosis Si (µg/mL)	% viabilidad
Control	100
Si100	106,315389
Si250	121,7804832
Si500	126,4941982
Si750	135,0998668
Si1000	125,8664638
Si2000	120,953015
Si2500	97,69830702

Dosis Si (µg/mL)	% viabilidad
Tóxico	68,22332129
Si100t	73,79684231
Si500t	72,6079513
Si750t	83,80825566
Si1000t	74,86208864
Si2000t	77,87711623

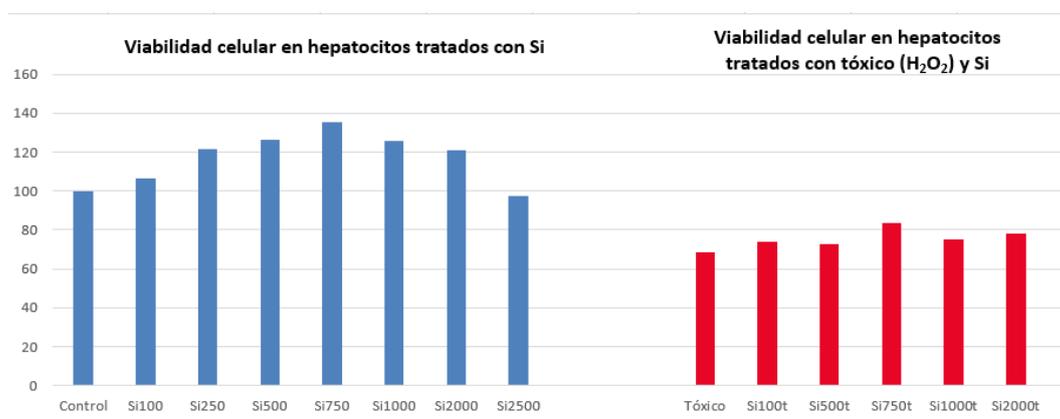


Figura 3: Efecto dosis dependiente del silicio sobre la viabilidad celular en cultivos de células HEPG2.

De estos resultados se deduce lo siguiente:

- 1.- La dosis más efectiva de Si orgánico es de 750µg/mL tanto en hepatocitos sanos como en aquellos a los que se ha inducido estrés oxidativo con la administración de H₂O₂ para recrear las condiciones de EHNA.
- 2.- Se observan mayores tasas de viabilidad en el empleo del Si como prevención debido a su capacidad de reducir la apoptosis basal.
- 3.- Los efectos protectores y, por tanto, positivos del Si son dosis-dependientes.
- 4.- A partir de la dosis de Si 2000µg/mL se observa una toxicidad de este elemento en la disminución de la viabilidad celular.

(Experimento realizado en el Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Biología vegetal, Facultad de Farmacia UCM)

Estudios “*in vivo*”

Hay pocos estudios “*in vivo*” que evidencian el posible efecto beneficioso del Si en la enfermedad del hígado graso. Su eficacia en el tratamiento de la EHNA ha sido evaluado en cuatro trabajos, donde se estudia la intervención nutricional con Si en animales sometidos a dieta alta en grasa y/o colesterol (Garcimartin y col., 2015b, 2017 y Santos-López y col., 2016) o asociado a la ingesta del microalga Spirulina (Vidé y col., 2015). Estos estudios demuestran el carácter hipolipemiante, antioxidante y antiapoptótico que hacen del Si un posible candidato como terapia en la prevención y desarrollo de HGNA y su progresión a EHNA.

1.- Efecto hipolipemiante: Garcimartin y col., (2015) y Santos-López y col., (2016) demuestran que el tratamiento con Si es capaz de reducir los niveles de insulina y glucosa en sangre y también, el peso del animal y del hígado, las transaminasas y los lípidos plasmáticos. La incorporación de Si a la dieta es capaz de reducir la oxidación de las LDL y su receptor en sangre, así como del colesterol total y los TG actuando como un ingrediente hipocolesterolémico e hipolipémico en ratas viejas, lo que permite la disminución del aporte de AGL al hígado y su acúmulo en forma de TG hepáticos y mejorar la HGNA y enfermedades asociadas como son el síndrome metabólico, diabetes y/o dislipemia.

2.- Reversión de EHNA a HGNA: Garcimartin y col, (2017) realizan un análisis histológico de secciones de hígado y demuestran que el Si puede frenar la progresión de HGNA a EHNA. El Si disminuye el grado de esteatosis y de inflamación y revierte la EHNA a una simple estosis como indican la valoración según la puntuación HAI y NAS (Figura4).

