



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Efecto del Consumo de Brotes de Brócoli en Población Obesa

Autor:

María Teresa López Chillón

Directores:

Dra. Dña. Débora Villaño Valencia

Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero

Murcia, Julio de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Efecto del Consumo de Brotes de Brócoli en Población Obesa

Autor:

María Teresa López Chillón

Directores:

Dra. Dña. Débora Villaño Valencia

Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero

Murcia, Julio de 2020



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. Dña. Débora Villaño Valencia y la Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero como Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Efectos del consumo de brotes de brócoli en población obesa” realizada por Dña. Teresa López Chillón en el Grado de Farmacia, **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 20 de Julio de 2020

Fdo. Dra. Pilar Zafrilla Rentero

Fdo. Dra. Débora Villaño Valencia

RESUMEN

Introducción

Actualmente, es bien conocida por parte de la sociedad la relación directa entre los alimentos y la salud. Frutas y hortalizas son los principales componentes de una dieta equilibrada, con implicaciones importantes en la prevención de ciertos tipos de cáncer y enfermedades crónicas.

Los brotes de brócoli representan una opción interesante de alimentos saludables, ya que son ricos en glucosinolatos (GSL) y sus productos de metabolismo, los isotiocianatos, que pueden contrarrestar los efectos negativos de diversas patologías. Entre ellas destacan el sobrepeso y la obesidad, que tienen un componente inflamatorio importante. Existe una alta correlación entre los niveles elevados de marcadores de inflamación (Interleucina-6 (Il-6), proteína C reactiva (PCR) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la alta adiposidad visceral.

Los brotes de brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*), poseen concentraciones muy superiores en fitoquímicos bioactivos como vitaminas, minerales, compuestos polifenólicos y glucosinolatos, respecto al brócoli adulto.

Los efectos beneficiosos del consumo de brócoli se han atribuido a los isotiocianatos. Los brotes de brócoli son ricos en glucorafanina (GRA), glucosinolato precursor del isotiocianato (ITC) sulforafano (SFN), ampliamente estudiado por sus beneficios en la salud, especialmente por sus propiedades anti carcinógenas. Sin embargo, los efectos del brócoli y brotes de brócoli sobre la obesidad y el desequilibrio en el metabolismo lipídico y la inflamación asociados a ésta, han sido poco estudiados.

Objetivo

El objetivo general del presente estudio es la evaluación de la biodisponibilidad y la actividad antiinflamatoria de los compuestos bioactivos

presentes en los brotes de brócoli, en modelos de experimentación *in vitro* hasta la intervención en sujetos adultos (estudio clínico).

Métodos

Se realizó una intervención aleatorizada con 40 sujetos sanos con sobrepeso. Consistió en una fase de tratamiento, en la que consumieron 30 g brotes/día durante 10 semanas, y una fase de seguimiento, sin consumo de brotes de brócoli con una duración de 10 semanas. Se determinaron los parámetros antropométricos, como masa grasa corporal, peso e índice de masa corporal (IMC) y parámetros bioquímicos, como colesterol total, LDL y HDL. El estado de inflamación fue evaluado midiendo los niveles de TNF- α , IL-6, IL-1 β y proteína C reactiva.

Resultados

El proceso de digestión *in vitro* libera compuestos bioactivos de la matriz del brócoli, que han demostrado capacidad para inhibir significativamente los enzimas del metabolismo lipídico (lipasas) y glucídico (glucosidasas). En el estudio clínico, los niveles de IL-6 disminuyeron significativamente (valores medios: 4,76 $\mu\text{g/mL}$ a 2,11 $\mu\text{g/mL}$) durante los 70 días durante el consumo de brotes de brócoli, $q < 0,001$. Durante la fase de control los niveles inflamatorios se mantuvieron bajos (valores de 1,20 $\mu\text{g/mL}$ a 2,66 $\mu\text{g/mL}$, $q < 0,001$). La reducción es mayor cuanto mayor es el estado inflamatorio del individuo. El colesterol total y proteína C reactiva también disminuyeron significativamente. El descenso en los parámetros inflamatorios está relacionado con los niveles de metabolitos derivados de los brotes como el 3,3'-diindolimetano.

Conclusiones

La incorporación en la dieta de raciones de brotes de brócoli de 30 g/día pueden servir como coadyuvantes en el tratamiento del sobrepeso y en la prevención de patologías con un componente inflamatorio asociado, en la población general.

Esta línea de investigación representa un avance en los estudios de intervención ya que los brotes de brócoli fueron incluidos en un patrón dietético diario en cantidades que reflejan un consumo real. Estos prometedores resultados respaldan la evidencia actual sobre las propiedades saludables del género *Brassica*.

Palabras clave

Glucosinolatos, *Brassica oleracea*, sulforafano, IL-6, Inflamación, biodisponibilidad, 3,3'-diindolilmetano.

ABSTRACT

Background

It is currently accepted the direct relationship between foods and health. Fruits and vegetables are the major components in balanced diets, particularly for their implications in the prevention of certain types of cancer and chronic diseases.

Broccoli sprouts represent an interesting choice of healthy food products, as they are rich in glucosinolates and their bioactive metabolites, isothiocyanates able to counteract the negative effects of diverse pathologies. These include overweight and obesity, which have a significant inflammatory component. Human studies have shown that the inflammation markers (interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein CRP) and the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are elevated with high visceral fat.

Broccoli sprouts (*Brassica oleracea var. Italica*) are germinated seeds of only a few days, rich in bioactive phytochemicals as vitamins, minerals, polyphenolic compounds and glucosinolates (GLS), with concentration levels up to 10 times higher than those found in adult broccoli. The beneficial effects of the consumption of broccoli are linked to the isothiocyanates (ITC) formed by the hydrolytic action of the plant myrosinase during mastication process and the glucosidases present in the gastrointestinal tract. Broccoli sprouts are rich in glucoraphanin (GRA), glucosinolate precursor of the isothiocyanate sulforaphane (SFN), widely studied because of its health-promoting characteristics, specially due to its anti-carcinogenic properties. However, the effects of broccoli and broccoli sprouts on obesity and the associated imbalance in lipid metabolism and inflammation have been little studied.

Objective

The general objective of this study is to evaluate the bioavailability and anti-inflammatory activity of bioactive compounds present in broccoli sprouts, in in vitro experimental models up to intervention in adult subjects (clinical study).

Methods

A randomized intervention study was performed with 40 healthy overweight subjects. It consisted of a treatment phase, in which they consumed 30 g sprouts/day during 10 weeks, and a follow-up phase, without consumption of broccoli sprouts with a duration of 10 weeks. Anthropometric parameters as body fat mass, weight and body mass index (BMI) and biochemical parameters as total cholesterol, LDL and HDL were determined. Inflammation status was assessed by measuring levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β and CRP.

Results

The in vitro digestion process releases bioactive compounds from the broccoli matrix, which have demonstrated the ability to significantly inhibit lipid (lipases) and glycemic (glucosidases) metabolism enzymes. In the clinical study, IL-6 levels decreased significantly (mean values: 4.76 μ g/mL to 2.11 μ g/mL) during the 70 days of broccoli sprout consumption, $q < 0.001$. Inflammatory levels remained low during the control phase (values from 1.20 μ g/mL to 2.66 μ g/mL, $q < 0.001$). The reduction is greater the higher the inflammatory state of the individual. Total cholesterol and C-reactive protein also decreased significantly. The decrease in inflammatory parameters is related to the levels of broccoli sprout-derived metabolites such as 3,3'-diindolylmethane.

Conclusions

This study represents an advance in intervention studies as the broccoli sprouts were included in a daily dietary pattern in quantities that reflect a real consumption. Further studies are necessary to elucidate the role of this healthy rich and nutritious food product, but these promising results support the current evidence on the healthy properties of Brassica varieties.

Keywords

Glucosinolates, Brassica oleracea, Sulforaphane, IL-6, Bioavailability, Inflammation, 3,3'-Diindolylmethane

FINANCIACIÓN

Este estudio se llevó a cabo en el marco de colaboración del Convenio entre UCAM y CEBAS-CSIC para la investigación científica y el desarrollo tecnológico de "Alimentos para la Salud" (20140388 - CSIC #127263).

Además, queremos agradecer que parte de los experimentos (o estudios) realizados en esta Tesis Doctoral han recibido financiación de un Proyecto Competitivo financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) y el Fondo Social Europeo (FEDER) a través del Proyecto Ref. AGL2013-46247-P.

CONTRIBUCIONES DERIVADAS DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA DESARROLLADA EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Publicaciones Científicas

López-Chillón MT; Carazo-Diaz C; Prieto-Merino D; Zafrilla P; Moreno DA; Villaño D. Effects of long-term consumption of broccoli sprouts on inflammatory markers in overweight subjects. *Clinical Nutrition*. 38, pp. 745 -752. 2019.

Villaño D; López-Chillón MT; Zafrilla P; Moreno DA. Bioavailability of broccoli sprouts in different human overweight populations. *Journal of Functional Foods*. 59, pp. 337 - 344. 2019.

Presentación a Congresos

López-Chillón MT; Marhuenda J; Baenas N; Moreno D; Zafrilla P; Villaño D. Póster: Effects of in vitro bioavailability on Lipase and Alpha-glucosidase inhibitory effect of broccoli sprouts. IPAP18: Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives. 1st Global Congress of Pharmacy Faculties. Salamanca, España. 24-28 Septiembre 2018. Entidad organizadora: Universidad de Salamanca.

López-Chillón MT; Moreno DA; García-Viguera C; Zafrilla P; Villaño D. Póster: Health-promoting activity in energy metabolism and inflammation status of broccoli sprouts in overweight subjects. 4th International Glucosinolate Conference. Berlin, Alemania. 17-20 Septiembre 2017. Entidad organizadora: IGZ Großbeeren.

López-Chillón MT; Baenas N; Villaño D; Zafrilla P; García-Viguera C; Moreno DA. Comunicación oral: Broccoli for food and health - research and challenges. Brassica 2017. Pontevedra, España. 22-25 Mayo 2017. En: Proceedings of the VII International Symposia of Brassicas. Publicado en *Acta Horticulturae*. 2018. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1202.18. Entidad organizadora: Misión

Biológica de Galicia (MBG-CSIC) e International Society of Horticultural Science (ISHS).

Moreno DA, Baenas N, Villaño D, López-Chillón MT, Zafrilla P, García-Viguera C. Comunicación oral: Broccoli from farm to health – research and challenges. III International Congress “Food Technology, Quality and Safety”. FoodTech 2016. Novi Sad, Serbia. 25-27 Octubre 2016 Entidad organizadora: Institute of Food Technology, University of Novi Sad, Serbia

AGRADECIMIENTOS

Durante todos estos años, he pensado mucho que llegado el momento de escribir mis agradecimientos me resultaría fácil expresar con palabras todas las emociones de este viaje, pero no es así, día a día intentas hacer un diario mental y decir: “¡esto no puede faltar!” pero es imposible en tan poquito espacio.

Dicho esto, me gustaría dar las gracias a la Dra. Juana Mulero por brindarme la oportunidad de presentarme este proyecto y formar parte de él; por presentarme a las que han terminado siendo mis directoras: Dra. Pilar Zafrilla y Dra. Débora Villaño. Ellas no han sido sólo directoras, me han ayudado en los momentos difíciles, cuando no era capaz de ver la salida, afrontando la enfermedad y el despido laboral. Permitirme que hable de vosotras en conjunto porque considero que formáis un gran equipo. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí en estos cuatro años, por todos vuestros consejos, por lo que he aprendido a vuestro lado, a luchar con trabajo y esfuerzo y demostrarme que nada es imposible. Y a ti Débora, mi compañera de viaje, mi amiga, siempre a mi lado, aquellas horas muertas entregando brotes, esas mañanas de extracciones y recogidas de orina, las horas de laboratorio y las salidas de a las diez de la noche, etc... ¡¡gracias por estar ahí!!

Gracias al Departamento de Farmacia y al Departamento de Nutrición de la Ucam.

Gracias al CEBAS por toda vuestra aportación en esta tesis, formáis un gran equipo. A ti Diego Moreno, por toda la ayuda y facilidades que me has ofrecido. Gracias Nieves Baenas, por contar conmigo para ir con una botellita al trabajo durante unos cuantos días y resolverme dudas cuando he estado perdida. Gracias Javier Marhuenda por toda tu ayuda en el laboratorio y por donde te haya asaltado para que me resolvieras alguna duda. Y a ti Gabi, gracias por saberlo todo.

Esta tesis no hubiese visto nunca la luz, sin familia. Gracias a ellos, hoy, soy lo que soy.

A mis padres, por educarme de esta manera y enseñarme cada día a ser mejor persona. Mamá, gracias por estar siempre disponible, por darte igual la hora y el día para quedarte con la peque y hacer todo lo posible por ayudarme, siempre a tener tiempo. Gracias por ser como eres.

A mis hermanos, dos personas muy importantes en vida; a ti Juan, un GLADIADOR del siglo XXI, dejándote la piel por los tuyos, siempre luchando, haciéndonos la vida más fácil, resolviendo cualquier problema, e intentando siempre hacernos felices. Eres mi Ángel de la Guarda, y lo sabes. Y a ti Verónica, mi otro "yo", gracias por ser tan realista y ponerme los pies en la tierra, por tu confianza, por creer en mí y creerme capaz de todo, gracias por tus consejos y por quererme así.

A mis cuñados, María, gracias por estar ahí siempre, por ser una gran persona, por todo tu cariño, por ayudarnos siempre en todo. Te queremos. Y a ti Pedro, tantos años juntos, tantas vivencias, gracias por saber sacar siempre una sonrisa cuando se necesita, gracias por formar parte de nuestras vidas. Siempre te he querido.

Gracias Aaroncito por ser la alegría de mis mañanas y mis tardes, gracias por luchar por mí cuando ha hecho falta, a conseguir mis objetivos, gracias por enseñarme a tener más confianza en mí misma. ¡¡ Qué afortunada soy yo por tener tu amistad!!

A ti Dui, ¡¡qué te voy a decir que no tú no sepas!! Ni cincuenta mil kilómetros de distancia pueden distanciarnos. Siempre has sido un apoyo incondicional para mí. Por todo lo que hemos vivido y lo que nos queda. ¡¡Gracias!!!

Y por ser los últimos no sois menos importantes. Gracias mi vida, mi amor, lo eres todo para mí, este barco no hubiese llegado al puerto sin ti. Siempre luchando por mis sueños, un apoyo incondicional en mi vida, respetando todas mis decisiones sin saber cómo saldríamos de ellas, pero metiéndonos de cabeza, primero Máster, luego Nutrición y después Tesis. Nunca has dudado de mí, para ti lo primero siempre soy yo... así que para agradecer esto no hay palabras,

simplemente ¡¡¡"amor"!!! En estos cuatro años hemos vivido de todo, cosas buenas y cosas malas, pero me quedo con lo bueno, así que solo puedo decir que esta tesis vino al mundo con una boda, con Triana y ahora con Teresa debajo del brazo. Triana, tú eres nuestro otro amor, la alegría de nuestras vidas, gracias por hacernos cada día especial, y ya entenderás por qué mamá trabajaba tanto en el ordenador. Teresa, tú has vivido la recta final desde dentro, el último empujón y el último esfuerzo, momentos también de mucho estrés, vas a ser una gran luchadora, sin verte ya te quiero.

Gracias a todas las personas que me dejó por el camino y que de alguna manera u otra me han ayudado a construir algo tan bonito.

I'm not telling
You it is goig to
be easy, I'm telling you It's
go to be worth it

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	37
1.1 GÉNERO BRASSICA	37
1.1.1 Origen y Distribución	37
1.1.2 Morfología y Cultivo	39
1.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL BRÓCOLI	42
1.2.1 Glucosinolatos	42
1.2.1.1 Biodisponibilidad de los glucosinolatos	46
1.2.1.2 Efectos biológicos de los glucosinolatos	47
1.2.1.3 Inducción de las reacciones de fase II de detoxificación.....	48
1.2.1.4 Acción antioxidante	49
1.2.1.5 Acción antiinflamatoria y modulación inmunológica	49
1.2.1.6 Acción sobre el metabolismo lipídico y glucídico	50
1.2.1.7 Acción antibacteriana y antifúngica	51
1.2.1.8 Influencia en el metabolismo de los estrógenos.....	51
1.2.1.9 Efectos en patologías neurodegenerativas.....	52
1.2.2 Vitamina C.....	53
1.2.3 Carotenoides	54
1.2.4 Compuestos Fenólicos	57
1.3 OBESIDAD Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	59
1.3.1 Situación actual.....	59
1.3.2 Síndrome Metabólico	60
1.3.3 Relación entre Obesidad e Inflamación.....	62

2. JUSTIFICACIÓN	67
3. OBJETIVOS	71
1.4 HIPÓTESIS.....	71
1.5 OBJETIVOS.....	71
4. MATERIAL Y MÉTODOS	75
4.1 BROTOS DE BRÓCOLI.....	75
4.1.1 Germinación y Desarrollo de los brotes de Brócoli: Uso de Elicitadores.....	75
4.1.2 Análisis microbiológico de los brotes de brócoli.....	77
4.2 EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL BRÓCOLI.....	77
4.2.1 Extracción y determinación de los glucosinolatos en los brotes de brócoli.....	77
4.2.2 Extracción y determinación de los isotiocianatos en los brotes de brócoli.....	78
4.2.3 Extracción y determinación de la vitamina C en los brotes de brócoli.....	78
4.3 DIGESTIÓN IN VITRO DE LOS BROTOS DE BRÓCOLI.....	79
4.3.1 Procedimiento.....	79
4.4 EVALUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS BROTOS DE BRÓCOLI.....	81
4.4.1 Método DPPH.....	82
4.4.2 Ensayo ORAC.....	83
4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA ENZIMÁTICA IN VITRO DE LOS BROTOS DE BRÓCOLI.....	86

4.5.1	Inhibición de la actividad lipasa enzimática	86
4.5.2	Inhibición de la actividad α -glucosidasa enzimática	86
4.6	ESTUDIO CLÍNICO SOBRE POBLACIÓN CON SOBREPESO.....	87
4.6.1	Reclutamiento y selección de voluntarios	87
4.6.2	Diseño del Estudio de intervención.....	89
4.6.3	Tamaño muestral.....	91
4.6.4	Perfil antropométrico.....	92
4.6.5	Parámetros bioquímicos.....	92
4.6.5.1	Colesterol total.....	92
4.6.5.2	Colesterol de lipoproteína de alta densidad (c-HDL).....	92
4.6.5.3	Colesterol de lipoproteína de baja densidad (c-LDL).....	93
4.6.5.4	Triglicéridos	93
4.6.6	Marcadores de inflamación.....	94
4.6.6.1	Proteína C Reactiva (CRP)	94
4.6.6.2	Citoquinas proinflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), IL-1 β e Interleuquina 6 (IL-6).....	94
4.6.7	Biodisponibilidad de los glucosinolatos y sus metabolitos.....	96
4.6.7.1	Determinación de glucosinolatos y sus metabolitos en orina.....	96
4.6.7.2	Determinación de Creatinina en orina	98
4.6.8	Valoración del seguimiento de la dieta mediterránea	99
4.6.9	Análisis Estadístico	100
4.6.9.1	Análisis descriptivo.....	101
4.6.9.2	Análisis inferencial.....	101
5.	RESULTADOS	105
5.1	COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LOS BROTES DE BRÓCOLI.....	105
5.2	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO Y CONTENIDO DE VITAMINA C DE LOS BROTES DE BRÓCOLI	107

5.3	INHIBICIÓN ENZIMÁTICA IN VITRO DE LOS BROTES DE BRÓCOLI.....	108
5.3.1	Efecto inhibidor sobre la α -glucosidasa	108
5.3.2	Efecto inhibidor sobre la lipasa	109
5.4	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA POBLACIONAL DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN A LARGO PLAZO.....	111
5.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS HÁBITOS DIETÉTICOS Y DE ESTILO DE VIDA.....	112
5.6	EFFECTOS DE LOS BROTES DE BRÓCOLI EN EL PERFIL ANTROPOMÉTRICO.....	115
5.7	EFFECTOS DE LOS BROTES DE BRÓCOLI EN EL PERFIL INFLAMATORIO Y LIPÍDICO	117
5.8	BIODISPONIBILIDAD DE LOS GLUCOSINOLATOS EN LOS BROTES DE BRÓCOLI.....	120
6.	DISCUSIÓN	129
6.1	EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS BROTES DE BRÓCOLI	129
6.2	INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LOS BROTES DE BRÓCOLI ...	132
6.3	EFFECTO IN VIVO DE LOS BROTES DE BRÓCOLI Y BIODISPONIBILIDAD	133
7.	CONCLUSIONES.....	143
8.	LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	147
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
	CAPÍTULO X: ANEXOS.....	173