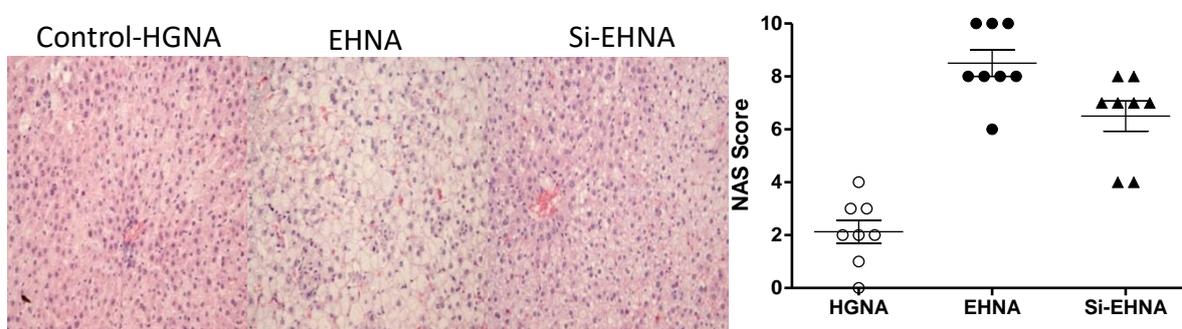


Figura 4: Fotografía de cortes histológicos teñidos con H&E de hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y colesterol con y sin silicio. Representación del grado de esteatosis hepática y esteatohepatitis determinado por el índice NAS (Garcimartin y col. (2017)).

3.- Efecto antiapoptótico: Garcimartin y col. (2017) demuestran el efecto hepatoprotector del Si, disminuyendo la lipoapoptosis y previniendo el desarrollo de la patogénesis de EHNA. El Si presenta un efecto antiapoptótico a través de la inhibición de la vía intrínseca caspasa-dependiente de la apoptosis. Los autores demuestran incrementos en la expresión de las proteínas de la familia Bcl₂, que evitan el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y previenen la liberación de proteínas proapoptóticas como citocromo *c* y AIF, inhibiendo la activación de las caspasas-9 y -3. Además, los autores encuentran una relación directa entre el número de células apoptóticas y el índice NAS (Figura 5).

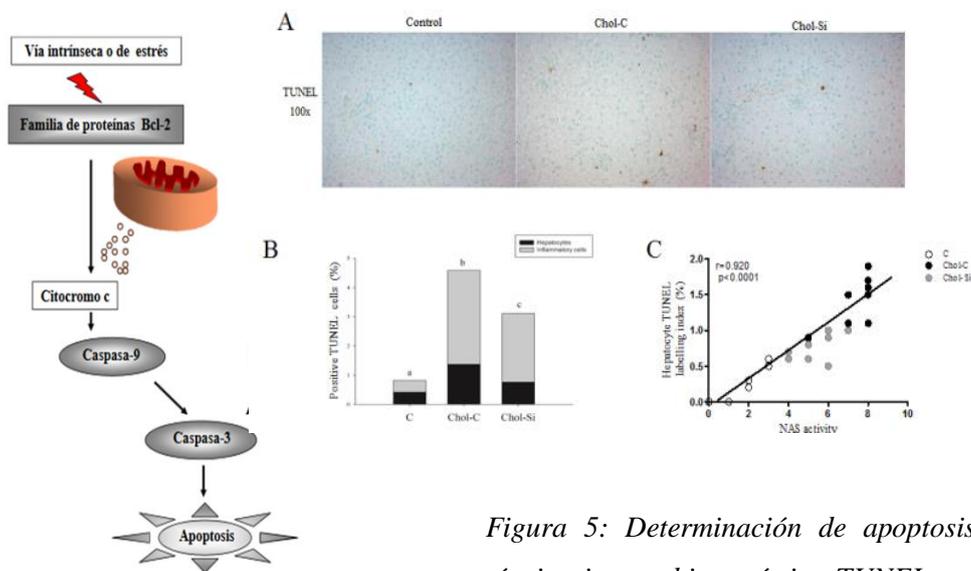


Figura 5: Determinación de apoptosis por la técnica inmunohistoquímica TUNEL en hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y colesterol con y sin Silicio. Se representan el número de hepatocitos y de células inflamatorias que sufren apoptosis. Relación del índice apoptótico con la actividad NAS (Garcimartin y col. (2017)).