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

·OH	Radical hidroxilo
3T3-L1	Fibroblasto del ratón
AA	Ácido araquidónico
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ATP III	National Cholesterol Educ. Program Adult Treatment III
c-HDL	Colesterol de lipoproteína de alta densidad
c-LDL	Colesterol de lipoproteína de baja densidad
CEBAS	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Sureste
CFU	Células formadoras de colonias
CYS	Cisteína
DFQ	3,4-b-quinoxadina-1-ona
DHAA	Ácido dehidroascórbico
DIM	Diindolimetano
DPPH	2,2-difenil-1-pirilhidracil
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ECV	Enfermedad Cardiovascular
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU
F. W.	Peso fresco (Fresh weight)
GBS	Glucobrassicina
GER	Glucoerucina
GIB	Glucoiberina
GLS	Glucosinolato/s
GM-CSF	Citocina proinflamatoria formadora de macrófagos
GRA	Glucorafanina
GSH	Glutation
GST	Glutation-S-transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTA	Hipertensión arterial
I3C	Indol-3-carbinol
IB	Iberina
IDF	International Diabetes Federation
Ig G	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal

IR	Resistencia a la insulina
ITC	Isotiocianato/s
JA	Jasmónico
Kg	Kilogramos
LPL	Lipoproteín lipasa
MeJA	Metiljasmonato
MS	Espectrometría de masas
NAC	N-acetil-cisteína
NAD	Nicotinamina adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido reducido
NADHP	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NeoGBS	Neoglucobrassicina
NF-KB	Factor Nuclear kappa B
NQO1	Qinona-oxidoreductasa1
Nrf2	Factor Nuclear eritroide 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Método de Absorbancia de radicales libres de oxígeno
PCR	Proteína C reactiva
R	Radical
SFN	Sulforafano
SM	Síndrome Metabólico
TCA	Ácido Tricarboxílico
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UE	Unión Europea
UGT	Uridinadifosfato-glicosil-transferasa
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta eficacia
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de mayor densidad del cultivo del brócoli en la Región de Murcia ⁵	39
Figura 2. Brócoli adulto ⁷	40
Figura 3. Brotes de brócoli ⁷	41
Figura 4. Estructura molecular de los glucosinatos ⁷	43
Figura 5. Degradación de glucosinatos mediante la enzima mirosinasa que cataliza la formación de aglicona ²⁸	45
Figura 6. Estructura química del ácido L-ascórbico, forma reducida de la vitamina C; y del ácido dehidroascórbico, forma oxidada de la vitamina C ⁸⁷	53
Figura 7. Esquema general de la ruta biosintética de carotenoides ⁹⁶	55
Figura 8. Nutrientes y fitoquímicos en crucíferas (brócoli) asociados a beneficios para la salud ¹⁰²	58
Figura 9. Factores asociados al desarrollo del síndrome metabólico ¹¹⁴	60
Figura 10. Fases de la digestión in vitro de los brotes de brócoli.....	81
Figura 11. Curva de caída de FL inducida por APPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox.....	85
Figura 12. Fases del estudio.....	89
Figura 13. Esquema simplificado del principio del test ELISA alta sensibilidad utilizado (basado en los protocolos de IBL International).....	96
Figura 14. Equipo empleado. UHPLC-1290 Agilent Technologies Series acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 6460 QqQ-MS/MS. (CEBAS-CSIC)	98

Figura 15. Fases del proceso de digestión: a) Brotes sin digerir; b) fase gástrica; c) Inicio de la fase intestinal; d) Final de la fase intestinal.....	111
Figura 16. Cambios de IL-6 durante la fase de intervención en función de los valores iniciales de IL-6 (variable log-transformada)	119
Figura 17. Proporción de individuos e IC 95% en los que se detecta los metabolitos en las distintas fases.....	124
Figura 18. Evolución de los parámetros de inflamación y del metabolito 3,3'-DIM en los distintos días del estudio	126
Figura 19. Ejemplo de acción antioxidante: acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres.....	130
Figura 20. Estructuras químicas de los glucosinolatos, isotiocianatos y metabolitos de los brotes de brócoli en humanos (Villaño et al., 2019). a) alifáticos, b) indólicos, * interconversión.....	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica ³	38
Tabla 2. Fases del cultivo del brócoli ⁸	41
Tabla 3. Glucosinolatos presentes en el brócoli (<i>Brassica olearacea var. italica</i>). Reproducida de Latté y col. (2011) ¹⁹	44
Tabla 4. Actividades biológicas de los carotenoides en el hombre ⁹⁷	56
Tabla 5. Componentes del síndrome metabólico según diversas asociaciones ¹¹⁴ ..	61
Tabla 6. Distribución de las muestras tomadas en los distintos tiempos.....	91
Tabla 7. Puntuación según la adherencia a la Dieta Mediterránea	100
Tabla 8. Contenido de glucosinolatos y composición nutricional en porciones diarias (en 30 g peso fresco).....	106
Tabla 9. Actividad antioxidante por el método ORAC y DPPH y concentración de ácido ascórbico en las distintas fases de la digestión in vitro y en los brotes sin digerir.....	108
Tabla 10. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática glucosidasa y lipasa en las diferentes fases de la digestión in vitro y en los brotes sin digerir	109
Tabla 11. Composición fenólica (clasificada por familias) en las diferentes fases de la digestión in vitro y en los brotes sin digerir.....	110
Tabla 12. Características basales de los voluntarios al inicio del estudio	111
Tabla 13. Marcadores de riesgo cardiovascular y de estilo de vida.....	112
Tabla 14. Consumo de los alimentos que se incluyen en la dieta mediterránea en raciones /día y raciones/semana.....	114

Tabla 15. Seguimiento de la dieta mediterránea de la muestra poblacional	115
Tabla 16. Perfil antropométrico de los voluntarios en los distintos tiempos.....	115
Tabla 17. Evolución de los valores medios (ratio) de las variables continuas antropométricas en los distintos periodos del estudio	116
Tabla 18. Perfil inflamatorio y lipídico en las diferentes fases del estudio	117
Tabla 19. Evolución de los valores medio (ratios) de la variable continua IL-6 en los distintos periodos del estudio	118
Tabla 20. Evolución de los valores medio (ratios) de la variable continua CRP en los distintos periodos del estudio	120
Tabla 21. Evolución de los valores medios de los metabolitos en orina de 24 h..	121
Tabla 22. Evolución de los valores medio (ratios) de la variable continua 3,3'-DIM en los distintos periodos del estudio	121
Tabla 23. Evolución del porcentaje de individuos en los cuales se detectó Sulforafano-N-acetilcisteína (SFN-NAC), Sulforafano-cisteína (SFN-CYS) y Sulforafano (SFN).....	123
Tabla 24. Asociación entre los cambios en los metabolitos con los cambios observados en IL-6 y proteína C-reactiva tras 70 días de consumo de broccoli...	125

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado	175
Anexo 2. Encuestas hábitos dietéticos y estilo de vida.....	176
Anexo 3. Comité de Ética CSIC, UCAM.....	183
Anexo 4. Composición nutricional y análisis de seguridad alimentaria ...	185

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GÉNERO BRASSICA

1.1.1 Origen y Distribución

Los antecedentes más antiguos relacionados con las variedades de Brócoli fueron encontrados en la época Romana, esta es la razón por la que se le reconoce como *Brassica Italica* (*Brassica oleracea Italica*). Se trata de una hortaliza muy sabrosa que está causando una revolución a nivel científico gracias a su elevada concentración en sustancias nitrógeno-azufradas y al potente poder terapéutico que ejercen sus principales principios activos, los glucosinolatos y sus derivados isotiocianatos, entre otros ¹.

El brócoli (*Brassica oleracea Italica*) pertenece a la familia de las crucíferas (El brócoli (*Brassica oleracea Italica*) pertenece a la familia de las crucíferas (*Brassica oleracea*) (Tabla 1). Se sabe que ya era cultivado hace unos 6000 años, por lo que se le considera la hortaliza cultivada más antigua. El brócoli tal y como lo conocemos actualmente ha sido distribuido durante el siglo XIX y XX desde Italia al resto del Mundo.

Su nombre procede de la palabra italiana “brocco”, que significa “brote” (del latín “brachium”, “rama”) en referencia a la forma que tienen las flores que están unidas, por pequeñas ramas, al tronco compacto.

Las investigaciones epidemiológicas confirman, cada vez más, el elevado consumo de esta variedad de crucíferas y su asociación con la disminución del riesgo de varios tipos de cáncer, en comparación con el consumo de otras verduras y frutas². A esta familia, además de pertenecer todas las variedades de col, también pertenecen la mostaza, la colza y el nabo. De todo el grupo es el brócoli el que más ha captado el interés de los científicos: las investigaciones no

sólo están enfocadas al cáncer, sino también a la influencia que ejerce en distintas afecciones.

Tabla 1. Clasificación taxonómica³

Reino	Plantae
División	Fanerógama Magnoliophyta
Clase	Dicotiledónea Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	<i>Brassicaceae (Cruciferae)</i>
Género	<i>Brassica</i> L. 1753
Especie	<i>Brassica oleracea</i>
Subespecie	<i>B. oleracea var. Italica</i>

Según los datos publicados por la consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente (2015), la Región de Murcia es una de las principales zonas productoras de brócoli, con un impacto importante en la exportación nacional a Europa, especialmente en el Valle del Guadalentín. La exportación nacional de brócoli aumentó un 20% en 2014 y la Región de Murcia se mantiene como “principal provincia española exportadora de coles”.

Tanto en peso como en valor, Reino Unido es el principal destino de estas hortalizas de tipo col (brócoli, coliflor, repollo, picuda, saboya o col y rábano, entre otros) exportadas desde España. El segundo destino es Alemania, que absorbe el 18%, seguida por Países Bajos y Francia, con el 12% y el 13%, respectivamente⁴.

Según datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente durante el año 2014 en España se destinó una superficie de tierra de 26.612h al cultivo de brócoli, con una producción de 445.884 T. La Región de

Murcia fue la primera Comunidad Autónoma del Estado tanto en superficie destinada a su cultivo (12.001 h) como en producción (213.366 T), lo que supuso el 45% de la superficie total estatal de tierras destinadas a su cultivo y un 48% de la producción total estatal⁴ (Figura 1).



Figura 1. Áreas de mayor densidad del cultivo del brócoli en la Región de Murcia⁵

1.1.2 Morfología y Cultivo

El brócoli posee una raíz gruesa, fusiforme y crece verticalmente, es pivotante con raíces secundarias y superficiales. Es una planta herbácea, con un tronco grande y grueso. Sobre dicho tronco nacen de las axilas las pequeñas hojas, en inflorescencias de pequeño tamaño y forma redondeada denominadas floretes (Figura 2). Dependiendo de la variedad de brócoli sus hojas poseen un verde más

o menos oscuro⁶. Por otro lado, se consume la inflorescencia inmadura (brotes), tanto los floretes como parte de los tallos asociados a ellos (Figura 3). Poseen una nervadura fuerte y un peciolo largo. Las flores forman inflorescencias de color verde o morado que se encuentran intercaladas entre hojas sin formar una única pella, a diferencia de la coliflor, aunque la pella que se forma es más pequeña. La pella de brócoli puede llegar a medir 20 cm de diámetro y alcanzar los 2 kg de peso.



Figura 2. Brócoli adulto⁷

Los brotes de brócoli son germinados de pocos días de edad, con niveles de concentración de fitoactivos hasta 10 veces superiores a los del brócoli adulto (Figura 3). Estos compuestos parecen tener funciones de defensa frente al estrés biótico, por ello en la planta joven inmadura se encuentran en mayor cantidad, ya que en esta etapa de crecimiento es más frágil y vulnerable al ataque de hongos, virus y bacterias.



Figura 3. Brotes de brócoli⁷

En el desarrollo del brócoli podemos considerar las diferentes fases que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fases del cultivo del brócoli⁸

FASES	DESARROLLO
De crecimiento	Desarrollo principalmente de las hojas
De inducción floral	Después de unos días a baja T ^a se inicia el desarrollo de la flor, a la vez que siguen brotando las hojas en la fase de crecimiento
De formación de pellas	En la yema terminal se desarrolla la pella, al mismo tiempo que las yemas axilares de las hojas está ocurriendo la fase de inducción floral, de tamaño más pequeño
De floración	Se sustenta la pella a los tallos y se inicia el crecimiento en longitud, con apertura de las flores
De fructificación	Se forman los frutos (silicuas) y semillas

1.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL BRÓCOLI

Los compuestos bioactivos del brócoli poseen una función potencialmente protectora en la planta. Destacan los compuestos fenólicos (glucósidos, flavonoides y ácidos β -hidroxicinámico); carotenoides, Se, compuestos nitrógeno azufrados como los glucosinolatos (GSLs) o vitaminas^{9,10}, (A, C, E, K) y minerales^{11,12}.

1.2.1 Glucosinolatos

Los glucosinolatos (GSLs) son componentes químicos particularmente abundantes en el género *Brassica*, y se ha demostrado que son los responsables en gran parte de los efectos biológicos atribuidos a estas verduras.

El término de glucosinolatos fue acuñado por primera vez por Ettlinger y Kjaer (1968)¹³, interpretándose como: la fracción de glucosilo (“gluco”), la presencia de un grupo sulfato (ate), y la propiedad de ser un precursor de un aceite de mostaza (sinol)¹⁴ (Figura 4). Son N-hidroxisulfatos y la mayoría de ellos tienen asociados azúcares, unidos directamente al azufre (tio-glucósidos). Estos compuestos son bien conocidos por sus metabolitos, que han mostrado poseer bioactividad, incluyendo la defensa de las plantas frente a patógenos e insectos, así como las propiedades anti-carcinógenas en mamíferos¹⁵.

Tienen una estructura común que contiene residuos β -D-glucopiranososa unidos mediante átomos de azufre (S) a un éster de sulfato de N-hidroxiiimino y podemos diferenciarlos entre sí mediante los grupos R del éster, que derivan de distintos aminoácidos.

La porción no azúcar que se obtiene por hidrólisis de los glucósidos se denomina aglicona y se enlaza a través de un azufre a un azúcar reductor. El

azúcar le proporciona solubilidad en agua, ya que la molécula de glucosa posee características hidrofílicas; estos compuestos no son volátiles.

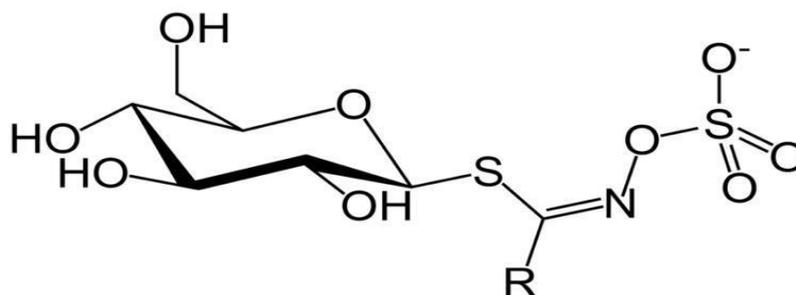


Figura 4. Estructura molecular de los glucosinolatos⁷

Según el agrupamiento no glucídico de los heterósidos, han sido identificados alrededor de 120 tipos de aglicona que se pueden agrupar en 10 familias estructurales en función del sustituyente presente en la cadena lateral¹⁶. En la siguiente tabla (Tabla 3) se observan los glucosinolatos presentes en el brócoli (*Brassica Oleracea var. Italica*).

Sobre la base de sus aminoácidos precursores, los glucosinolatos se dividen en tres categorías principales: glucosinolatos alifáticos derivados de metionina (aquí se incluyen los alquilsulfinilo, los alquiltio y los alquenilo), glucosinolatos indólicos procedentes del triptófano, y glucosinolatos aromáticos formados a partir de fenilalanina^{17,18} (Tabla 3).

**Tabla 3. Glucosinolatos presentes en el brócoli (*Brassica olearacea var. italica*).
Reproducida de Latté y col. (2011)¹⁹**

Compuesto	Clasificación estructural	Cantidades presentes ($\mu\text{mol/g}$ peso seco)
Glucoiberina	GLS alquilsulfinilo	0-7,8
Glucorafanina	GLS alquilsulfinilo	0,3-38,4
Glucoalisina	GLS alquilsulfinilo	0-5,9
Glucoerucina	GLS alquiltio	Trazas
Gluconapina	GLS alquenilo	0-1,0
Progoitrina	GLS alquenilo	0,1-16,1
Sinigrina	GLS alquenilo	0-0,1
Napoleiferina	GLS alquenilo	0,3-0,7
Glucobrassicinapina	GLS alquenilo	0-0,6
Epiprogoitrina	GLS alquenilo	0-trazas
Gluconasturtiina	GLS aromático	0,-0,4
Glucobrasicina	GLS indólico	1,1-33,4
Neoglucobrasicina	GLS indólico	0,2-19,9
4-Hidroxiglucobrasicina	GLS indólico	0-0,6
4-Metoxiglucobrasicina	GLS indólico	0,2-2,0
Contenido Total GLS		12,8-20,9

En los brotes de brócoli podemos encontrar principalmente los glucosinolatos alifáticos derivados de metionina (glucorafanina, glucoiberina, glucoerucina), así como los glucosinolatos indólicos o derivados del triptófano (glucobrasicina; hidroxi-, metoxi- y neoglucobrasicina)²⁰⁻²². Los compuestos mayoritarios de los brotes de brócoli son los glucosinolatos alifáticos, mientras que en la planta adulta abundan los indólicos²³. El alto contenido de glucosinolatos alifáticos se atribuye principalmente a glucorafanina.

Existen diferencias importantes en el contenido de vitamina C, compuestos fenólicos y glucosinolatos en función de la variedad de brócoli ²⁴⁻²⁶. Además, las condiciones de cultivo pueden afectar y mejorar la biosíntesis de estos metabolitos secundarios, favoreciendo la acumulación de compuestos fenólicos y glucosinolatos²⁷.

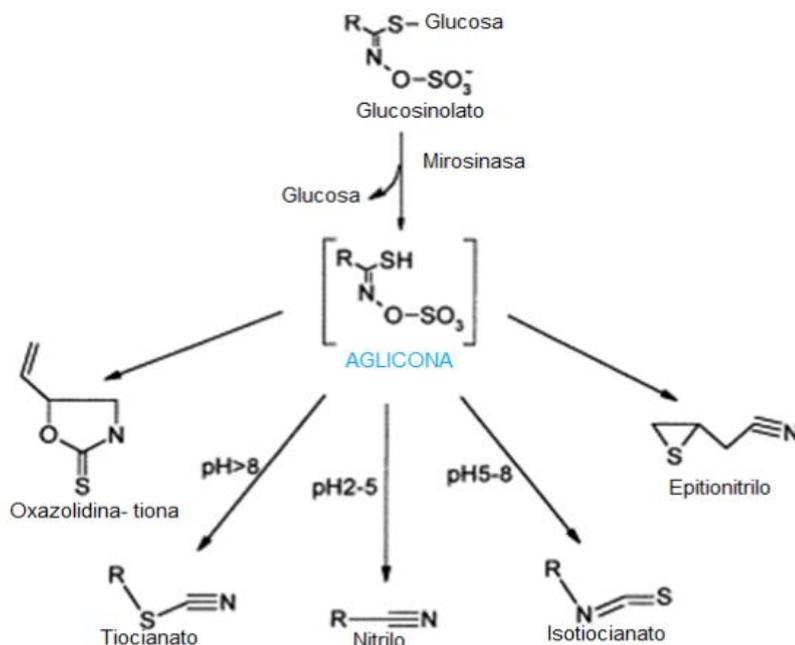


Figura 5. Degradación de glucosinolatos mediante la enzima mirosinasa que cataliza la formación de aglicona²⁸

Los glucosinolatos en el tejido vegetal sufren un proceso de hidrólisis, que se produce cuando éste se rompe como consecuencia de un daño mecánico. La enzima tioglucosidasa (también conocido como mirosinasa) en condiciones normales se encuentra almacenada en vacuolas en el citoplasma y al romperse estas vacuolas se pone en contacto con el sustrato, liberando moléculas de glucosa, de bisulfato y la correspondiente aglicona (Figura 5).

1.2.1.1 Biodisponibilidad de los glucosinolatos

La biodisponibilidad se define como la cantidad de una sustancia que, tras su ingesta, se absorbe y pasa al torrente sanguíneo, momento en el que se distribuye y alcanza los tejidos diana donde ejerce su efecto fisiológico²⁹. Desde un punto de vista nutricional, la biodisponibilidad se expresa como la proporción de dosis ingerida que es excretada a través de la orina, en comparación con la excretada en heces³⁰. La biodisponibilidad de micronutrientes (vitaminas y minerales) y compuestos biológicamente activos (flavonoides y carotenoides) es muy variable, con grandes diferencias en la proporción en la que se absorben y son metabolizados³¹. Con el fin de determinar el posible efecto de estos compuestos en el organismo, y poder establecer relaciones de causalidad, es fundamental conocer los procesos de absorción, metabolismo y excreción de estos compuestos.

Los glucosinolatos presentes en los brotes de brócoli no son absorbidos intactos por el organismo, sino que sufren grandes transformaciones. Primeramente, sufren una hidrólisis de la porción glucídica por la mirosinasa vegetal (Figura 5), cuando se tritura su estructura vegetal, en el procesado del alimento, o durante el proceso de masticación. En el caso de que el glucosinolato llegue intacto a nivel gastrointestinal, sufren una hidrólisis por las tioglucosidasas de la microbiota intestinal. Además, la aglicona puede sufrir posteriores degradaciones, por parte de la microflora intestinal. Los productos de la hidrólisis y degradación son los Isotiocianatos (ITC). En particular, el sulforafano (1-isotiocianato-4-metil-sulfinilbutano) es el producto formado a partir de la glucorafanina (4-metil-sulfinilbutil-glucosinolato).

Estas transformaciones varían en función del pH del medio, que a su vez varía enormemente durante el proceso de digestión. En conjunto más del 80% de glucorafanina se convierte en sulforafano, en un ambiente de pH > 5³². La conversión metabólica de los glucosinolatos a isotiocianatos es crucial para controlar los beneficios en la salud del consumo de los vegetales del género *Brassica*³³.

Una vez que los isotiocianatos son absorbidos a nivel intestinal y entran en el torrente sanguíneo, sufren un metabolismo a través de la vía del ácido mercaptúrico. La conjugación del sulforafano con glutatión está catalizada por la enzima de fase 2 glutatión-transferasa, y estos conjugados son así mismo metabolizados, formando sulforafano-cisteína y sulforafano-N-acetilcisteína³³.

1.2.1.2 Efectos biológicos de los glucosinolatos

Determinados estudios epidemiológicos, retrospectivos y prospectivos, y meta-análisis asociados, han correlacionado las dietas ricas en crucíferas, como el brócoli, con una menor incidencia y progresión del cáncer de pulmón, estómago, colon, recto, vejiga, riñón, mama y próstata³⁴⁻³⁷. Existe una evidencia más limitada respecto al efecto protector de las crucíferas contra las enfermedades cardiovasculares (ECV)³⁸⁻⁴¹.

La riqueza fitoquímica de los alimentos del género *Brassica* está centrando la atención de la comunidad científica por ser potencialmente protectores para el sistema cardiovascular, neurológico y contra ciertos tipos de cáncer, principalmente debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes⁴². Estos efectos beneficiosos del consumo de brotes de brócoli han sido atribuidos principalmente a los productos del metabolismo de los glucosinolatos, los isotiocianatos. A continuación, se describe brevemente algunas de las acciones biológicas de estos compuestos.

1.2.1.3 Inducción de las reacciones de fase II de detoxificación

Una de las sustancias detoxificantes más potentes de origen vegetal es el sulforafano, compuesto que ha demostrado capacidad para proteger a las células contra determinadas patologías, sobre todo aquellas relacionadas con el daño irreversible al ADN.

El sulforafano podría interactuar con múltiples dianas moleculares, pero el mecanismo de acción mejor descrito es el que incluye el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Este factor de transcripción se encarga de la regulación del estado redox de la célula. Cuando se encuentra unido a la proteína KEAP1 en el citoplasma, permanece inactivo⁴³. Cuando el sulforafano penetra en la célula, interactúa con la proteína Keap1, promoviendo la separación entre ésta y el Nrf2. De este modo, el Nrf2 se activa y desplaza al núcleo⁴⁴, donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE), que es una región promotora de ADN que codifica los genes para las enzimas antioxidantes, tales como NADPH, quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), hemoxygenasa-1 (HO-1), tioredoxina y superóxido dismutasa^{45,46}, glutatión-S-transferasa (GST) e uridina difosfatoglucunossiltransferasa (UGT). Estas enzimas catalizan reacciones químicas convirtiendo a las toxinas en compuestos más hidrosolubles, para que sean fácilmente eliminadas⁴⁷⁻⁴⁹. Así, uno de los mecanismos de acción más importantes del sulforafano es el de aumentar la actividad de estas enzimas y proteínas detoxificantes de fase II.

Los estudios experimentales con modelos celulares y animales muestran que los isotiocianatos pueden reducir el riesgo de cáncer y de enfermedades cardiovasculares a través de diferentes mecanismos, el más destacado de los cuales es la inducción del factor nuclear eritroide-derivado 2 (Nrf2), implicado en la respuesta antioxidante mediada por la fase II de detoxificación y la expresión de genes antioxidantes^{50,51}.

El sulforafano a través de la inducción de los sistemas enzimáticos consigue metabolizar los xenobióticos con potencial carcinógeno, justificando así el papel

que ejerce el consumo de brócoli en la reducción del riesgo de cáncer. Además, el sulforafano va a inhibir la conversión de sustancias pro-cancerígenas en cancerígenas, inhibiendo las enzimas de fase-I, responsables de este mecanismo^{52,53}. En general, se ha demostrado que los glucosinolatos alifáticos poseen la mayor capacidad inductora de enzimas de fase II y por tanto son más eficaces en la protección contra el daño oxidativo.

Por otro lado, no se han encontrado efectos secundarios significativos tras el tratamiento con sulforafano a concentraciones terapéuticas en las células sanas⁵⁴⁻⁵⁶. Además, su precursor, la glucorafanina, disminuye el estrés oxidativo, la hipertensión y la inflamación en el sistema cardiovascular de ratas⁵⁷.

1.2.1.4 Acción antioxidante

La inducción de las enzimas detoxificantes de fase II va a estimular la captación de sustancias oxidantes, inhibiendo reacciones oxidativas responsables del daño celular, produciendo un efecto de “multiplicación”, como puede ocurrir con la vitamina C y E.

Estos compuestos tienen acción antioxidante preferiblemente por la inhibición de las enzimas de fase I, que son las responsables de la activación de la mayor parte de radicales libres. Por otro lado, la producción de glutatión, cofactor necesario para la actividad enzimática, se incrementa tras el consumo de brócoli por la presencia de isotiocianatos y aminoácidos como cisteína y metionina, que proporcionan azufre necesario para sintetizar este compuesto⁵⁸. Además, el brócoli es una buena fuente de sustancias antioxidantes como carotenoides, flavonoides, vitamina C.

1.2.1.5 Acción antiinflamatoria y modulación inmunológica

El sulforafano puede contrarrestar los procesos inflamatorios, actuando sobre el factor NF-Kappa B, que interviene en estos procesos^{59,60}. Además, la

inflamación genera un aumento de radicales libres, y la inducción de las enzimas de fase II contribuye a inhibir este efecto de forma indirecta ⁶¹. Se ha comprobado que el sulforafano actúa sobre el sistema inmunitario a través de la interleucina-2 (IL-2) y la γ -interferona. Simultáneamente inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias como la: IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF ^{62,63}.

1.2.1.6 *Acción sobre el metabolismo lipídico y glucídico*

En modelos animales, se ha comprobado que el factor de transcripción Nrf2 regula la transcripción de muchos genes implicados en el metabolismo lipídico, como la síntesis de lípidos y ácidos grasos, así como la glucólisis⁶⁴. Este factor de transcripción está modulado por el estado redox celular y a su vez participa en la síntesis de enzimas redox-sensibles⁶⁵. Por lo tanto, la intervención dietética con inductores Nrf2, como los isotiocianatos, se puede esperar que tenga efectos sobre el perfil metabólico.

Respecto a los efectos del brócoli a nivel del perfil lipídico, se ha demostrado que el extracto de brotes de brócoli (200-400 mg/kg) administrado en animales junto con una dieta rica en grasa, produce un aumento del HDL-colesterol y reduce la actividad de la lipoproteín-lipasa, reduciendo por tanto la absorción de lípidos⁶⁶. Además, a nivel intestinal, la fibra dietética del brócoli, como fuente fermentable, confiere cierta protección frente al consumo de dietas ricas en grasas, en términos de mantenimiento de una buena microbiota, una morfología adecuada del colon⁶⁷ y evitar la absorción de lípidos⁶⁸.

De manera similar, un metabolito de los glucosinolatos indólicos, el indol-3-carbinol (I3C) produce una disminución en la infiltración de macrófagos, en ratones obesos⁶⁹. El suplemento de la dieta con 1 g de I3C/kg peso durante 10 semanas redujo la ganancia de peso corporal con la dieta hiperlipídica, redujo la acumulación de grasa visceral y los niveles de lípidos en plasma y de citoquinas TNF- α , IL-6, así como activó las rutas de termogénesis en adipocitos 3T3-L1, lo que sugiere que el I3C tiene potencial suficiente para tratar la obesidad y atenuar la inflamación ^{70,71}.

En humanos se han realizado pocos estudios con crucíferas relacionados con la salud cardiovascular, diabetes u obesidad, puesto que la mayoría de los estudios clínicos con crucíferas (y el compuesto puro, el sulforafano) se han centrado en su actividad anticancerígena^{22,72,73}. Murashima et al⁷³. observaron que el consumo de brotes de brócoli (100 g/día) durante una semana, produce una disminución del colesterol total y del LDLc, y un aumento de HDLc. En un estudio prospectivo con 34492 mujeres postmenopáusicas, se observó una asociación significativa entre la reducción de riesgo de enfermedad coronaria y el consumo de brotes de brócoli⁷⁴. Los glucosinolatos de los brotes de brócoli han demostrado efectos cardioprotectores, activando la función antioxidante de las tiorredoxinas celulares y reduciendo los niveles de homocisteína^{52,75,76}. Por lo tanto, los brotes de brócoli tienen potencial para ejercer efectos beneficiosos sobre determinados factores de riesgo cardiovascular.

1.2.1.7 Acción antibacteriana y antifúngica

Cheney en 1952⁷⁷ observó que la S-metilmationina, compuesto derivado de los glucosinolatos presente en el brócoli, mejora la sintomatología en pacientes con úlceras estomacales. A esta sustancia la llamó Vitamina U y actualmente se ha demostrado que los productos de degradación del sulforafano así como los glucosinolatos intactos inhiben el crecimiento y multiplicación de la bacteria *Helicobacter Pylori*⁷⁸. Un estudio de intervención dietética con brotes de brócoli puso de manifiesto la acción bactericida contra infecciones por *Helicobacter pylori*, que se asocian estrechamente con el cáncer gástrico⁷⁹.

1.2.1.8 Influencia en el metabolismo de los estrógenos

A través de metabolitos como el indol-3-carbinol (I3C) y diindolilmetano (DIM), el consumo de brócoli mejora las alteraciones que se producen en el sistema hormonal en la menopausia o en cánceres hormono-dependientes^{80,81}.

1.2.1.9 Efectos en patologías neurodegenerativas

El sulforafano es uno de los inductores naturales más potentes de la ruta Keap1/Nrf2/ARE y esto se manifiesta en cultivos celulares y modelos animales con actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiangiogénica y neuroprotectora⁸².

Se ha observado un efecto protector sobre el sistema nervioso central, con un mecanismo indirecto, a través de la inhibición del estrés oxidativo e inflamatorio anteriormente mencionado.

Los efectos protectores de los isotiocianatos son evidentes en los modelos de lesión del tejido nervioso y de neurodegeneración⁷⁵. En modelos animales tratados con sulforafano, se observó una protección de la retina, sobre el daño inducido por luz. Estos ratones desarrollaron un mayor número de fotorreceptores y una capa más grande de células epiteliales de la retina en comparación con el grupo control. En otros modelos animales se ha observado una disminución del edema cerebral, reducción de marcadores inflamatorios, la protección frente a marcadores relacionados con la enfermedad de Parkinson⁸³ y protección neuronal frente a la muerte celular⁸⁴.

Respecto a la cantidad de compuestos bioactivos necesarios para ejercer estas acciones en el organismo, hay que señalar que en una ración de brócoli podemos encontrar hasta 60 mg de glucorafanina, precursora del sulforafano. En estudios preclínicos llevados a cabo en modelos animales para evaluar las propiedades anticancerígenas del sulforafano, se han llegado a usar hasta 4,4 mg sulforafano/Kg peso al día (equivalente >300mg SFN/día para una persona de 70Kg)⁷². Estas cantidades son muy difíciles de obtener con inflorescencias de brócoli, por dos motivos: en primer lugar, porque durante el cocinado se pierde un porcentaje alto de estos compuestos²⁰⁻²²; y, en segundo lugar, porque se necesitaría consumir unas 6 inflorescencias crudas de brócoli ($\approx 55\text{mg}/500\text{g}$). En este sentido, hay que destacar que los brotes de brócoli contienen entre 20 y 100 veces más glucorafanina que una inflorescencia, por lo que es más fácil conseguir las cantidades necesarias para producir efectos beneficiosos ingiriendo brotes de brócoli que la pella de brócoli maduro.

Por otro lado, para calcular la cantidad de sulforafano que puede usarse en nutrición humana, hay que considerar que sólo el 20% de glucorafanina está disponible y es transformada a sulforafano en el organismo, conversión que puede favorecerse masticando bien los brotes de brócoli para asegurar la liberación de la mirosinasa, y evitando hervir el alimento ^{21,22,48}.

Además, es posible optimizar el contenido de glucosinolatos y la acción dependiente de la mirosinasa para formar isotiocianatos bioactivos, actuando en las distintas etapas de la cadena alimentaria desde las semillas hasta la planta adulta, aumentando de este modo la aplicación de los vegetales del género Brassica en la salud y bienestar de la población²².

1.2.2 Vitamina C

La Vitamina C es una vitamina hidrosoluble necesaria para el desarrollo del organismo. A través de la dieta, el ser humano ingiere más del 85% de la vitamina C mediante el consumo de frutas y hortalizas ^{85,86}. Tal y como se muestra en la siguiente figura (Figura 6), el término vitamina C incluye ácido ascórbico y su producto de oxidación, el ácido dehidroascórbico.



Figura 6. Estructura química del ácido L-ascórbico, forma reducida de la vitamina C; y del ácido dehidroascórbico, forma oxidada de la vitamina C⁸⁷

Dentro de los vegetales la vitamina C posee un papel fundamental ya que interviene en sistemas de oxidación de las células vegetales y establece potenciales favorables de oxidación-reducción. Una vez que es ingerido, el ácido L-ascórbico actúa principalmente como cofactor enzimático, como captador de radicales libres y como donador/aceptor en el transporte de electrones en la membrana plasmática. Es el principal antioxidante de los medios hidrófilos en el organismo y posee mayor actividad que el ácido dehidroascórbico⁸⁵. Block et al. en 2004⁸⁸ observaron que el consumo de vitamina C disminuye los niveles de proteína C reactiva, un marcador de inflamación relacionado con la etiología de enfermedades cardiovasculares.

Se han descrito niveles de vitamina C en brócoli de alrededor de 100 mg/100 g peso fresco, que sobrepasan los niveles de otras crucíferas como las coles o la coliflor, que presentan rangos entre 35-68 mg/100 g peso fresco ⁸⁹. Estos niveles se ven afectados por la variabilidad genética de las variedades de brotes (hasta un 71%)⁹⁰, así como factores como la incidencia de la luz solar o el proceso de cosechado y almacenamiento.

Los brotes de brócoli son una buena fuente de vitamina C. Se ha demostrado que los niveles de esta vitamina varían enormemente en función del método de cocinado empleado. Los valores más altos de vitamina C (117.3 mg/100 g peso fresco) se mantienen con el cocinado al vapor. Sin embargo, el cocinado con olla a presión reduce el contenido de vitamina C (suma de ácido ascórbico y dehidroascórbico) entre un 20 y un 46% ⁹⁰ y con el cocinado con microondas se pierde un promedio entre 20-40 %.

1.2.3 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles del grupo de los terpenos, que se encuentran de forma natural en las plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Existen más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo. Los carotenoides son terpenos formados por 8 unidades de 8 isoprenos, cada uno de los cuales consta de 5 átomos de carbono.

Son por lo tanto estructuras de 40 átomos de carbono, conocidos como tetraterpenos, y estos átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas. Se dividen en dos tipos básicos: los carotenos que son cadenas totalmente hidrocarbonadas y las xantofilas que son sus derivados oxigenados (Figura 7).

El β -caroteno y la luteína son los principales carotenoides en el género *Brassica*⁹¹⁻⁹³. Se ha demostrado que los brotes de brócoli son ricos en carotenoides (hasta 1.16 mg por 100 g de peso fresco)⁹⁴. Comparando diversas variedades de brócoli, coles de Bruselas, coliflor, col y col china, Singh y col. (2007)⁹⁵ observaron que el brócoli presentaba los niveles más altos de compuestos fenólicos (63.4 mg/100 g peso fresco o f.w.), vitamina C (52.9 mg/100 g f.w), β -caroteno (0.81 mg/100 g f.w.), luteína (0.68 mg/100 g f.w.) y α -tocoferol (0.47 mg/100 g f.w.).

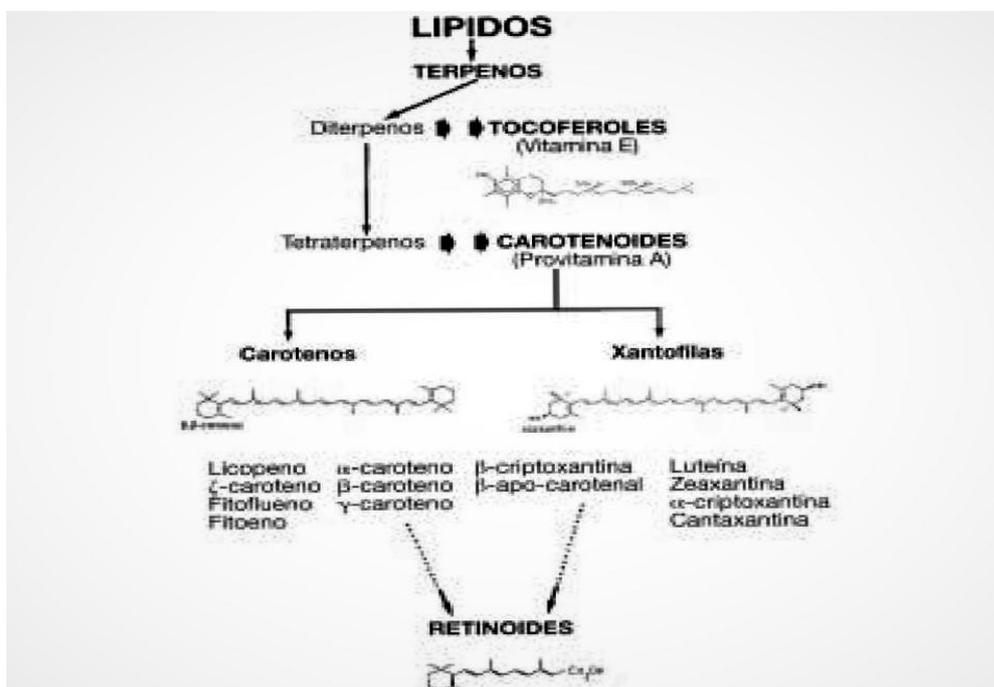


Figura 7. Esquema general de la ruta biosintética de carotenoides⁹⁶

La actividad biológica de los carotenoides viene definida por su estructura molecular, variando entre los distintos organismos vegetales y animales. Esta actividad la podemos clasificar atendiendo a su aspecto funcional esencial, a la acción fisiológica que ejercen en determinadas condiciones y a las correlaciones existentes con ciertas patologías (Tabla 4).

Tabla 4. Actividades biológicas de los carotenoides en el hombre⁹⁷

Funciones	- Actividad provitamínica A
Acciones	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxidantes - Inmunopotenciadores - Inhibición de mutagénesis y transformación - Inhibición de lesiones premalignas - Protección frente a fotosensibilización
Asociaciones (asociación inversa frente a riesgo de)	<ul style="list-style-type: none"> - Cataratas - Degeneración macular - Diversos tipos de cáncer - Enfermedad cardiovascular

Durante los últimos años, han aumentado las pruebas epidemiológicas que apoyan el efecto protector de los carotenoides frente al desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas. Por ejemplo, la suposición de que nutrientes antioxidantes, como el β -caroteno, puedan ejercer un papel preventivo frente al cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular senil, se basa en pruebas experimentales que sugieren que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes-moduladoras de la respuesta inmune, modificadores de procesos inflamatorios y transducción de señales en y entre células⁹⁸.

El consumo de carotenoides disminuye el riesgo de enfermedades crónicas y se distribuyen fundamentalmente en determinados tejidos (ejemplo, Luteína/zeaxantina en retina), formando parte de la fracción lipídica de los sistemas biológicos, protegiendo a las membranas del efecto de los radicales libres.

1.2.4 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo (-OH), al que se une al menos a un grupo funcional.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas en las que desarrollan diversas funciones como la protección frente al estrés biótico o abiótico, así como aportar color, sabor y aroma. Dentro de estos compuestos se encuentran los flavonoides, que en el organismo ejercen una importante actividad antioxidante y son inhibidores de varios tipos de tumores⁹⁹.

Hay que tener en cuenta que los compuestos fenólicos se presentan en su mayoría de forma combinada con azúcares en las plantas, como O-glicósidos. Según su estructura química los podemos clasificar en¹⁰⁰:

1. No flavonoides:
 - Fenoles no carboxílicos.
 - Ácidos fenólicos: derivados del ácido cinámico.
 - Estilbenos.

2. Flavonoides: dos anillos aromáticos unidos por un puente tricarbonado que se cierra formando un anillo oxirano de tipo flavano. Los flavonoides pueden agruparse en 7 subgrupos en función del grado de oxidación de este anillo flavano:
 - Antocianos o antocianinas
 - Flavanoles

- Flavanonas
- Flavonoles
- Flavonas
- Isoflavonoides
- Chalconas

Los compuestos fenólicos más comunes presentes en los brotes de brócoli son aquellos derivados de los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido sinápico y derivados, que han sido estudiados por a su efecto protector contra el estrés oxidativo en las células. Los brotes de col lombarda, colirrábano, nabo y rábano son los que contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos no coloreados (ácidos hidroxicinámicos y flavonoles). Por otro lado, encontramos los antocianos, que son los compuestos fenólicos coloreados presentes a altas concentraciones (100-300 mg por 100 g f. w.) en brotes de rábano rojo o col roja, y que han mostrado propiedades beneficiosas frente al desarrollo de ciertas enfermedades neurodegenerativas¹⁰¹.