4.- Efecto antioxidante: los trabajos de Vidé y col., (2015) en hamsters alimentados con una dieta alta en grasa y suplementados con Si y/o espirulina demuestran que el Si tiene un efecto protector frente al estrés oxidativo aumentando la capacidad antioxidante del enzima superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y disminuyendo los niveles de citoquinas como el TNF α e IL6 y del factor de transcripción NFK β . También, Santos-López y col., (2016) demuestran el efecto antioxidante del Si en ratas viejas alimentadas con una dieta alta en grasa y colesterol suplementada con Si como alimento funcional en una matriz de carne de cerdo. El Si reduce el estrés oxidativo hepático inducido por una dieta alta en grasa disminuyendo la producción de ROS a través de la inducción de la vía Keap1/Nrf2, llevando a la regulación al alza de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, catalasa) y del sistema redox del glutatión (Figura 6). El factor

Nrf2 es regulado al alza por Si, favoreciendo la expresión de las enzimas antioxidantes y manteniendo el estatus redox hepático.

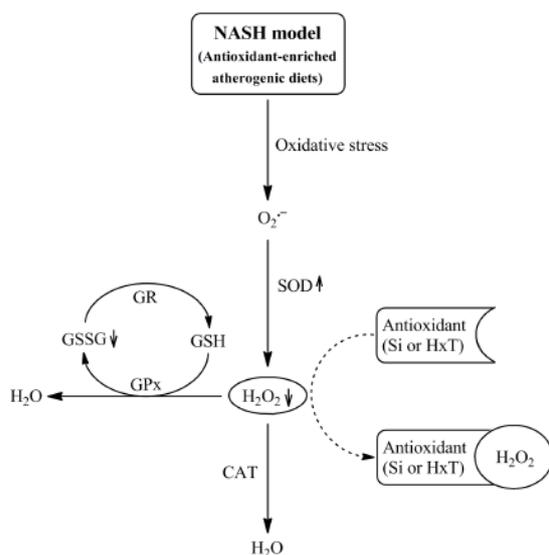


Figura 6: Mecanismo de acción antioxidante del Silicio en comparación con hidroxitirosol en hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y colesterol (Santos-López y col (2016)).

5. CONCLUSIONES

1. La enfermedad del hígado graso no alcohólica (HGNA) es una manifestación hepática del síndrome metabólico, que comprende también la RI y la obesidad, que se caracteriza por una elevada acumulación de lípidos en el hígado.
2. La progresión de HGNA a EHNA cursa con un aumento del estrés oxidativo, por una elevada concentración de ROS, proceso sobre el que actúa el Si, como alternativa terapéutica.
3. El Si presenta propiedades como micronutriente esencial para los seres vivos. En el hombre está presente en el tejido conectivo y el sistema inmune y presenta propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, hipolipemiantes y neuroprotectoras, para todo lo cual serán necesarios unos niveles plasmáticos adecuados, adquiridos mediante el agua de bebida y la ingesta de una dieta rica en cereales y vegetales.
4. Como tratamiento frente a la progresión de la HGNA, el Si actúa secuestrando los ROS y evitando su acumulación en el tejido hepático y su expansión a otros órganos. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado su efecto dislipémico, antioxidante y anti-apoptótico, disminuyendo las manifestaciones de síndrome metabólico como la RI y el estrés oxidativo que acompañan a la EHNA y permitiendo su reversión a HGNA.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre P. Garneau et al., *Acuaporins mediate Silicon transport in humans*, Plos One, 27: 1-15. 2015.
- Alexandre P. *Microelements for bone boost: the last but not the least*. Clin Cases Miner Bone Metab. 13:181-185. 2016.
- Bissé E1, Epting T, Beil A, Lindinger G, Lang H, Wieland H. *Reference values for serum silicon in adults*. Anal Biochem.337:130-5. 2005.
- Buffoli B, Foglio E, Borsani E, Exley C, Rezzani R, Rodella LF. *Silicic acid in drinking water prevents age-related alterations in the endothelium-dependent vascular relaxation modulating eNOS and AQP1 expression in experimental mice: an immunohistochemical study*. Acta Histochem.115:418-24. 2013.
- Cazanave, SC & Gores GJ *Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis* Clinical lipidology, 5: 71–85. 2010.
- Chen G, Ni Y, Nagata N, Xu L, Ota T. *Micronutrient Antioxidants and Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Int J Mol Sci. 17: 1379. 2016.
- Denizot F., Lang R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J. Immunol. Methods 89: 271–277. 1986.
- Donnelly, KL., et al. *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*, 115; 1343–1351.2005.
- Dyson, J. & Day, C. *Treatment of non-alcoholic fatty liver disease*. Digestive diseases 32, 597-604. 2014.
- Garcimartín A, Merino JJ, González MP, Sánchez-Reus MI, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, et al. *Organic silicon protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide effects*. BMC Complem Altern M. 14: 384. 2014.
- Garcimartín A, Merino JJ, Santos-López JA, López-Oliva ME, González MP, Sánchez-Muniz FJ., y col. *Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line*. Chemosphere. 135: 217–224. 2015a
- Garcimartín, A, Santos-López, JA Bastida, S Benedí J y col *Silicon-Enriched Restructured Pork Affects the Lipoprotein Profile, VLDL Oxidation, and LDL Receptor Gene Expression in Aged*. J Nutr. 45: 2039-2045. 2015b.
- Garcimartín A, López-Oliva ME, et col. *Silicon Alleviates Nonalcoholic Steatohepatitis by Reducing Apoptosis in Aged Wistar Rats Fed a High–Saturated Fat, High-Cholesterol Diet*, J Nutr: 147:1104-1112, 2017.
- Gómez-Gallego, Diana Maryory y col. *Immunomodulating effect of nanoparticles used in nanomedicine*. Iatreia 2016, vol.29, n.4, pp.445-457. ISSN 0121-0793