En la Figura 8 se resumen los principales compuestos bioactivos que se encuentran presentes en los brotes de brócoli y en las crucíferas en general.

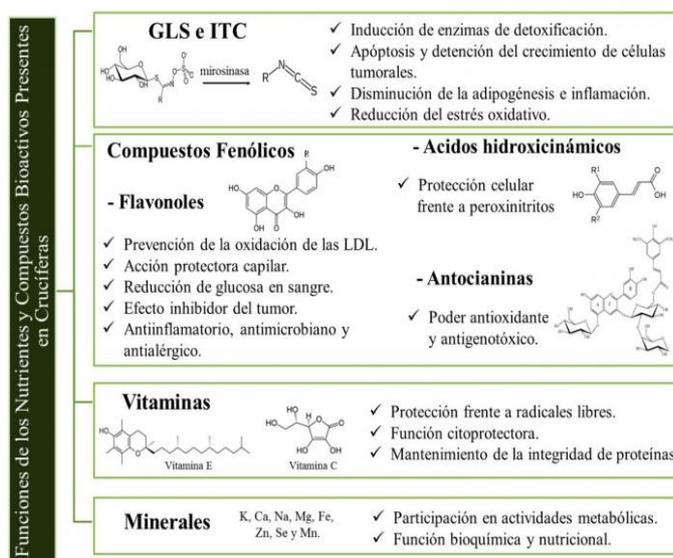


Figura 8. Nutrientes y fitoquímicos en crucíferas (brócoli) asociados a beneficios para la salud¹⁰²

1.3 OBESIDAD Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

1.3.1 Situación actual

En la actualidad, más del 55% de la población adulta tiene un exceso de peso (Encuesta Nacional de Salud) y en la Unión Europea, casi el 60% de los adultos, lo que supone que casi 260 millones de adultos tienen sobrepeso u obesidad. La obesidad aumenta tanto en los países con un nivel económico elevado, como medio o bajo, con graves consecuencias a nivel de salud personal y pública. Por ello es necesario un esfuerzo global para monitorizar y tratar la obesidad^{103,104}.

La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que afecta negativamente a la salud. El instrumento de medida más aceptado para establecer los grados de obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC), que se define como la relación entre el peso y la altura (Kg/m^2). La Organización Mundial de la Salud^{103,105} clasifica el sobrepeso como $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ y la obesidad como $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ en adultos. Actualmente hay una mayor prevalencia de obesidad en las mujeres, y se observan mayores consecuencias negativas a nivel somático y psicosocial que en los varones^{106,107}.

Las enfermedades que se relacionan directa o indirectamente con la obesidad suponen más de la mitad de las enfermedades no transmisibles, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus y ciertos tipos de cáncer (pulmón, mama, colon, recto...). Casi un 7% de los presupuestos nacionales de salud en la Unión Europea (UE) se destinan a enfermedades que se relacionan con la obesidad^{103,104,107}, condiciones que deterioran y destruyen la calidad de vida^{108,109}.

Prevenir y tratar la obesidad es una prioridad mundial. A pesar de ser bien conocido que la restricción calórica y el aumento de la actividad física pueden favorecer la pérdida de peso, la realidad es que cada vez es mayor el número de personas obesas en el mundo. El consumo de alimentos específicos ricos en compuestos bioactivos y biodisponibles, que actúan a nivel del tejido adiposo (adiposidad, inflamación) son de gran ayuda en las intervenciones nutricionales y clínicas para el control y tratamiento de esta enfermedad crónica¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

1.3.2 Síndrome Metabólico

Podemos definir el síndrome metabólico como diversas alteraciones en el metabolismo, que en su conjunto son considerados como factores de riesgo para el desarrollo de determinadas enfermedades, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares¹¹⁰⁻¹¹³ (Figura 9).

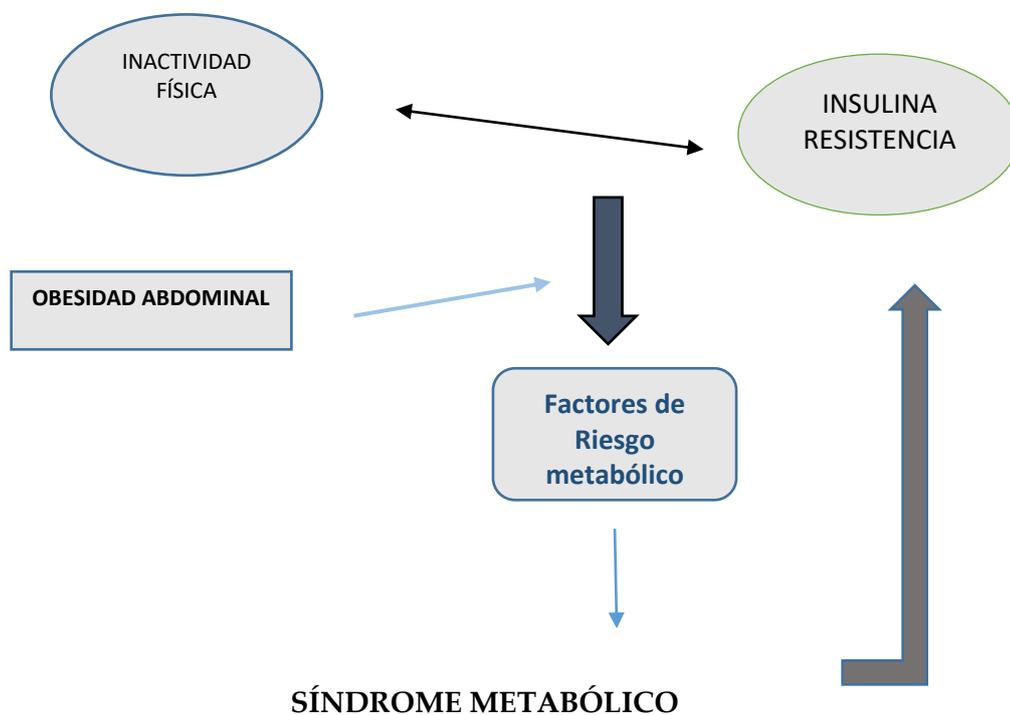


Figura 9. Factores asociados al desarrollo del síndrome metabólico¹¹⁴

En el año 1988, el Dr. Reaven¹¹¹, describió el síndrome metabólico como una serie de anormalidades entre las que se incluyen: hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipidemia, denominándolo “Síndrome X”, donde la resistencia a la insulina constituía el factor o el principal mecanismo fisiopatológico^{111,113}. Existen distintas publicaciones y guías donde se relaciona el diagnóstico, la prevención y su tratamiento (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes del síndrome metabólico según diversas asociaciones¹¹⁴

	ATP III	OMS	AACE	IDF
Triglicéridos \geq 150 mg/dl	X	X	X	X
HDL < 40 mg/dl varones	X	X	X	X
HDL < 50 mg/dl mujeres				
HTA > 130/85 mm/hg	X	X	X	X
Insulina Resistencia (IR)		X		
Glucosa > 100mg/dl (ayunas)	X		X	X
Glucosa 2h: 140 mg/dl			X	
Obesidad Abdominal	X			X
IMC \uparrow		X	X	
Microalbuminuria		X		
Factor de Riesgo y diagnóstico	3 más IR	Más de 2	Criterio clínico	Obesidad abdominal

Los criterios diagnósticos considerados son difíciles de establecer ya que el síndrome metabólico está sujeto a distintas definiciones y por tanto podría condicionar una variación en el diagnóstico de riesgo cardiovascular^{110,115}.

Existe una gran prevalencia del síndrome metabólico a nivel mundial, y es considerado por muchos profesionales de la salud como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes o un estado previo al desarrollo de dicha enfermedad¹¹⁶. Fernández-Bergés et al. (2012)¹¹⁷, observaron que la prevalencia del síndrome metabólico en la población adulta es del 30%, predominando en varones hasta la edad de 55 años y en las mujeres a partir de los 65 años. Existe un patrón homogéneo en glucemia y trigliceridemia en los varones, mientras que en el caso de las mujeres prevalece la obesidad abdominal y aumento de HDLc.

La edad predeterminada para diagnosticar personas con síndrome metabólico ha ido disminuyendo con el paso del tiempo, ya que antiguamente el riesgo mayor se encontraba en personas de unos 50 años aproximadamente, y actualmente se encuentra entre 30-35 años¹¹⁸. Esta diferencia de edad se puede deber probablemente a la tendencia a seguir una mala alimentación desde edades muy tempranas, incluyendo las comidas rápidas, ricas en grasas, el consumo excesivo de azúcares añadidos, así como una escasa o nula actividad física.

1.3.3 Relación entre Obesidad e Inflamación

La obesidad se caracteriza por un estado proinflamatorio crónico debido a la acumulación excesiva de grasa corporal ^{107,109}. El tejido adiposo es clave en la homeostasis de la energía y en la respuesta inflamatoria ¹¹⁹⁻¹²¹. Los estudios clínicos han puesto de manifiesto que los marcadores de inflamación (Interleucina-6 (IL-6), proteína C reactiva (CRP) y factor de necrosis tumoral (TNF- α)) están elevados cuando hay una alta adiposidad visceral^{122,123}. En estas condiciones se observa un aumento de ciertas moléculas señalizadoras, como la adiponectina y leptina, así como de proteínas de fase aguda implicados en el balance energético y la sensibilidad a la insulina. Estos biomarcadores aumentan

cuando se incrementa la masa grasa en las personas obesas y producen un estado inflamatorio permanente¹²²⁻¹²³.

Para evaluar el efecto de los fitoquímicos de los alimentos en individuos obesos, podemos considerar su actuación sobre diferentes dianas del tejido adiposo y el estado inflamatorio¹²⁴⁻¹²⁸. Entre otros mecanismos, se propone la modulación de la absorción de los ácidos grasos de la dieta, inhibiendo las enzimas lipasas gástricas. Otro mecanismo propuesto es la reducción del depósito de lípidos en el tejido adiposo, inhibiendo la enzima lipoprotein-lipasa, así como la inhibición de marcadores reguladores de la inflamación. Los alimentos, al contener compuestos bioactivos con diversos mecanismos de acción, pueden actuar de forma sinérgica sobre múltiples dianas fisiológicas y así tener un efecto claramente positivo sobre patologías relacionadas con la obesidad¹²⁹. Además, incluso con los fármacos más potentes los efectos son modestos y muy variables, por lo que el valor potencial de aumentar el consumo de un alimento rico en fitoquímicos bioactivos en la población obesa puede ser una buena estrategia. Las evidencias han demostrado que las personas que consumen más frutas y hortalizas tienen menor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos implicados en estos factores son múltiples y actualmente en estudio^{130,131}.

CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La obesidad contribuye un problema de salud pública prioritario, que afecta a casi el 60% de la población a nivel nacional y global, de ambos sexos y de todas las edades y grupo étnicos. La obesidad supone una pérdida de la calidad y la esperanza de vida, no sólo porque aumenta el riesgo de problemas cardiovasculares, desequilibrios metabólicos y disfunciones del tejido adiposo, sino también por inducir a una mayor incidencia de otras enfermedades no contagiosas como el cáncer. Por ello, la prevención y tratamiento de la obesidad es una prioridad de los sistemas de salud pública a nivel mundial.

La dieta juega un papel esencial en el bienestar y la salud. Sin embargo, la influencia de los componentes de los alimentos (fitoquímicos bioactivos) sobre condiciones fisiopatológicas es un área de investigación creciente, no estando aún definida la dieta que podría ser “óptima” para la salud. El consumo de alimentos ricos en compuestos bioactivos y biodisponibles, que actúen sobre el tejido adiposo y sus alteraciones (a nivel inflamatorio), puede representar una herramienta muy útil en las intervenciones nutricionales y clínicas para controlar y tratar esta patología crónica.

Los brotes de brócoli comestibles representan una fuente rica en nutrientes y potenciales ingredientes funcionales. Los brotes o germinados de brócoli (*Brassica oleracea L. var. Italica*) son la mejor fuente dietética de glucosinolatos, que parecen poseer efectos sobre el metabolismo del colesterol y la homeostasis de los lípidos. Hasta la fecha la mayoría de los trabajos realizados en humanos han sugerido el potencial antiinflamatorio y quimiopreventivo de estos compuestos, en diferentes etapas de las enfermedades degenerativas y el cáncer. Sin embargo, son escasos los estudios clínicos realizados con el brócoli y mucho menos con los brotes de brócoli en población obesa o con sobrepeso. Conocer el efecto beneficioso de estos compuestos fitoquímicos, especialmente los glucosinolatos/isotiocianatos de los brotes de brócoli sobre parámetros

metabólicos y fisiológicos en la obesidad permitiría ofrecer opciones saludables de alimentos para la población obesa; por ejemplo, en programas de nutrición personalizada que permitan un estado de salud óptimo y el bienestar de la sociedad en general, con un impacto positivo en los sistemas de salud pública.

Este proyecto supone una gran oportunidad de generar conocimiento en investigación básica y aplicada de I+D+i en las líneas de la Estrategia Española de Ciencia y Tecnología y de Innovación 2013-2020. Concretamente en el Programa Estatal de I+D+i orientada a los retos de la sociedad se destaca la necesidad de dar respuesta a problemas de Salud, Cambio demográfico y Bienestar, y en materia de Seguridad y Calidad alimentaria (Retos 1 y 2). El mercado del brócoli representa una actividad socio-económica de gran valor en el sudeste español y concretamente en la Región de Murcia. La búsqueda de soluciones para el tratamiento de la obesidad en la edad adulta, es una cuestión de salud pública e individual que preocupa a científicos, a la clase política y a la sociedad en general. Además, la preocupación por garantizar el acceso a alimentos seguros y saludables, de mayor calidad, investigando sobre la nutrición y potenciando el desarrollo tecnológico en el sector agroalimentario, son retos y oportunidades para la I+D+i en consonancia con este proyecto. Son necesarias nuevas opciones de alimentos seguros y saludables para combatir la obesidad y el sobrepeso, alimentos y productos ricos en fitoquímicos bioactivos que se incorporen a la dieta cotidiana, lo que ofrece oportunidades para I+D e innovación.

En este proyecto se va a evaluar la actividad biológica de los brotes de brócoli sobre dianas fisiológicas de la obesidad y sus condiciones asociadas (metabolismo lipídico, glucídico, inflamación), todas ellas relacionadas también con el riesgo vascular y otras enfermedades crónicas. En este proyecto se identificarán respuestas biológicas individuales y múltiples desde el laboratorio agroalimentario hasta la intervención a nivel nutricional- clínico. Diseñar nuevas recomendaciones para nutrición personalizada y ofrecer alimentos sanos y naturales como herramientas para el tratamiento de enfermedades no contagiosas en adultos, nos ofrece oportunidades para I+D+i multidisciplinar desde el ámbito científico puro y aplicado, hasta el desarrollo industrial y la sociedad como usuario final.

CAPÍTULO III - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1.4 HIPÓTESIS

Partimos de la hipótesis de que los fitoquímicos bioactivos presentes en los brotes de brócoli incorporados en la dieta pueden ser beneficiosos en la población con sobrepeso por sus efectos antiinflamatorios, actuando en las dianas fisiológicas y moleculares de la obesidad.

1.5 OBJETIVOS

El objetivo general es la evaluación de la biodisponibilidad y la bioactividad de los compuestos bioactivos presentes en los brotes de brócoli, en modelos de experimentación in vitro hasta la intervención en sujetos adultos (estudio clínico).

Los objetivos específicos que se plantean en este proyecto son los siguientes:

- Caracterización de la composición nutricional y fitoquímica de los brotes de brócoli.
- Evaluación de la actividad biológica de los brotes de brócoli a nivel bioquímico (in vitro): inhibición de enzimas del metabolismo lipídico (lipasas) y glucídico (glucosidasas).
- Evaluación de la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos de los brotes de brócoli en población en sobrepeso

- Evaluación de los efectos del consumo de brotes de brócoli en población obesa adulta de ambos sexos, sobre parámetros de obesidad: medidas antropométricas, perfil bioquímico, inflamación

- Diseño de recomendaciones dietéticas para incluir los brotes de brócoli como coadyuvante en el tratamiento del sobrepeso y para la nutrición de la población general.

CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 BROTES DE BRÓCOLI

Es necesario conseguir brotes de brócoli enriquecidos en glucosinolatos para la evaluación de su calidad, aceptabilidad y eficacia (biodisponibilidad, metabolismo y bioactividad). Los glucosinolatos están presentes, en grandes cantidades, en las semillas y en los brotes de brócoli durante los primeros días de edad, alcanzando hasta 10 veces más los niveles que aparecen en el brócoli adulto. Con el control de las condiciones agronómicas (luz/oscuridad, irrigación, estrés salino) se pueden inducir diferentes respuestas a nivel de contenido de glucosinolatos (alifáticos, indólicos), debido a los efectos sobre las rutas de su biosíntesis. Además, el uso de elicitadores durante el desarrollo de los brotes favorece su enriquecimiento en antioxidantes naturales. Por lo tanto, se necesita optimizar el desarrollo y favorecer el enriquecimiento de los brotes de brócoli en fitoquímicos bioactivos (glucosinolatos/isotiocianatos)^{132,133}.

A continuación, se describe la obtención, caracterización y enriquecimiento de los brotes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) en fitoquímicos bioactivos (glucosinolatos/isotiocianatos) en condiciones controladas.

4.1.1 Germinación y Desarrollo de los brotes de Brócoli: Uso de Elicitadores

Los elicitadores son sustancias que inducen cambios fisiológicos en los vegetales y pueden ser del tipo Biótico/biológico (fitohormonas, oligosacáridos, aminoácidos) o abiótico (salinidad, temperatura, radiación, etc.) y se utilizan para enriquecer la composición fitoquímica de los alimentos. Dependiendo del tipo de elicitador, se activan diferentes rutas de señalización para sintetizar un conjunto de metabolitos de defensa, las fitoalexinas, entre las que se incluyen los glucosinolatos/isotiocianatos^{26,101}.

En el presente estudio, el desarrollo de las semillas de brócoli para obtener los brotes con certificado ecológico (Intersemillas S. A.), se ha realizado siguiendo el siguiente proceso: se higienizaron las semillas con 5g/L NaClO/L, induciendo la germinación durante 24 h en agua ultra-pura, junto con aireación (proceso conocido como *priming*). El volumen de las semillas se dividió para sembrar las bandejas perforadas de plástico transparente con film de celulosa del 100%, y posteriormente se irrigaron con 5g/L de hipoclorito sódico (Reglamento (CE) 889/2008), manteniéndose en una cámara con unas condiciones controladas de ciclos de luz-oscuridad (16/8h día/noche), temperatura (25/20°C) y humedad relativa (60/80%). La radiación fotosintética activa se suministró con una combinación de tubos fluorescentes (Philips TLD 36 W/83, Sylvania F36W/GRO) y lámparas de Na (Osram HQI. T 400W), y se desarrollaron y muestrearon los brotes hasta alcanzar 12 días de edad ¹³⁴.

En un principio no estaba establecido con claridad en qué medida podrían mejorar los elicidores el contenido de glucosinolatos/isotiocianatos en los brotes de brócoli de forma significativa, durante la germinación. Para este enriquecimiento de glucosinolatos en los brotes de brócoli se hizo necesario optimizar la relación dosis/respuesta con el empleo de diferentes agentes y combinaciones: ácido jasmónico (JA, 15-60 μ M), metil-jasmonato (MeJA, 25-250 μ M) y DL-metionina (1-5 μ M).

Después de realizar las pruebas de elicitación y cebado de semillas para enriquecer los brotes de brócoli en glucosinolatos se usó como elicitor el metil-jasmonato (Me-JA), preparando las semillas y rociando diariamente sobre los cotiledones desde el día 4-7 de germinación. Los brotes de brócoli se suministraron frescos y crudos por Aquaporins Ingredients S. L. (Alcantarilla, Murcia, España). Fueron bioestimulados con MeJA 250 μ M, durante los 4 días previos a la entrega, para aumentar hasta dos veces más los niveles de producción de los compuestos bioactivos, según un protocolo previamente validado ¹³⁴.

Se observó que el MeJA en concentraciones de 250 μ M afectaba al metabolismo e incrementaba la biosíntesis de los glucosinolatos hasta un 70% (glucoiberina, glucobrasicina). De esta manera, mejoramos el contenido de estos compuestos promotores de la salud, sin verse alterados los niveles en cuanto a su composición nutricional por estos tratamientos. Se recolectaron tres bandejas de brotes de brócoli una vez por semana durante el estudio de intervención, se congelaron y liofilizaron, con el fin de analizar su contenido en glucosinolatos e isotiocianatos y comprobar unas concentraciones homogéneas de principios activos durante todo el ensayo clínico ²⁷.

4.1.2 Análisis microbiológico de los brotes de brócoli

Las muestras de brotes de brócoli de cada lote fueron tratadas en condiciones antisépticas/estériles (cámara de flujo laminar) para su homogenización en un volumen controlado de agua estéril de peptona tamponada en un digestor (Laboratory Blender Stomacher, Reino Unido). Las disoluciones seriadas de este homogenizado se alicuotaron para añadirse a las placas de agar, para recuento de microorganismos (aerobios, levaduras y mohos). Las muestras (por triplicado) fueron preparadas para recuentos de 30-300 unidades de formación de colonias (CFU), e incubadas durante tres días a 30°C y durante cinco días a 25°C para el recuento de microorganismo aerobios, y levaduras y mohos, respectivamente, para obtener resultados de recuentos en \log_{10} CFU/g.

4.2 EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL BRÓCOLI

4.2.1 Extracción y determinación de los glucosinolatos en los brotes de brócoli

La extracción de las muestras liofilizadas (50 mg) se realizó con 1 ml de MeOH:H₂O (70:30). Las muestras se sometieron a un proceso de incubación durante 30 min a una temperatura de 70°C, para así poder desactivar la enzima

mirosinasa. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas; el extractante fue evaporado a través de un evaporador rotatorio y el residuo sólido disuelto en H₂O para su posterior análisis cromatográfico. Las muestras fueron filtradas por una membrana de PVDF de 0,45 µm (Millex) y se analizaron por HPLC-DAD-MS/MS en los laboratorios del CEBAS-CSIC, mediante el método descrito por Baenas et al. para la efectiva identificación y cuantificación de los glucosinolatos¹³³.

4.2.2 Extracción y determinación de los isotiocianatos en los brotes de brócoli

Para la extracción y determinación de los isotiocianatos en los brotes de brócoli, cada muestra liofilizada (50 mg) fue extraída con 1,5 ml de H₂O. Las muestras fueron sometidas a un proceso de incubación durante 24 h a una temperatura ambiente de unos 25 °C, con agitación, para poder conseguir así la hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos¹³⁵. Una vez centrifugadas las muestras, fueron filtradas por una membrana de PVDF de 0,45 µm (Millex) y se analizaron por UHPLC-MS/MS-QqQ, mediante el método descrito por Dominguez-Perles et al. para la identificación y cuantificación de los isotiocianatos¹³⁶.

4.2.3 Extracción y determinación de la vitamina C en los brotes de brócoli

La vitamina C total es la suma de ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (DHAA). El análisis por HPLC se realiza después de la derivatización del DHAA en el fluoróforo 3-(1,2-dihidroxietil)-furo [3,4-*b*]-quinoxalina-1-ona (DFQ), mediante la reacción con diclorhidrato de 1,2-fenilendiamina (OPDA; Fluka Chemika, Nev-Ulm, Suiza) según el método de Pérez-Balibrea et al. (2008)¹³². Posteriormente, se tomaron 20 µL del extracto y se analizaron en un HPLC Merck Hitachi (Tokio, Japón), equipado con un detector UV L-4000 y una bomba L-6000.

La separación del fluoróforo DFQ y del ácido ascórbico se realizó en una columna Lichrospher RP18 100 μm de tamaño de la partícula, 250 x 4 mm (Scharlab, Barcelona, España). La fase móvil fue metanol-agua (5:95, V/V) que contenía 5 $\mu\text{mol/L}$ de cetrimida y 50 $\mu\text{mol/L}$ de dihidrógeno fosfato de potasio a $\text{pH} = 4,5$. La velocidad de flujo fue de 0,9 mL/min^{-1} . La longitud de onda del detector se estableció inicialmente a 348 nm y, después de la elución de DFQ se cambió manualmente a 261 nm para la detección del ácido ascórbico.

4.3 DIGESTIÓN IN VITRO DE LOS BROTES DE BRÓCOLI

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* se simulan la digestión gastrointestinal y el proceso de absorción intestinal mediante el uso de enzimas digestivas. La técnica consta de una digestión gástrica (2 h) y otra digestión intestinal (3 h). Para representar la digestión lo más realista posible, desarrollamos una extracción de brotes de brócoli frescos, simulando un ambiente gastrointestinal. El procedimiento fue adaptado según el trabajo previo de Gil-Izquierdo y col ¹³⁷.

4.3.1 Procedimiento

Para la preparación de las muestras, se homogeneizaron 12 g de brotes de brócoli, en un Ultraturrax T-18 básico 24.000 rpm con 60 ml de agua destilada hasta una completa homogeneización.

Se preparó una solución de pepsina a partir de 4 g de pepsina (Sigma-Aldrich) a la que se añadieron 25 ml de agua destilada y se llevó a agitación.

La solución de pancreatina se preparó con 0,42 g de NaHCO_3 , junto a 1,25 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) y 0,2 g de pancreatina (Sigma-Aldrich), mezcla que se disolvió en 50 ml de agua destilada, con agitación.

Se pesaron 8 g de brotes de brócoli frescos, a los que se añadió 40 mL de tampón de tampón fosfato 20 nM, 10 nM HCl (pH 6.9). Se incubaron en un baño

termostatzado con agitación a 37 °C durante 10 minutos. Se midió el pH de la muestra, se añadió 6 mL de la solución de pepsina y se midió de nuevo el pH, ajustando con HCl 0.6 N hasta pH = 2. Se realizó la digestión ácida durante 2 h, a 37 °C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó cada media hora el mantenimiento del pH en 2.

En segundo lugar, a una alícuota (alícuota I) de la muestra (\pm 20 ml) se le añadió 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina, y se valoró con NaOH hasta pH 7. Otra alícuota (alícuota II), de \pm 20 ml, permaneció en un baño de hielo con la digestión ácida detenida.

En tercer lugar, la alícuota II se sometió a una segunda digestión y a diálisis, a 37 °C, durante 2 h en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introdujo una membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) tubular sellada, con un volumen de 10 ml de una solución preparada con una cantidad de NaHCO₃ equivalente a la acidez valorada en la alícuota I y diluida hasta 25 ml con agua destilada. Media hora después, se añadieron los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recogió el dializado, se filtró a través de un filtro de membrana Millex-HV₁₃ 0,45 μ m (Millipore, EE.UU.) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. En la Figura 10 se expone un esquema del procedimiento llevado a cabo.

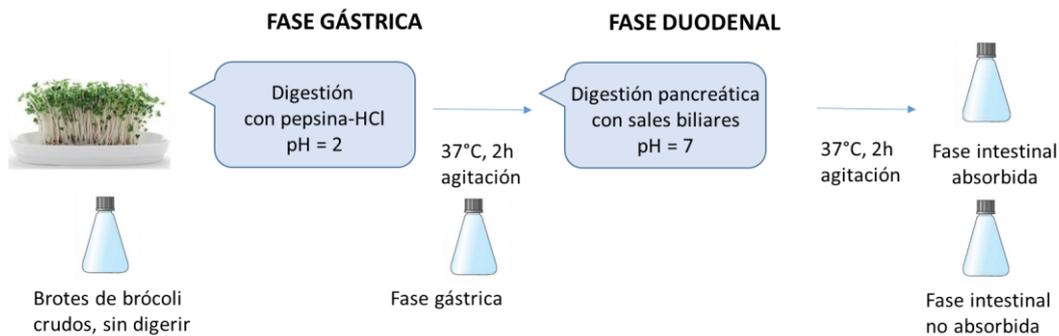


Figura 10. Fases de la digestión in vitro de los brotes de brócoli

Se evaluó la actividad antioxidante in vitro, así como la actividad inhibitoria enzimática en el proceso de digestión. Se tomaron muestras de los brotes homogeneizados (8 g en 40 mL tampón) antes de la digestión, así como tras la fase gástrica. Posteriormente, tras la digestión, se tomaron muestras de la fase digerida, dializada a través de la membrana, que correspondería a la "parte absorbida" y de la porción no absorbida. Cada muestra fue centrifugada y se recogió el sobrenadante, que se congeló a -80°C para realizar las determinaciones.

4.4 EVALUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS BROTOS DE BRÓCOLI

Para los objetivos planteados se emplearon 2 ensayos, un ensayo enfocado a evaluar la capacidad de captar radicales libres por antioxidantes, el método del DPPH¹³⁸, y el método ORAC basado en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno¹³⁹.

En estos métodos se realizaron rectas de calibrado con el estándar de Trolox (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), un derivado soluble de la vitamina E, por lo que

la actividad antioxidante fue expresada como la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (ET) en mmoles de equivalentes de Trolox/100 g peso fresco. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.4.1 Método DPPH

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) es un radical libre comercialmente disponible, insoluble en agua. Se puede utilizar para comprobar la capacidad de captación de radicales libres de moléculas lipofílicas en medios no acuosos¹⁴⁰. El método evalúa la capacidad de la molécula problema para reducir el radical libre DPPH• (disuelto en metanol), midiendo la absorbancia a 515 nm, la cual disminuye paulatinamente al aparecer el radical reducido en el medio, que pasa de color violeta a color amarillo^{141,142}.

La reacción consiste en la sustracción de un electrón del antioxidante y puede ser resumida como:



El nuevo radical formado (A•) puede seguir principalmente interaccionando radical-radical para originar moléculas estables A-A o DPPH-A.

El ensayo se realizó con microplacas Synergy HT multi-detec microplate reader de Biotek Instruments, Inc (Winooski, VT, EE.UU.), de 96 pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo transparente de Nalge Nunc International (Roskilde, Dinamarca), en un lector de microplacas, Infinite M200 (Tecan, Grödig, Austria).

La medida del blanco se realizó con metanol. En el pocillo de una placa se añadió 250 µL de la solución diluida del radical DPPH•, y se realizó la primera lectura de absorbancia, absorbancia inicial (A_i). En este momento se adicionaron

2µl de muestra y se observó la variación de absorbancia durante 50 min, realizando lecturas a intervalos de 1 min. El dato de absorbancia más bajo reflejado durante este periodo de tiempo es tomado como absorbancia final (A_f).

Las diferencias de absorbancia obtenidas se interpolan en la recta de calibrado de Trolox realizada con 8 concentraciones diferentes de Trolox, resultando una ecuación del tipo:

$$y = 1,427x + 0,04 \quad (r^2 = 0,9959)$$

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar (STD), en mmoles de equivalentes de Trolox/100 g peso fresco.

4.4.2 Ensayo ORAC

El ensayo ORAC es el único que combina en un solo valor el tiempo y la velocidad de inhibición del daño oxidativo y nos da una orientación sobre la capacidad antioxidante de los brotes de brócoli en el organismo. El ensayo fue realizado de acuerdo con Ou y col ¹⁴³. El ensayo consiste en la degradación oxidativa de la fluoresceína al ser atacada por el radical AAPH (Radical 2, 2-azobis-[2-metilpropionamida] dihidrocloruro). La caída de la fluorescencia de la proteína oxidada se monitoriza en el tiempo. En presencia de antioxidantes, la proteína no es oxidada y por tanto se evita o retrasa esa caída en la fluorescencia.

La fluoresceína se diluyó en un tampón fosfato 75mM (pH=7,4) hasta una concentración final de 6 nM (c. f.) y se conservó a 20 °C. El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 nM en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4. Las muestras se diluyeron 1/20 en tampón fosfato. La concentración de la disolución stock de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) utilizada para la elaboración de la recta patrón fue de 0,25 mM y se

preparó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7,4. La reacción se llevó a cabo en este tampón fosfato, en un volumen final de 200 μ l.

Las medidas de capacidad antioxidante por el método ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de microplacas Synergy HT multi-detec microplate reader de Biotek Instruments, Inc (Winooski, VT, USA), utilizando placas de 96 pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo transparente de Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark). La fluorescencia de las muestras se leyó por el fondo claro de la placa, usando una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de inhibición de la desaparición de FL, se cuantificó mediante la integración del área bajo la curva de caída de la FL (Area Under the Curve, AUC) ^{144,145}, comparando las caídas producidas por las muestras de plasma con las caídas producidas por una curva estándar de Trolox (Figura 11).

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar (STD), en mmoles de equivalentes de Trolox/100 g peso fresco.

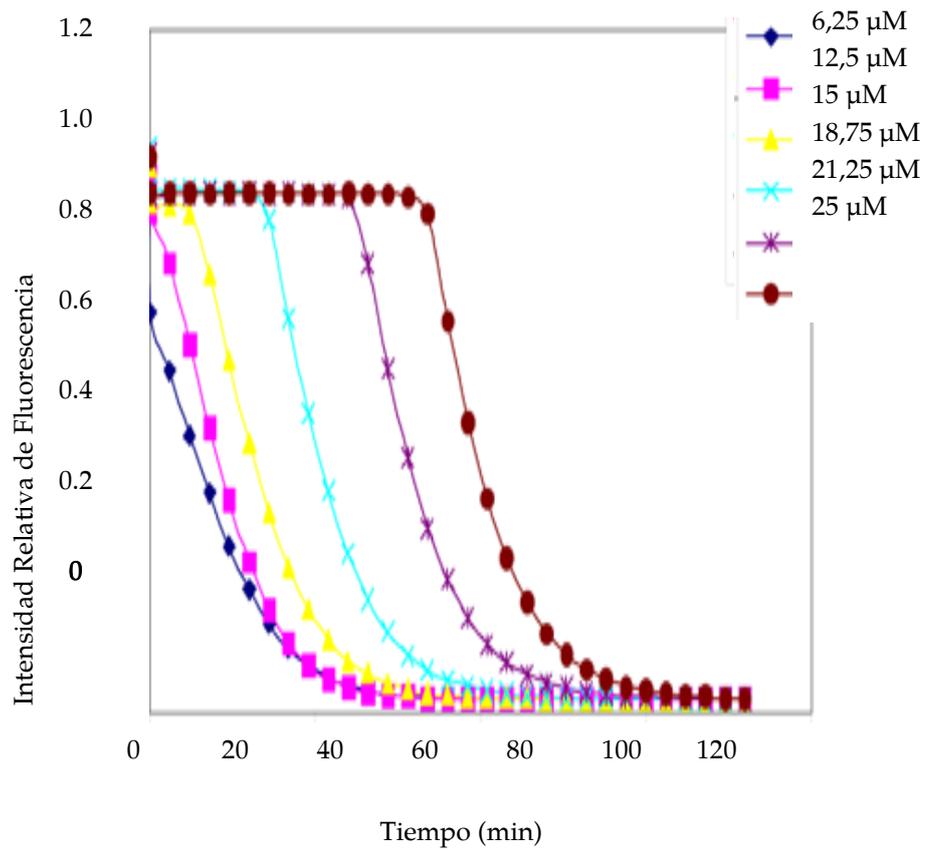


Figura 11. Curva de caída de FL inducida por APPH en presencia de concentraciones crecientes de Trolox

4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA ENZIMÁTICA IN VITRO DE LOS BROTES DE BRÓCOLI

4.5.1 Inhibición de la actividad lipasa enzimática

La lipasa pancreática hidroliza los ésteres de cadena larga de los ácidos grasos a partir de sus triglicéridos. El método descrito se basa en una reacción colorimétrica en la que el sustrato, el 1,2-diglicérido es hidrolizado a 2-monoglicérido y ácido graso. El 2-monoglicérido se determina mediante una serie de reacciones enzimáticas que dan lugar a un producto quinona-diimina coloreado. Cuanto mayor es la actividad inhibitoria de la muestra, menos producto se forma y menor será el aumento de la absorbancia a 550 nm.

La actividad lipasa se ha determinado siguiendo el protocolo de Gironés-Vilaplana et al.¹⁴⁶, para placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), en un lector de placas Infinite M200 (Tecan, Grödig, Austria). En cada pocillo se añaden alícuotas (3.75 μ L) de estándar de lipasa y las muestras (sin diluir). Posteriormente se adicionan 225 μ L de la solución sustrato (1,2-diglicérido), se mezcla bien y se incuba durante 5 minutos a 37 °C. Se emplea agua como blanco. Posteriormente se añade el agente activador (75 μ L) y se mezcla y las muestras se incuban de nuevo durante 3 minutos a 37 °C. Se mide el aumento de la absorbancia a 550 nm, comparándola con la del estándar. Este aumento es inversamente proporcional a la actividad inhibitoria de la lipasa en las muestras.

4.5.2 Inhibición de la actividad α -glucosidasa enzimática

La inhibición de la α -glucosidasa, enzima clave que cataliza el paso final en el proceso digestivo de los hidratos de carbono, puede retrasar la hidrólisis de los oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos, disminuyendo la absorción de glucosa y por consiguiente reduciendo la hiperglucemia postprandial.

Se ha determinado la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa empleando un método adaptado a microescala, en placas de 96 pocillos ¹⁴⁷. Se emplea como sustrato 4-nitrofenil-- α -D-glucopiranosido 2 mM, preparado en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7. Se seleccionaron 5 diluciones de las muestras de brócoli (sin diluir, diluciones seriadas hasta 1/16 en tampón fosfato potásico). El enzima se reconstituye (1.35 mg) en 1 mL de tampón fosfato. Se toman 40 μ L y se diluyen en 10 mL de tampón fosfato.

En cada pocillo, se añade: 100 μ L de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido 2 mM + 20 μ L de dilución + 100 μ L enzima. Se mide la absorbancia inicial a 405 nm, se incuba durante 10 minutos a 37°C y se mide la absorbancia final. Esta absorbancia es debida al 4-nitrofenol, liberado a partir del sustrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, por acción hidrolítica del enzima. A mayor actividad inhibitoria de la muestra, menos producto de hidrólisis se libera. Se compara así el aumento de la absorbancia producida por la muestra, con el producido por el control (tampón en vez de muestra), para calcular la actividad inhibitoria, expresada como % inhibición.

4.6 ESTUDIO CLÍNICO SOBRE POBLACIÓN CON SOBREPESO

Se realizó un ensayo clínico nutricional, prospectivo, con el fin de evaluar los efectos del consumo diario de brotes de brócoli durante un periodo de 10 semanas en una muestra de población con sobrepeso.

4.6.1 Reclutamiento y selección de voluntarios

El reclutamiento de los voluntarios se realizó en la Universidad Católica de Murcia (UCAM). Tras la revisión de sus historias clínicas se identificaron los posibles participantes, que fueron citados para una visita de cribaje en la que se comprobó que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

Criterios de inclusión

- Edad: Entre 35-55 años
- Sin enfermedad cardiovascular diagnosticada (cardiopatía isquémica-angina de pecho o infarto de miocardio reciente o antiguo, accidente cerebro-vascular, vasculopatía periférica).
- Sobrepeso: clasificado según la Organización Mundial de la Salud en IMC entre 24,9-29,9 kg/m².
- No fumadores.
- Sin consumir suplementos vitamínicos o medicamentos durante los dos meses previos al estudio.

Criterios de exclusión

- Historia previa de enfermedad cardiovascular o cualquier enfermedad crónica grave.
- Fumadores.
- Con alteraciones en el perfil lipídico.
- Hipertensos.
- Con adicción a drogas y alcohol.
- Seguidores de dietas vegetarianas
- Alergias e intolerancias a alimentos o derivados del género *Brassica*.
- Embarazo y lactancia materna.

A los sujetos candidatos se les explicó el estudio y firmaron el consentimiento informado (Anexo I). Además, se registraron los hábitos dietéticos y el estilo de vida de todos los participantes mediante encuestas (Anexo II).

Dicho estudio se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki de Estudios Humanos y fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Católica de Murcia y el Subcomité de Bioética del Departamento del CSIC para el AGL-2013-Proyecto 46247-P (Anexo III). El estudio está registrado en ClinicalTrials.gov con el código NCT 03390855.

4.6.2 Diseño del Estudio de intervención

El estudio estaba dividido en dos fases (Figura 12), una fase de intervención, con la ingesta de brócoli, llamada “Fase de Brócoli” y una fase posterior de seguimiento, de dieta libre de alimentos de crucíferas llamada “Fase de Seguimiento”. A los voluntarios se les solicitó que durante la semana previa al comienzo del estudio evitaran la ingesta de vegetales del género *Brassica* (brócoli, rábano, coliflor, coles de Bruselas y mostaza, entre otros) y sus productos derivados, para conseguir, el día de inicio del estudio, unas concentraciones plasmáticas bajas de glucosinolatos e isotiocianatos, compuestos característicos de estos vegetales (*wash-out*). A los participantes se les recomendó que siguieran una dieta mediterránea tradicional, baja en colesterol y grasas saturadas, sin otra restricción alimentaria. Estas instrucciones dietéticas se mantuvieron durante todo el periodo de estudio. Además, en los días previos al inicio del estudio se pasó a cada participante unas encuestas con el fin de valorar el riesgo cardiovascular, el seguimiento de la Dieta Mediterránea y los hábitos alimentarios (Anexo II).

Por otro lado, a todos los voluntarios se les solicitó que anotaran cualquier signo de enfermedad, consumo de medicamentos y cualquier desviación de la dieta habitual. Se comprobó posteriormente que los voluntarios mantuvieron sus estilos de vida habituales durante todo el estudio.