- Jones K, Linhart C, Hawkins C, Exley C. *Urinary Excretion of Aluminium and Silicon in Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. EBioMedicine 26:60-67. 2017.
- Jugdaohsingh R, Anderson SHC, Tucker KL, y col. *Dietary silicon intake and absorption*. American Journal of Clinical Nutrition.75:887–893.2002.
- Koo S. *Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis*. Clinical and molecular hepatology. 19: 210-215. 2013.
- López-Oliva, ME. & Muñoz-Martínez, E. *SREB-1c, ChREBP y LRX: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico*. An. Real Acad. Farm. 80:14 -38.2014.
- Malhi, H., and Kaufman, R.J. *Endoplasmic reticulum stress in liver disease*. Journal of hepatology 54, 795-809. 2011.
- Martin KR. *Silicon: The Health Benefits of a Metalloid*. In *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*, Sigel, A; Sigel, H and Sigel RKO, Eds..Ed Springer, pp 451-469. 2013.
- Nicholas J. Talley, et al, *GI Epidemiology: Non-alcoholic fatty liver disease*, Blackwell Publishing, Alimentary pharmacology and therapeutics, pp. 883-889.2007.
- Nielsen FH. *Update on the possible nutritional importance of silicon*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 28: 379–382. 2014.
- Powell JJ, McNaughton SA, Jugdaohsingh R, et al. *A provisional database for the silicon content of foods in the United Kingdom*. British Journal of Nutrition.94:804–812. 2005.
- Raya, JC & Aguirre C *El papel del Si en los organismos y ecosistemas*, Conciencia Tecnológica 43:42-46. 2012.
- Santos-López, JA, Garcimartín,A et al. *Effects of Silicon vs Hydroxytyrosol-enriched restructured pork on liver oxidation status of aged rats fed high-saturated/high cholesterol diets*. Plos One, 25: 1-16. 2016
- Se-Yune Kim, Sang-Ki Kim, and Mi-Kyeong Choi. *Effect of Silicon Supplementation on Immune Response in Male and Female Mice* The fased jornal 30: 250-258.2016.
- Stojšavljević, S., Gomerčić Palčić, M., et al. *Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. World journal of gastroenterology: WJG 20: 18070-18091. 2014.
- Tailleux, A., Wouters, K., & Staels, B. *Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets*. Biochimica et Biophysica Acta, 1821: 809–18.2012.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology 52: 1836-1846. 2010.
- Vidé J, Virsolvy A, Romain C, Ramos J, Jouy N, Richard S, et al. *Dietary silicon-enriched spirulina improves early atherosclerosis markers in hamsters on a high-fat diet*. Nutrition 31: 1148–54. 2015.