Figura 12. Fases del estudio

La primera fase consistió en un periodo de 10 semanas con una ingesta diaria de 30 g de brotes de brócoli crudos y frescos contenidos en bandejas. Esta cantidad supone la mitad de una porción diaria, según la FDA (2001)¹⁴⁸. Para ello los participantes fueron citados semanalmente para proporcionarles las 7 bandejas de brotes de brócoli para toda la semana, y se les indicó que debían ingerir una bandeja por día y mantenerlas refrigeradas (4°C) en casa.

El consumo de los brotes fue incluido en su dieta diaria, siempre acompañando en las comidas y nunca cocinados, ya que los procedimientos de cocción pueden afectar al contenido de glucosinolatos, así como a su biodisponibilidad ^{149,150} y, por lo tanto, se les facilitaron algunas recetas para que la composición y absorción de los brotes de brócoli no se viera afectada. Algunas opciones para su elaboración, fue incluir los brotes en ensaladas de verduras, ensaladas de pasta fría, en sándwiches fríos con algunas combinaciones como: queso, jamón, tomate, lechuga o combinaciones con cerdo y verduras a la parrilla (en estos casos los brotes se agregan después de la parrilla una vez que el ingrediente estaba templado).

Después del periodo de intervención, tuvo lugar un periodo de lavado de 20 días de duración, y a continuación la “Fase de Seguimiento”, donde los sujetos continuaron con su dieta habitual durante 70 días sin ingerir brotes de brócoli ni derivados.

En ambas fases se recogieron muestras de orina de 24 horas y muestras de sangre (Tabla 6), en los días inicial (T0) y al final de la intervención con el brócoli (T70), así como en el momento de inicio de la fase de seguimiento, (que corresponde a T90) y día final de esta fase (que corresponde a T160).

Tabla 6. Distribución de las muestras tomadas en los distintos tiempos

TIEMPO (DÍAS)	MUESTRAS	INGESTA DIARIA
T0	ORINA DÍA SANGRE	≈ 30 g BRÓCOLI
T70	ORINA 24 h. SANGRE	≈ 30 g BRÓCOLI
T90	ORINA 24 h. SANGRE	NO BRÓCOLI
T160	ORINA 24 h. SANGRE	NO BRÓCOLI

Las muestras de sangre de cada sujeto se tomaron por venopunción de la vena antecubital, 3ml, en tubos de heparina y fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min a 4° C; el plasma fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta el análisis. Dicho análisis fue realizado una vez finalizado cada periodo y en el mismo lote para minimizar así las variaciones analíticas. La orina también fue alicuotada y congelada a -80°C para un análisis más extenso. En las muestras de orina de 24 h se analizaron las concentraciones de los principales componentes funcionales de los brotes de brócoli y sus metabolitos.

4.6.3 Tamaño muestral

El tamaño muestral inicial del estudio fue de 43 personas. Ningún sujeto abandonó el estudio debido a la presentación de efectos adversos durante la intervención, aunque sí abandonaron 3 voluntarios por falta de compromiso, quedando así una muestra final de 40 voluntarios, de los cuales 19 eran mujeres y 21 eran hombres.

4.6.4 Perfil antropométrico

Determinamos la altura y el peso en cada una de las visitas, para calcular el Índice de Masa Corporal (IMC) como $(\text{peso (kg)} / [\text{altura (m)}]^2)$. También se determinó el porcentaje de masa corporal. Para ello se utilizó un monitor de composición corporal Tanita®, basado en la bioimpedancia.

Estas medidas fueron llevadas a cabo en una sala especialmente habilitada para ello; con el fin de asegurar una mayor uniformidad en las medidas y minimizar así el error conocido como error debido al observador, todas ellas fueron tomadas por la misma persona.

4.6.5 Parámetros bioquímicos

Se determinaron variables relacionadas con el perfil lipídico, como se indica en los siguientes apartados.

4.6.5.1 Colesterol total

El colesterol total fue determinado en la plataforma analítica ADVIA 2400, en el laboratorio del Hospital Quirón de Murcia. Se analiza mediante un método enzimático por el que los ésteres de colesterol se hidrolizan por la acción de la enzima colesterol esterasa a colesterol y se liberan ácidos grasos. El colesterol se convierte en colest-4-en-3-ona por la acción de la enzima colesterol oxidasa en presencia de oxígeno formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se forma un complejo coloreado a partir del H_2O_2 , 4-aminoantipirina y fenol bajo la acción catalítica de la peroxidasa. La absorbancia del complejo se mide a 505/694 nm como reacción a punto final siendo la concentración de colesterol directamente proporcional a la absorbancia.

4.6.5.2 Colesterol de lipoproteína de alta densidad (c-HDL)

El c-HDL fue cuantificado en la plataforma analítica ADVIA 2400, en el laboratorio del Hospital Quirón de Murcia. Es un método cinético de dos puntos

que tiene lugar en una primera etapa donde se produce la eliminación de quilomicrones, c-VLDL y c-LDL mediante las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa. El H_2O_2 producido por la oxidasa se elimina por la acción de la catalasa. En la segunda etapa del método se mide el c-HDL de manera específica. La catalasa de la primera etapa es inhibida por la acción de un azida sódica. Mediante la acción de una peroxidasa y por medio de la reacción de Trinder se produce colorante quinoneimina. La intensidad de este colorante es directamente proporcional a la concentración de c-HDL y se determina a 596 nm.

4.6.5.3 Colesterol de lipoproteína de baja densidad (c-LDL)

El c-LDL no se midió directamente, sino que se calculó mediante la ecuación de Friedewald, tal y como se muestra en la ecuación. Cuando la concentración de triglicéridos en suero excede de 200 mg/dL, la exactitud del cálculo de la ecuación se vuelve inadecuada y no debe ser utilizada:

$$\text{c-LDL} = \text{CT} - (\text{c-HDL} + \text{TG}/5)$$

4.6.5.4 Triglicéridos

Los triglicéridos fueron medidos en el autoanalizador ADVIA 2400, en el laboratorio del Hospital Quirón de Murcia. El método de cuantificación de triglicéridos en suero se basa en la reacción enzimática en tres pasos de Fossati con un punto final de Trinder. El procedimiento de un sólo reactivo cuantifica los triglicéridos totales, incluidos monoglicéridos, diglicéridos y fracciones de glicerol libre. Los triglicéridos se transforman en glicerol y ácidos grasos libres por acción de la enzima lipasa. A continuación, el glicerol se transforma primero en glicerol-3-fosfato por acción de la enzima glicerol quinasa y después en H_2O_2 por acción de la glicerol-3-fosfato oxidasa. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa se forma un complejo coloreado a partir de H_2O_2 , 4-aminofenazona y 4-clorofenol. La absorbancia del complejo se mide a 505/594 nm como reacción de punto final siendo la concentración de triglicéridos directamente proporcional a la absorbancia.

4.6.6 Marcadores de inflamación

Se ha determinado los niveles de proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral TNF- α , IL-1 β e IL-6 como biomarcadores de inflamación.

4.6.6.1 Proteína C Reactiva (CRP)

La proteína C reactiva (CRP) se midió con el lector de ichromaTM®, un escáner fluorescente portátil que analiza las muestras de plasma y muestra los resultados de la medición en la pantalla.

El kit incluye unas tarjetas de prueba que contienen un anticuerpo monoclonal anti-ratón y la IgG de conejo inmovilizada. El tampón del detector contiene anticuerpos fluorescentes anti-CRP e IgG de conejo. Los tubos capilares de recolección se utilizan para recoger la muestra de plasma (10 μ L).

La prueba se basa en un método de inmuno-detección en sándwich; el anticuerpo detector en tampón se une al antígeno de la muestra, formando complejos antígeno-anticuerpo. Cuantos más antígenos (más proteína C-reativa) haya en la muestra, mayor será el complejo antígeno-anticuerpo y la señal de fluorescencia será más intensa en el anticuerpo detector, valor que se procesa para mostrar la concentración de CRP en la muestra. El instrumento muestra la concentración de CRP de la muestra en términos de mg/L. El valor de corte es de 10 mg/L y el rango de trabajo de 2,5 - 3,00 mg/L.

4.6.6.2 Citoquinas proinflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), IL-1 β e Interleuquina 6 (IL-6)

Los marcadores de inflamación, IL-6, IL-1 β y TNF- α fueron medidos con kits ELISA de alta sensibilidad proporcionados por IBL International®. Para obtener un rendimiento óptimo de la prueba, se siguió el procedimiento manual exacto del kit en cuanto a los pasos de lavado, la cronología y la preparación de

las soluciones y el tiempo de incubación. Se midieron los valores de absorbancia de cada conjunto de estándares y muestras duplicadas.

El principio de estas pruebas es que un anticuerpo de recubrimiento anti-IL-6, IL-1 β o TNF- α es adsorbido en la superficie de los pozos. La interleucina humana presente en la muestra se une al anticuerpo. Se añade otro anticuerpo anti IL-6 conjugado con biotina (o IL-1 β o TNF- α) y se une a la interleucina capturada por el primer anticuerpo (Figura 13).

Se añade una peroxidasa unida a un sustrato (Streptavidin-HRP) y se une al anticuerpo anti-interleucina conjugado con biotina. Después, se añaden reactivos de amplificación a los pocillos, para aumentar la señal obtenida. Cada paso de la adición es seguido por la incubación y pasos de lavado para eliminar el reactivo no ligado. El producto coloreado se forma en proporción a la cantidad de IL-6 (o IL-1 β o TNF- α) presente en la muestra. La reacción termina con la adición de una solución de ácido de parada y la absorbancia se mide a 450 nm.

Se ha preparado una curva estándar trazando la absorbancia media para cada concentración estándar en la ordenada, frente a la concentración de IL-6 humana en la abscisa. Se dibujó un ajuste de la curva de cinco parámetros y los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en la curva estándar para determinar la concentración de IL-6 humana circulante (o TNF- α) para cada muestra. Todas las mediciones de las muestras y los controles se hicieron por duplicado.

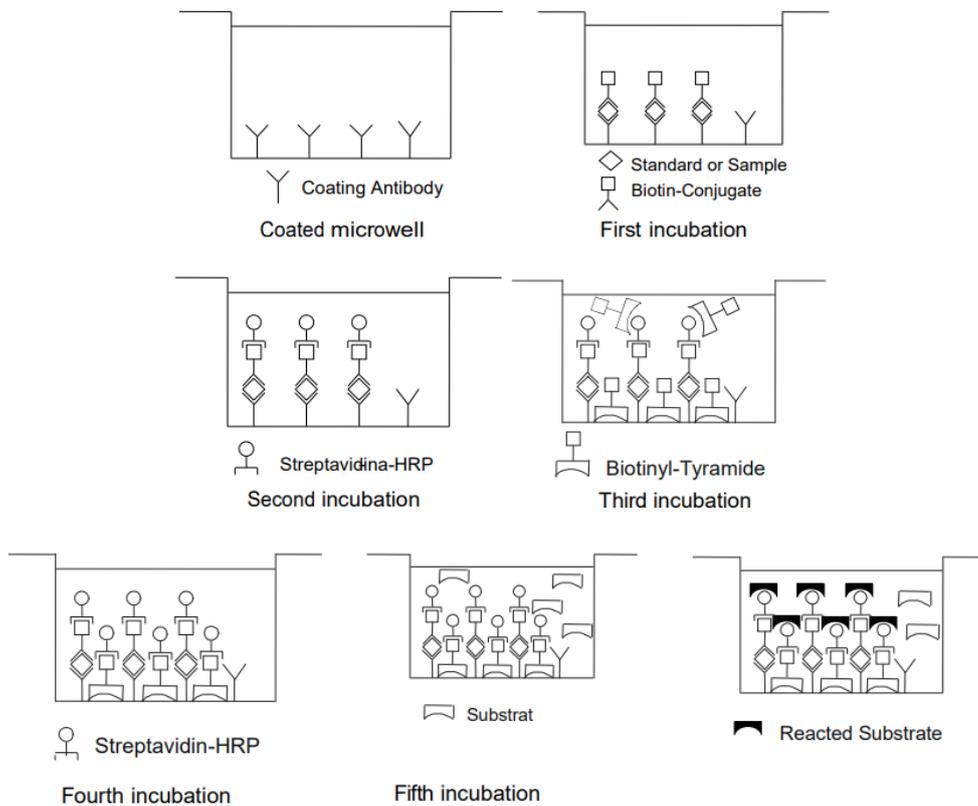


Figura 13. Esquema simplificado del principio del test ELISA alta sensibilidad utilizado (basado en los protocolos de IBL International)

4.6.7 Biodisponibilidad de los glucosinolatos y sus metabolitos

4.6.7.1 Determinación de glucosinolatos y sus metabolitos en orina

Se determinaron los niveles en orina de los glucosinolatos (glucorafanina, iberina) isotiocianatos (sulforafano y sus metabolitos derivados del glutatión), indol-3-carbinol (I3C) y su metabolito 3,3-Diindolilmetano (DIM) mediante UHPLC-QqQ-MS/MS¹⁵¹.

Los estándares de sulforafano, sulforafano-glutation, sulforafano-cisteína y sulforafano-N-acetilcisteína (SFN, SFN-GSH, SFN-CYS, SFN-NAC, respectivamente) e Iberina (IB), Indol-3-carbinol (I3C) y 3,3-Diindolilmetano (3,3-DIM), se adquirieron de SantaCruz Biotech (CA, USA). La Glucorafanina (GRA) se obtuvo de Phytoplan (Diehm & Neuberger GmbH, Heidelberg, Alemania). Todos los disolventes de grado LC-MS fueron adquiridos a J. T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, USA).

Las muestras de orina y plasma fueron extraídas utilizando cartuchos SPE Strata-X (33 μ m de polímero catión fuerte) siguiendo las instrucciones del fabricante (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Los cartuchos fueron acondicionados previamente con 2 mL de metanol y equilibrados con 2 mL de agua:ácido fórmico (98:2, v/v). Las muestras (400 μ L) se diluyeron con 2 mL de agua:ácido fórmico (98:2, v/v) y cargadas en la columna, siendo posteriormente lavadas con 2 mL de agua: ácido fórmico (98:2, v/v). La elución de los metabolitos objetivo, se realizó con un 1 mL de metanol/ácido fórmico (98:2, v/v). Las muestras se secaron utilizando SpeedVac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Los residuos secos obtenidos fueron reconstruidos en 200 μ L de una mezcla de las fases móviles A/B (90:10, v/v) y filtrados con filtros de PTFE de 0,22 μ m, antes de medirlos por UHPLC-QqQ-MS/MS (Figura 14).

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna ZORBAX Eclipse Plus C-18 (2,1 x 50mm, 1,8 μ m de tamaño de partícula) (Agilent Technologies), y las fases móviles empleadas fueron: fase A: acetato de amonio, 13mM (ácido acético, pH 4); y fase B: acetonitrilo/ácido acético (99,9:0,1, v/v) como se ha descrito previamente¹³⁶. Se analizó un volumen de 20 μ L de cada muestra en un UHPLC-1290 Agilent Technologies Series acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 6460 QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Los compuestos se identificaron y cuantificaron utilizando transiciones MRM y modo ESI positivo o negativo para la confirmación de los analitos objetivo, en comparación con los estándares externos disponibles¹⁵¹. Las curvas de calibrado se han preparado diariamente.

La adquisición de datos se realizó utilizando la versión de software MassHunter B.04.00 (Agilent). Las concentraciones urinarias de cada compuesto se calcularon a partir de la relación de área entre los picos iónicos de los compuestos y los de los estándares correspondientes. Se registró el volumen total de la orina de 24h y se calcularon las concentraciones absolutas de los compuestos y los metabolitos excretados durante el periodo de estudio.



Figura 14. Equipo empleado. UHPLC-1290 Agilent Technologies Series acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 6460 QqQ-MS/MS. (CEBAS-CSIC)

4.6.7.2 *Determinación de Creatinina en orina*

Los niveles de creatinina se determinaron en las orinas de 24 h para normalizar las concentraciones de metabolitos como compuesto nmol/mg de creatinina y así controlar las diferencias en el volumen de orina excretado por cada voluntario.

La determinación se realizó en el Servicio de Análisis Clínico del Hospital Quirón de Murcia. La creatinina fue cuantificada en el analizador automatizado ADVIA 2400. La creatinina presente en la muestra reacciona con ácido pícrico en un medio alcalino para producir un complejo creatinina-picrato de color rojo. La velocidad de formación del complejo se mide a 505 y a 571 nm y es proporcional a la concentración de creatinina. El método de determinación es una modificación del método de Jaffé con determinación de la velocidad del blanco y corrección de la intersección. La determinación de la velocidad del blanco se utiliza para reducir al mínimo las interferencias por presencia de bilirrubina.

4.6.8 Valoración del seguimiento de la dieta mediterránea

Se realizó a los voluntarios una encuesta validada y diseñada previamente por el Grado de Farmacia de la UCAM, cuyo objetivo fue valorar el seguimiento de la dieta mediterránea de los voluntarios.

Las preguntas se basaban en una escala de 4 puntos Likert, desde diariamente hasta nunca, en las que se incluía 15 preguntas: frecuencia de consumo de cereales (pasta, arroz, cereales de desayuno, productos de bollería), frutas, verduras, legumbres, pescado (especificando si azul o blanco), diferentes tipos de carne, lácteos, tipo de aceite, consumo de aceite de oliva y huevos. La adherencia a la dieta mediterránea se calculó basada en un algoritmo matemático.

Esta encuesta se realizó antes de iniciar el ensayo clínico. Para crear una puntuación acerca de la adherencia a la dieta mediterránea por parte de nuestros voluntarios, se procedió a dar una puntuación de 1 a las siguientes preguntas:

Pregunta 1. Consumo de cereales ≥ 5 porciones/día

Pregunta 2. Consumo de frutas ≥ 3 porciones/día

Pregunta 3. El consumo de legumbres ≥ 2 raciones/semana

Pregunta 4. Consumo de verduras ≥ 2 ración/ día

Pregunta 5. El consumo de pescado ≥ 3 raciones/semana

Pregunta 6. Consumo de carne de aves 1-4 raciones/semana

Pregunta 7. Consumo de carne roja 1-4 raciones/semana

Pregunta 8. Consumo de derivados lácteos 3-4 porciones/día

Pregunta 9. Consumo de diferentes aceites, preferiblemente el de oliva

Pregunta 10. Uso de aceite de oliva para cocinar. Uso diario

Pregunta 11. Consumo de frutos secos > 1 ración/semana

Pregunta 12. Consumo de bollería < 1 ración/semana

Pregunta 13. Consumo de huevos 1- 7 huevos/semana

Pregunta 14. Consumo de embutido < 2 raciones/semana

Pregunta 15. Consumo de vino tinto > 1 vaso/semana

La puntuación total se multiplicó por diez y se dividió entre 15, para obtener una puntuación sobre 10. El valor resultante representa la adherencia a la Dieta Mediterránea de la siguiente manera (Tabla 7).

Tabla 7. Puntuación según la adherencia a la Dieta Mediterránea

PUNTUACIÓN	ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA	OBSERVACIONES
< 5	Mala	Requiere mejorar los hábitos alimenticios
5-7	Media	Mejorar con pequeñas modificaciones
>7	Buena	

4.6.9 Análisis Estadístico

Todas las variables de este estudio fueron registradas en una base de datos creada con el programa Microsoft Office Excel[®] versión 2010 y diseñada expresamente para este trabajo. El programa informático utilizado para realizar el análisis gráfico y estadístico fue el IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos).

El análisis estadístico realizado constó de una parte descriptiva y otra inferencial.

4.6.9.1 *Análisis descriptivo*

Las variables continuas que seguían una distribución normal están descritas con medias y desviaciones estándar, mientras que las variables cualitativas se resumieron con proporciones (porcentajes). La media y el rango intercuartílico se emplearon como descriptores para los metabolitos urinarios ya que no seguían una distribución normal.

4.6.9.2 *Análisis inferencial*

Se evaluó el cambio relativo de las variables continuas (peso, IMC, grasa corporal, IL-6, PCR, metabolito 3,3-DIM), entre los diferentes periodos del estudio (antes y después de la ingesta de brotes de brócoli) utilizando modelos de regresión lineal. Se llevaron a cabo modelos adicionales que tenían en cuenta la edad y el sexo, con el fin de evaluar si ambas variables podían alterar la respuesta observada (variables confundentes).

En el caso del estudio de biodisponibilidad, comparamos la proporción de muestras en las que se detectaron los metabolitos de la vía del sulforafano (SFN-SFN-CYS, SFN-NAC) en los diferentes tiempos del estudio.

En el caso de los metabolitos que no seguían una distribución normal, se llevaron a cabo estudios no-paramétricos. Para evaluar las diferencias significativas en las concentraciones en orina de cada metabolito respecto al punto inicial, se llevó a cabo un análisis de Friedman, que es el equivalente no paramétrico del ANOVA de medidas repetidas, empleando como análisis pos-hoc la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, en el que cada individuo era su propio control.

Se realizó una comparación entre hombres y mujeres de los metabolitos eliminados, mediante el test de Mann-Whitney. Las diferencias significativas se establecieron con $p < 0.05$. Este análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS (version 24.0).

Y por último estudiamos la posible asociación existente entre los cambios observados en la grasa corporal, IL-6 y proteína C-reactiva y los cambios en los metabolitos 3,3-DIM, SFN-NAC, SFN-CYS y SFN, usando modelos de regresión lineal. El análisis de regresión lineal se realizó utilizando el paquete software R (versión 3.4.1.).

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LOS BROTES DE BRÓCOLI

Los brotes de brócoli elicitados con metil-jasmonato, descrito previamente, fueron caracterizados en su contenido en compuestos bioactivos, semanalmente, durante 10 semanas de realización del estudio de intervención. El análisis cuantitativo de los compuestos polifenólicos se llevó a cabo por HPLC/DAD y la identificación se realizó de acuerdo a los espectros UV y el orden de elución, ya descrito, para las condiciones de adquisición similares¹⁵².

En la Tabla 8 se detalla su contenido promedio en glucosinolatos (GLS). También se determinó el contenido en vitamina C, por HPLC-DAD, empleando la metodología indicada en el apartado Material y Métodos. Los análisis semanales mostraron una variación mínima, menos del 5% para el total, así como dentro de cada grupo de glucosinolatos, debido a que la producción se realizó a escala semiindustrial, muy controlada por el fabricante, y no en el laboratorio.

Los resultados son representados en función de la porción diaria de brotes de brócoli consumida por los voluntarios. Los glucosinolatos son los compuestos fitoquímicos que diferencian a las crucíferas del resto de hortalizas, y particularmente en los brotes de brócoli los principales glucosinolatos detectados son, dentro de los glucosinolatos alifáticos, la glucorafanina (GRA, 4-metil-sulfinibutil); y en los glucosinolatos indólicos, la neoglucobrassicina (NGB, 1-metoxi-3-indolimetil). La concentración total de los glucosinolatos alifáticos fue de 80,50 mg/30g peso fresco cuyo equivalente son 6,22 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco o 65,47 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco (Tabla 8). Esta concentración fue dos veces superior a la encontrada en los glucosinolatos indólicos, donde su concentración total fue de 40,62 mg/30g peso fresco equivalente a 2,88 $\mu\text{mol/g}$ en peso fresco y 30,32 $\mu\text{mol/g}$

en peso seco. La tabla incluye la composición nutricional de los brotes y el contenido medio de vitamina C (5,45 mg/30 g peso fresco).

Tabla 8. Contenido de glucosinolatos y composición nutricional en porciones diarias (en 30 g peso fresco)

	Media \pm desviación estándar (n=3)
<i>Energía (Kcal)</i>	6,30 \pm 0,32
<i>Proteínas (g)</i>	0,86 \pm 0,04
<i>Grasa total (g)</i>	0,13 \pm 0,01
<i>Carbohidratos (g)</i>	0,09 \pm 0,01
<i>Fibra (g)</i>	0,74 \pm 0,04
<i>Vitamina C (g)</i>	5,45 \pm 0,27
<i>Glucobrassicina (mg)</i>	19,28 \pm 0,98
<i>Glucorafanina (mg)</i>	51,08 \pm 1,06
<i>4-Hydroxiglucobrassicina (mg)</i>	3,67 \pm 0,41
<i>Glucoerucina (mg)</i>	10,14 \pm 1,20
<i>Glucobrassicina (mg)</i>	9,69 \pm 0,95
<i>4-Metoxiglucobrassicina (mg)</i>	7,14 \pm 0,61
<i>Neoglucobrassicina (mg)</i>	20,11 \pm 1,66
<i>Glucosinolatos alifáticos (Σ) (mg)</i>	80,50 \pm 2,18
<i>Glucosinolatos indólicos (Σ) (mg)</i>	40,62 \pm 2,07
<i>Total (Σ) (mg)</i>	121,11 \pm 4,00

Por tanto, los voluntarios ingirieron una concentración media de 51 mg de glucorafanina equivalente a 117 μ mol/g, y 20 mg de neoglucobrassicina equivalente a 42 μ mol/g, de forma diaria durante los 70 días de la intervención dietética del estudio.

La composición nutricional, los análisis microbiológicos de los brotes de brócoli, y el análisis de la presencia o ausencia de contaminantes (materiales

pesados, fitosanitarios, etc.) se han realizado con ayuda de una empresa del sector, acreditada en los análisis de seguridad alimentaria (Laboratorio ECOSUR), con el fin de garantizar la inocuidad de los brotes de brócoli para los ensayos clínicos. Como puede observarse en el Anexo IV, los brotes son totalmente seguros para su consumo.

5.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO Y CONTENIDO DE VITAMINA C DE LOS BROTES DE BRÓCOLI

La actividad antioxidante se midió por dos métodos. Por el método DPPH (de captación de radicales libres del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y por el método ORAC (donde se analiza la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno). En ambos métodos se realizaron rectas con el estándar del antioxidante hidrosoluble derivado de la vitamina E, Trolox, y se expresaron los resultados de la capacidad antioxidante como mmoles de equivalentes de Trolox en 100 g de peso fresco de brotes. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La actividad antioxidante aumenta más del doble durante la fase gástrica, con ambos métodos, posiblemente debido a la liberación de compuestos activos con pH ácido y a la actividad de la pepsina. Se mantiene en la fase intestinal y disminuye en la porción absorbida (Tabla 9). El método ORAC es más sensible a los cambios en actividad antioxidante que el DPPH.

La concentración de ácido ascórbico no se modifica de forma significativa en el proceso de la digestión *in vitro*, con un promedio de 8.2 ± 0.3 mg/100 g peso fresco.

Tabla 9. Actividad antioxidante por el método ORAC y DPPH y concentración de ácido ascórbico en las distintas fases de la digestión in vitro y en los brotes sin digerir

	ORAC (mmol Trolox / 100 g peso fresco)	DPPH (mmol Trolox / 100 g peso fresco)	Ácido ascórbico (mg/100 g peso fresco)
Brócoli sin digerir	0.71 ± 0.08	0.24 ± 0.06	7.98 ± 0.15
Fase gástrica	1.99 ± 0.31	0.64 ± 0.06	8.03 ± 0.29
Fase intestinal (no absorbida)	1.57 ± 0.26	0.49 ± 0.11	8.70 ± 0.36
Fase intestinal (absorbida)	0.75 ± 0.03	0.06 ± 0.03	8.19 ± 0.19

5.3 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA IN VITRO DE LOS BROTES DE BRÓCOLI

5.3.1 Efecto inhibidor sobre la α -glucosidasa

La mayor inhibición in vitro de la actividad de la α -glucosidasa se produce en la fase gástrica (hasta un 55 %), probablemente debido a la liberación de ácidos fenólicos de la matriz, como se puede ver en el aumento de los ácidos sinápicos hasta 4 veces desde la condición inicial. Considerando la fase intestinal, la inhibición es más importante al comienzo de la digestión y fuera del intestino, en la porción no absorbida (27 %). La inhibición de la alfa glucosidasa producida por los productos de la digestión de los brotes de brócoli, al finalizar el proceso de digestión disminuye hasta un 3.6 % (Tabla 10).

5.3.2 Efecto inhibidor sobre la lipasa

La mayor inhibición *in vitro* de la actividad de la lipasa ocurre en la fase gástrica (26,40 %); en la fase intestinal, continúa ocurriendo una inhibición significativa (19.74 %), lo cual es importante ya que es en este punto donde se libera la lipasa pancreática, al comienzo y durante la digestión intestinal. Es posible que el proceso digestivo libere compuestos de la matriz vegetal responsables de estos efectos que son mayores que en el brócoli no digerido. Una vez que el material es digerido y absorbido, la inhibición en la porción intestinal no absorbida disminuye apreciablemente, hasta un 10 % (Tabla 10)

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática glucosidasa y lipasa en las diferentes fases de la digestión *in vitro* y en los brotes sin digerir

	% Inhibición de la actividad glucosidasa	% Inhibición de la actividad lipasa
Brócoli sin digerir	12.15 ± 0.97	6.30 ± 3.16
Fase gástrica	55.51 ± 1.17	26.40 ± 2.22
Fase intestinal (no absorbida)	27.86 ± 0.88	19.74 ± 6.39
Fase intestinal (absorbida)	3.60 ± 1.20	10.70 ± 2.36

Se realizó un análisis preliminar de la composición fenólica de los brotes de brócoli durante el proceso de digestión. Las condiciones de medida por HPLC-DAD solamente permitieron identificar la pertenencia de cada compuesto individual a una determinada familia, y no elucidar su identificación individual. En la Tabla 11 se describen las familias de compuestos fenólicos detectados. Como se puede observar, los ácidos sinápicos son los compuestos más abundantes, especialmente en la fase gástrica.

Tabla 11. Composición fenólica (clasificada por familias) en las diferentes fases de la digestión *in vitro* y en los brotes sin digerir

	Σ Ácidos sinápicos μmol/100 g peso fresco	Σ Ácidos clorogénicos μmol/100 g peso fresco	Σ Flavonoides μmol/100 g peso fresco
Brócoli sin digerir	30.00 ± 3.94	n.d	n.d.
Fase gástrica	116.10 ± 72.10	7.08 ± 0.37	n.d.
Fase intestinal (no absorbida)	7.78 ± 2.48	1.47 ± 0.51	n.d.
Fase intestinal (absorbida)	20.01 ± 1.00	0.69 ± 0.03	1.46 ± 0.07

*Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (n=4); n.d.: no detectado

En la Figura 15 se observan las alícuotas tomadas de cada una de las fases estudiadas, en las que se aprecia el cambio de color debido al proceso de digestión *in vitro* realizado sobre los brotes de brócoli.

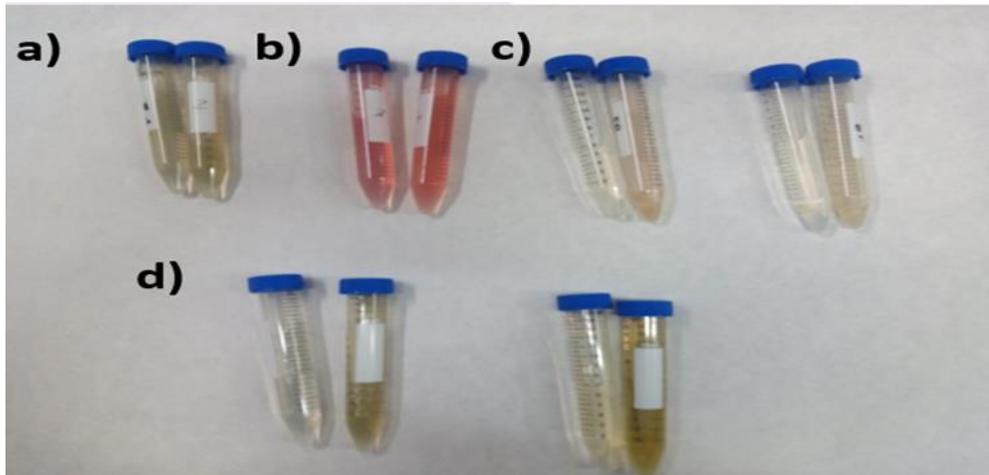


Figura 15. Fases del proceso de digestión: a) Brotes sin digerir; b) fase gástrica; c) Inicio de la fase intestinal; d) Final de la fase intestinal

En c y d, la muestra de la derecha pertenece a la porción absorbida y la muestra de la izquierda a la porción no absorbida

5.4 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA POBLACIONAL DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN A LARGO PLAZO

El total de sujetos analizados fue de 40 voluntarios, de los cuales 19 eran mujeres y 21 eran hombres. En la Tabla 12 se recogen las características de nuestra población.

Tabla 12. Características basales de los voluntarios al inicio del estudio

Variable	Media ± Desviación Estándar
Edad (años)	46 ± 6
Altura (m)	1,72 ± 0,08
Peso (Kg)	85 ± 16,7
IMC (Kg/m²)	28,9 ± 4,0
Masa grasa corporal (%)	30,34 ± 7,54

5.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS HÁBITOS DIETÉTICOS Y DE ESTILO DE VIDA

En la Tabla 13 se muestran los datos de salud (marcadores de riesgo cardiovascular) y de estilo de vida de la muestra poblacional. La tabla expresa el porcentaje de pacientes afectados por cada variable.

Tabla 13. Marcadores de riesgo cardiovascular y de estilo de vida

<i>Variables</i>	Porcentaje Válido %	
<i>Fumador</i>	SI	7,5
	NO	85
	Ex Fumador	7,5
<i>¿Cuántos cigarrillos fuma al día?</i>	Ninguno	85
	Ocasionalmente	7,5
	Menos de 5 al día	5
	Entre 5-20 al día	2,5
<i>¿Tiene el colesterol alto?</i>	SI	7,5
	NO	55
	No sabe	37,5
<i>¿Tiene los triglicéridos altos?</i>	SI	2,5
	NO	50
	No sabe	47,5

Continuación:

	<i>Variables</i>	Porcentaje Válido %
<i>¿Es diabético?</i>	SI	0
	NO	70
	No sabe	30
<i>¿Tiene hipertensión?</i>	SI	0
	NO	60
	No sabe	40
<i>Tiempo que dedica a realizar ejercicio físico</i>	Todos los días	10
	4-5 veces/semana	0
	2-3 veces/semana	30
	No	60
	2 horas	5
	1h 30 min	25
	30 min	10
	<30 min	60

La tabla 14 muestra es seguimiento de la dieta mediterránea de la muestra poblacional.

Tabla 14. Consumo de los alimentos que se incluyen en la dieta mediterránea en raciones /día y raciones/semana

<i>Variables</i>		Porcentaje Válido %
<i>¿Consume ≥ 5 raciones de cereales/día?</i>	SI	0
	NO	100
<i>¿Consume ≥ 3 piezas de fruta/día?</i>	SI	2,5
	NO	95
<i>¿Consume ≥ 2 raciones de legumbres/semana?</i>	SI	0
	NO	100
<i>¿Consume verduras ≥ 2 raciones/día?</i>	SI	2,5
	NO	95
<i>¿Consume pescado ≥ 3 raciones/semana?</i>	SI	0
	NO	100
<i>¿Consume carne de ave 1-4 raciones/semana?</i>	SI	2,5
	NO	95
<i>¿Consume carne roja 1-4 raciones/semana?</i>	SI	0
	NO	100
<i>¿Consume derivados lácteos 3-4 raciones/día?</i>	SI	2,5
	NO	95
<i>Uso diario de aceite de oliva para cocinar</i>	SI	2,5
	NO	95
<i>¿Consume >1 ración de frutos secos/semana?</i>	SI	0
	NO	100
<i>¿Consume bollería <1 porción/semana?</i>	SI	2,5
	NO	95

El resultado de las encuestas (Tabla 15) expresado en media \pm desviación estándar es $5,4 \pm 1,3$, resultado que indica la necesidad de mejorar la adherencia a la dieta mediterránea, realizando modificaciones en su dieta habitual para reducir el riesgo cardiovascular. No hay diferencias significativas entre los que realizan una mala adherencia a la dieta mediterránea y los que presentan un seguimiento medio de la dieta mediterránea ($p \geq 0,05$).

Tabla 15. Seguimiento de la dieta mediterránea de la muestra poblacional

PUNTUACIÓN	ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA %
< 5 Mala	43%
5-7 Media	57%
>7 Buena	0

5.6 EFECTOS DE LOS BROTES DE BRÓCOLI EN EL PERFIL ANTROPOMÉTRICO

En la siguiente tabla (Tabla 16) se observan los valores medios de peso, IMC y porcentaje de grasa corporal en la fase inicial (D0), tras el tratamiento con los brotes de brócoli (D70), y en la fase de seguimiento (D90 y D160). Los días 90 y 160 hacen referencia al inicio de la fase de seguimiento, tras haber finalizado los 20 días del periodo de lavado, y el final de dicha fase de seguimiento.

Tabla 16. Perfil antropométrico de los voluntarios en los distintos tiempos

VARIABLES	D0	D70	D90	D160
<i>Peso (Kg)</i>	85,79 (80,38-91,20)	85,69 (80,42-90,95)	83,83 (79,47-88,18)	84,04 (79,66-88,41)
<i>IMC (kg/m²)</i>	28,88 (27,56-30,20)	28,93 (27,63-30,23)	28,49 (27,40-29,57)	28,60 (27,52-29,68)
<i>Grasa Corporal (%)</i>	30,34 (27,29-33,39)	29,32 (26,93-31,71)	30,29 (27,87-32,72)	32,09 (29,69-34,49)

Datos expresados como media (Intervalo de Confianza del 95 %)

La evolución de estos parámetros en el tiempo se puede expresar como como el cociente (ratio) respecto al valor medio a tiempo inicial (valor a tiempo Dx / valor promedio a tiempo D0). El cociente a día D0 es por tanto 1. Con esas ratio obtenidas, se puede calcular cómo se modificaría en el tiempo el valor de la variable para un individuo cuyo valor sea igual a la media, a tiempo 0. Esos son los valores medios que están calculados en las siguientes tablas, y su intervalo de confianza del 95 %, así como el valor p obtenido en el análisis estadístico (Tabla 17).

Tabla 17. Evolución de los valores medios (ratio) de las variables continuas antropométricas en los distintos periodos del estudio

Variable	Media	Ratio	IC 95%	Valor P
Peso (kg)	86.141			
De D0 a D70	86.346	1.002	(0.997 to 1.008)	0.38388
De D0 a D90	85.983	0.998	(0.987 to 1.010)	0.74963
De D0 a D160	86.424	1.003	(0.994 to 1.012)	0.45589
Índice de Masa Corporal (kg/m ²)	28.877			
De D0 a D70	28.945	1.002	(0.997 to 1.008)	0.39007
De D0 a D90	28.797	0.997	(0.986 to 1.009)	0.62441
De D0 a D160	28.971	1.003	(0.994 to 1.012)	0.46125
Grasa Corporal (%)	28.834			
De D0 a D70	27.298	0.947	(0.903 to 0.993)	0.02586
De D0 a D90	28.795	0.999	(0.956 to 1.043)	0.94899
De D0 a D160	29.955	1.039	(0.996 to 1.084)	0.07644

No se observaron cambios significativos en el peso corporal ni en el IMC. En contraste, se aprecia una ligera disminución en el porcentaje de grasa corporal

a los 70 días desde el inicio de la intervención dietética (ratio= 0,947, $q= 0,02586$) al finalizar la fase de ingesta de brócoli, volviendo a sus niveles iniciales a día 90 (20 días después de finalizar la ingesta de los brotes de brócoli) manteniéndose esta tendencia hasta el día 160 (valor $p = 0.94899$ y valor $p = 0.07644$, respectivamente) (Tabla 17).

5.7 EFECTOS DE LOS BROTES DE BRÓCOLI EN EL PERFIL INFLAMATORIO Y LIPÍDICO

En la Tabla 18 se observan los cambios en el perfil lipídico y marcadores de inflamación durante el estudio de intervención.

Tabla 18. Perfil inflamatorio y lipídico en las diferentes fases del estudio

VARIABLES	D0	D70	D90	D160
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	191,1 (186,5-195,6)	187,1 (182,5-191,6)	185,2 (180,5-189,9)	172,6 (168,0-177,2)
<i>Colesterol HDL (mg/dL)</i>	49,5 (48,1-50,8)	47,4 (46,1-48,7)	45,4 (44,0-46,7)	49,3 (48,0-50,7)
<i>Colesterol LDL (mg/dL)</i>	123,4 (118,9-127,8)	118,7 (114,2-123,1)	120,8 (116,2-125,4)	89,5 (85,0-94,1)
<i>IL-6 (pg/mL)</i>	4,76 (4,21-5,31)	2,11 (1,61-2,61)	1,20 (0,88-1,52)	2,66 (1,89-3,44)
<i>Proteína C reactiva (µg/mL)</i>	2,42 (1,45-3,40)	1,52 (0,70-2,34)	1,92 (1,02-2,82)	2,32 (1,07-3,56)

Datos expresados como media (Intervalo de Confianza del 95 %)

Los valores promedio de colesterol total mostraron una tendencia significativa de disminución después del consumo de brócoli, pasando de los 192 mg/dL iniciales, disminuyendo a 187 mg/dL en 10 semanas y durante la fase control, hasta una reducción de 172,6 mg/dL, $\rho < 0,001$) (Tabla 15). El LDL-colesterol siguió el mismo comportamiento, mientras que el HDL-colesterol no varió significativamente.

La concentración plasmática de interleukina-6 (IL-6) disminuyó significativamente en un 38% (4,76 $\mu\text{g/mL}$ a 2,11 pg/mL) a los 70 días de consumo de brotes de brócoli con respecto al valor inicial (ratio=0,381; $p < 0,00001$) (Tablas 18 y 19). Tras 20 días de lavado en los que no hubo consumo de brotes de brócoli, estos niveles de IL-6 continuaron disminuyendo significativamente (1.20 pg/mL) (ratio= 0,195; valor $p < 0,00001$). A partir de ese momento, a los 90 días del inicio de la fase de seguimiento (D160) aumentaron los niveles (2.66 pg/mL), pero sin llegar a los valores iniciales (ratio= 0,472; valor $p = 0,00000$).

Tabla 19. Evolución de los valores medio (ratios) de la variable continua IL-6 en los distintos periodos del estudio

Variable	Media	Ratio	IC 95%	Valor P
IL_6 (pg/mL)	4.594			
De D0 a D70	1.748	0.381	(0.298 to 0.486)	<0.00001
De D0 a D90	0.896	0.195	(0.149 to 0.255)	<0.00001
De D0 a D160	2.170	0.472	(0.366 to 0.609)	<0.00001

En la Figura 16, podemos ver cómo los cambios de IL-6, durante la ingesta de brotes de brócoli, dependen de los valores iniciales de IL-6. La pendiente de regresión lineal nos da un valor negativo, lo que indica que los voluntarios que presentan una mayor concentración de esta citoquina al inicio de la intervención,

tienden a reducir más la concentración de este biomarcador tras la ingesta de brócoli.

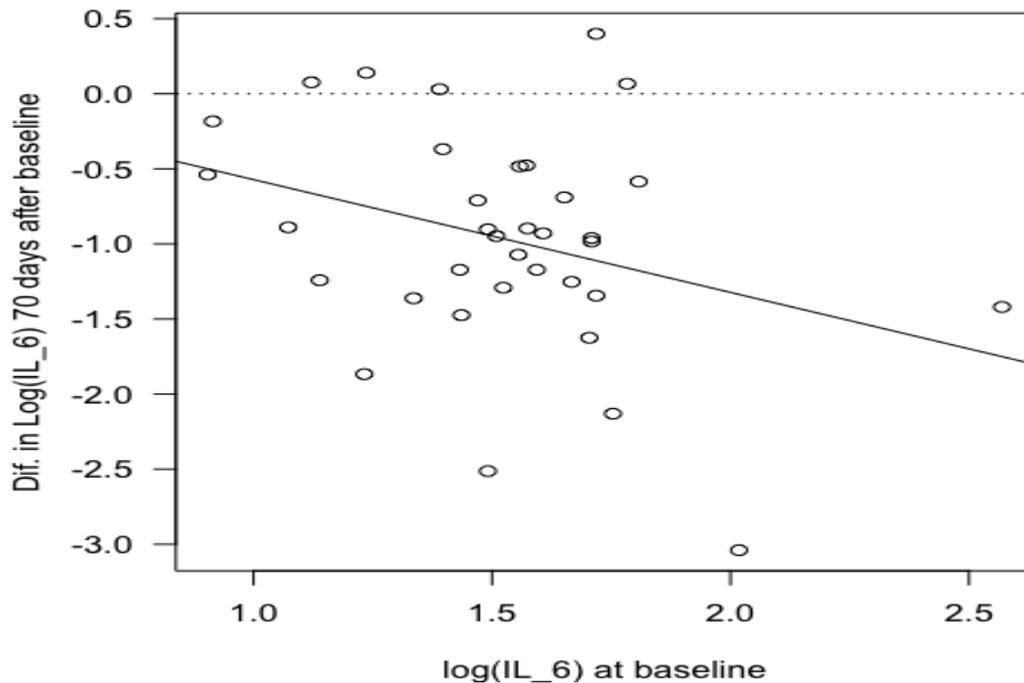


Figura 16. Cambios de IL-6 durante la fase de intervención en función de los valores iniciales de IL-6 (variable log-transformada)

Por otro lado, se observó una disminución en la proteína C reactiva (CRP, *C-reactive protein*) durante la fase de ingesta de brotes de brócoli (pasando de un valor inicial de 2.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ratio= 0,592 y $p= 0,00915$) (Tablas 18 y 20). Posteriormente, en la fase de seguimiento, al inicio y final de dicha fase, los valores aumentaron (ratio= 1,020 y 1,085, respectivamente), volviendo a las condiciones iniciales ($p= 0,92162$ y $p= 0,722756$, en los días 90 y 160, respectivamente).

Tabla 20. Evolución de los valores medio (ratios) de la variable continua CRP en los distintos periodos del estudio

Variable	Media	Ratio	IC 95%	Valor P
Proteína C reactiva (µg/mL)	1.431			
De D0 a D70	0.847	0.592	(0.405 to 0.865)	<i>0.00915</i>
De D0 a D90	1.459	1.020	(0.677 to 1.536)	0.92162
De D0 a D160	1.553	1.085	(0.665 to 1.771)	0.72756

Los marcadores TNF- α e IL-1 β sólo fueron detectados en un número muy pequeño de muestras y en la mayoría de ellas muy por debajo del límite de cuantificación, por lo que no se han podido obtener conclusiones válidas, y por tanto los datos no han sido utilizados con fines estadísticos.

Los resultados obtenidos no se modificaron substancialmente cuando se realizaron modelos de regresión múltiple, ajustando por edad y sexo.

5.8 BIODISPONIBILIDAD DE LOS GLUCOSINOLATOS EN LOS BROTES DE BRÓCOLI

Algunos glucosinolatos e isotiocianatos como la glucorafanina, glucoiberina, iberina, glucoerucina, erucina y glucobrassicina no fueron detectados en las muestras de orina. El indol-3-Carbinol (I3C) se ha detectado en el 50% de las muestras de orina y además en cantidades muy pequeñas después de la ingesta de los brotes de brócoli. En cambio, el metabolito 3,3-diindolilmetano (3,3-DIM) fue detectado y cuantificado en todos los voluntarios del estudio y fue incluido en el análisis estadístico como una variable continua (Tabla 21).

Tabla 21. Evolución de los valores medios de los metabolitos en orina de 24 h

VARIABLES	D0	D70	D90	D160
3,3-DIM (μM)	0,484 (0,38-0,59)	0,707 (0,61-0,80)	0,449 (0,33-0,57)	0,461 (0,36-0,56)
SFN-NAC (μM)	0,193 (0,00-0,41)	2,301 (1,85-2,75)	0,023 (0,01-0,04)	0,094 (0,00-0,19)
SFN-CYS (μM)	0,116 (0,00-0,26)	0,800 (0,57-1,03)	0,078 (0,00-0,22)	0,081 (0,00-0,19)
SFN (μM)	0,098 (0,00-0,23)	0,543 (0,40-0,69)	0,038 (0,00-0,13)	0,022 (0,01-0,03)

Valores expresados como media (intervalo de confianza del 95 %)

Durante la intervención dietética el 3,3-DIM aumentó de forma significativa, (ratio= 1,947, p= 0,00001) y conforme fue avanzando la fase de seguimiento disminuyó hasta alcanzar los valores iniciales (valor p= 0,10484 en el día 90 y p= 0,12312 a los 160 días) (Tabla 22).

Tabla 22. Evolución de los valores medio (ratios) de la variable continua 3,3'-DIM en los distintos periodos del estudio

Variable	Media	Ratio	IC 95%	Valor P
3,3'-DIM (μM)	0.334			
De D0 a D70	0.650	1.947	(1.705 to 2.223)	<0.00001
De D0 a D90	0.335	0.757	(0.539 to 1.063)	0.10484
De D0 a D160	0.376	0.850	(0.689 to 1.048)	0.12312

Los metabolitos de la vía del sulforafano están presentes en todas las muestras de orina de 24 horas. En concreto, el metabolito con mayor concentración fue el sulforafano-N-acetilcisteína (SFN-NAC), con una concentración media de 2,0301 μM correspondiente a 3,21 $\mu\text{mol}/24\text{h}$, mientras que el sulforafano (SFN) fue el metabolito que presentó una menor excreción en orina (0,543 μM , lo que corresponde a 0,77 $\mu\text{mol}/24\text{h}$) (Tabla 21). La suma de SFN, SFN-NAC y sulforafano-cisteína (SFN-CYS) fue aproximadamente de 5,11 $\mu\text{mol}/24\text{h}$. Considerando que hemos cuantificado una concentración de 117 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ de glucorafanina por ración de brotes de brócoli, podemos decir que el 4% aproximadamente de media es metabolizado a través de la vía del ácido mercaptúrico.

En la Tabla 23 y en la Figura 17 podemos observar la proporción de individuos en los cuales los metabolitos han sido detectados y cuantificados en cada tiempo de estudio. El valor de 1.0 significa que el metabolito ha sido detectado en el 100 % de los voluntarios, el valor de 0.5 en el 50 % de individuos y así sucesivamente.

El porcentaje de individuos en los cuales el SNF-NAC es detectado aumenta significativamente en la fase de brócoli, con un incremento del 45% entre D0 y D70 ($p= 0,00001$). Posteriormente, en la siguiente fase, el porcentaje fue disminuyendo, aunque sigue siendo significativamente diferente respecto al valor inicial (diferencia del 32,5%, $p= 0,00303$). A los 160 días, no se observaron diferencias significativas con respecto a los valores iniciales ($p= 0,07139$).

Tabla 23. Evolución del porcentaje de individuos en los cuales se detectó Sulforafano-N-acetilcisteína (SFN-NAC), Sulforafano-cisteína (SFN-CYS) y Sulforafano (SFN)

Variable		Porcentaje	Diferencia	IC 95%	Valor p
SFN-NAC	D0	55.0%			
	Dif. D70-D0	100.0%	45.0%	(27.1% - 62.9%)	0.00001
	Dif. D90-D0	87.5%	32.5%	(11.5% - 53.5%)	0.00303
	Dif. D160-D0	32.5%	-22.5%	(-46.2% - 1.2%)	0.07139
SFN-CYS	D0	30.0%			
	Dif. D70-D0	97.5%	67.5%	(50% to 85%)	<0.00001
	Dif. D90-D0	20.0%	-10.0%	(-31.4% - 11.4%)	0.43858
	Dif. D160-D0	17.5%	-12.5%	(-33.4% - 8.4%)	0.29330
SFN	D0	15.0%			
	Dif. D70-V0	97.5%	82.5%	(67.9% - 97.1%)	<0.00001
	Dif. D90-V0	5.0%	-10.0%	(-25.5% - 5.5%)	0.26355
	Dif. D160-D0	10.0%	-5.0%	(-22% - 12%)	0.73532

El comportamiento de SFN-CYS y SFN fueron similares. Sus porcentajes incrementaron después de la fase de brócoli (67,5%; $p= 0,00001$ para el SFN-CYS y 82,5%; $p = 0,0001$ para el SFN). Posteriormente, a D90, los porcentajes de individuos en los que fueron detectados disminuyeron hasta llegar a los valores iniciales ($p= 0,43858$ y $p= 0,26355$ para SFN-CYS y SFN, respectivamente). Este comportamiento se mantuvo durante la fase de mantenimiento, hasta los 160 días ($p= 0,02933$, $p= 0,73532$, respectivamente).

El metabolito sulforafano-glutation (SFN-GSH) fue detectado en muy pocas muestras de los voluntarios, por lo que sus datos no han sido incluidos y no han sido considerados en el análisis estadístico.

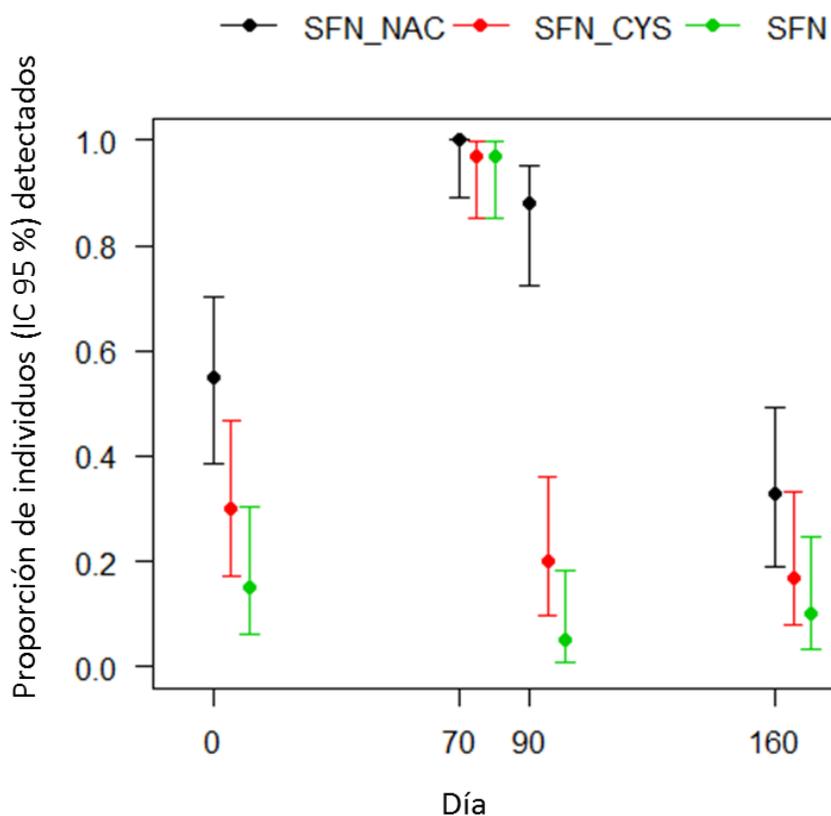


Figura 17. Proporción de individuos e IC 95% en los que se detecta los metabolitos en las distintas fases

Por otro lado, debido a la disminución tan acusada que observamos en las concentraciones de marcadores inflamatorios y el aumento de los metabolitos de los brotes de brócoli a los 70 días de tratamiento, decidimos estudiar si existían correlaciones significativas entre ellos (Tabla 24). Para ello se realizaron modelos de regresión lineal.

Así, detectamos una correlación significativa entre la disminución observada de los niveles de IL-6 en plasma y el aumento de SFN observado en las

orinas de 24 h ($p = 0.03319$). En el caso de la proteína C reactiva, su disminución se correlacionó significativamente con los aumentos de SFN-NAC y de SFN-CYS observados en las orinas de 24 h ($p = 0.04783$ y $p = 0.04116$, respectivamente).

Tabla 24. Asociación entre los cambios en los metabolitos con los cambios observados en IL-6 y proteína C-reactiva tras 70 días de consumo de brocoli

Variable	Metabolito	Beta	95% IC	Valor p
IL-6	3,3-DIM	1.232	(0.545 to 2.784)	0.60520
	SFN-NAC	0.870	(0.749 to 1.009)	0.06510
	SFN-CYS	0.779	(0.568 to 1.069)	0.11800
	SFN	0.589	(0.363 to 0.956)	0.03319
Proteína C-reactiva	3,3-DIM	0.888	(0.248 to 3.172)	0.84708
	SFN-NAC	0.780	(0.610 to 0.997)	0.04783
	SFN-CYS	0.597	(0.364 to 0.977)	0.04116
	SFN	0.654	(0.283 to 1.512)	0.30285

La proporción (ratio) de los marcadores de inflamación y el metabolito 3,3'DIM se puede observar en la siguiente figura (Figura 18).

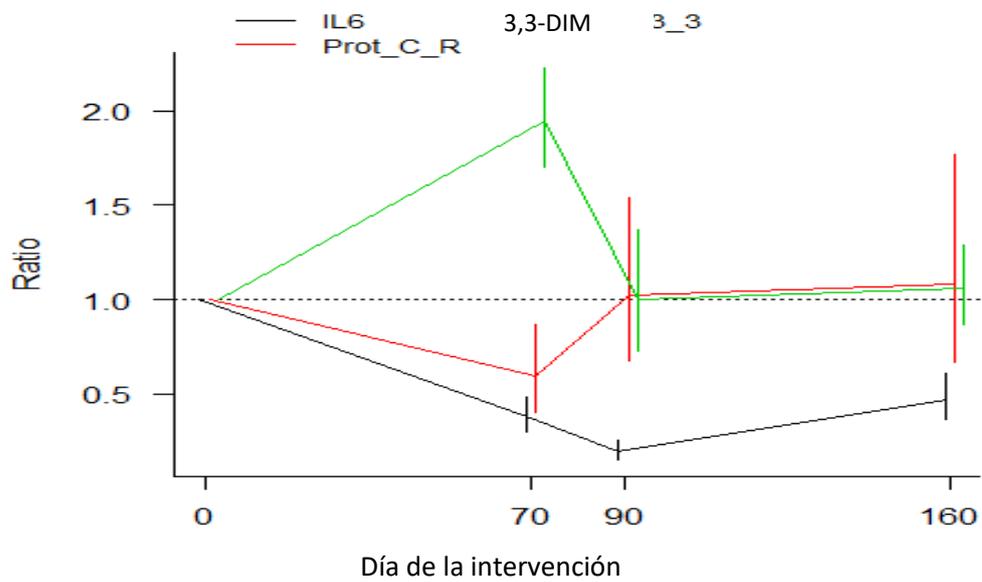


Figura 18. Evolución de los parámetros de inflamación y del metabolito 3,3'-DIM en los distintos días del estudio

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el potencial beneficioso de los brotes de brócoli *in vitro* así como los efectos de su consumo regular sobre población en sobrepeso.

6.1 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS BROTES DE BRÓCOLI

El daño o estrés oxidativo podemos definirlo como un estado de la célula en el que la homeostasis redox intracelular se encuentra alterada. Se da una situación de desequilibrio donde hay un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno, y una disminución del sistema de defensa. El sistema biológico trata de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante, mediante antioxidantes endógenos o exógenos procedentes de la dieta (Figura 19). Aparece así una situación de estrés oxidativo donde las lesiones que producen los radicales libres al reaccionar con macromoléculas vitales (lípidos, proteínas, ADN, etc...) desencadenan un daño irreversible que puede conducir a la muerte celular. Muchas de las enfermedades crónicas actuales están relacionadas con este fenómeno, como ocurre con la asociación entre los niveles de oxidación de LDL y la enfermedad cardiovascular, entre otras.

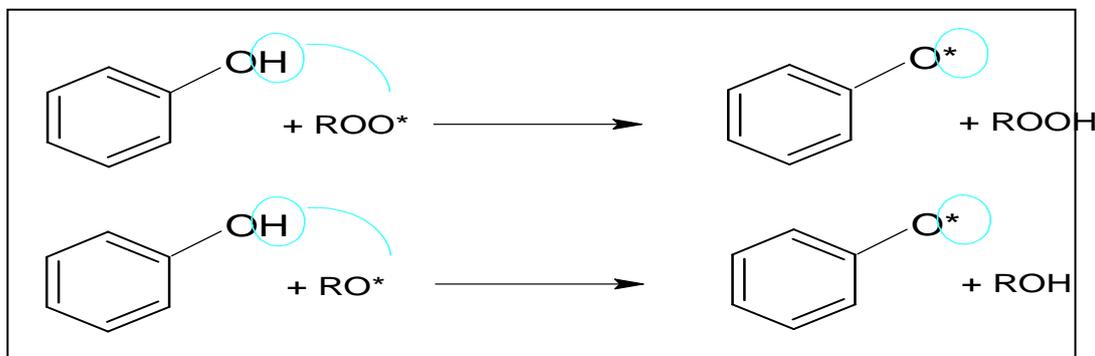


Figura 19. Ejemplo de acción antioxidante: acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres

En el presente estudio, la actividad antioxidante se evaluó mediante el método del DPPH, que mide la capacidad de la muestra para captar y neutralizar los radicales libres en un medio lipofílico, no acuoso¹³⁸, junto con el método ORAC (Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC), adaptada a **microescala** según Mena y col.¹⁵³, basado en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno¹³⁹. El ensayo ORAC es el único que combina en un solo valor el tiempo y velocidad de inhibición del daño oxidativo y nos da una orientación sobre la capacidad antioxidante de los brotes de brócoli en el organismo.

El brócoli es un vegetal común reconocido como una rica fuente de antioxidantes, que actúa directamente contra los radicales libres y/o aumenta la eficiencia de los antioxidantes endógenos al regular los factores de transcripción.

Se ha analizado la actividad antioxidante de especies de *Brassica*, con diferentes métodos que emplean diversas técnicas de extracción y especies reactivas, que valoran más el efecto antioxidante de la fracción de compuestos más lipófilos o más hidrófilos, de modo que encontramos diversos valores de actividad. Como ejemplo, los valores ORAC de diferentes extractos mostraron el siguiente orden de potencia: kale > coles de Bruselas, brócoli > coliflor > col¹⁵⁴. Muchos de los estudios realizados concuerdan en que las coles de Bruselas, el

brócoli y la col roja son las especies de *Brassica* que posee una mayor actividad antioxidante¹⁵⁵. Kurilich et al (2002)¹⁵⁶ investigó la actividad antioxidante de la porción hidrófila y lipófila del brócoli, determinando que los extractos hidrófilos, que incluyen vitamina C y polifenoles, eran los responsables de entre el 80 y el 95 % de los valores ORAC. La porción liposoluble, formada por carotenoides y vitamina E, contribuyen como máximo al 20 % de la actividad antioxidante total en especies *Brassica*.

Muchos autores evalúan esta actividad en extractos del alimento, extraídos con disolventes que permiten obtener y concentrar gran cantidad de sustancias antioxidantes. En el presente estudio hemos querido evaluar la actividad antioxidante en la muestra de brócoli crudo sin extraer y hacer una simulación in vitro para evaluar el potencial antioxidante de la porción bioaccesible y por tanto biodisponible para ejercer la actividad.

La actividad antioxidante observada no varía mucho después del proceso de digestión. Parece que es ligeramente superior en la fase gástrica, probablemente porque los compuestos se liberan durante la digestión debido a la acción del ácido clorhídrico y la pepsina. Esta actividad antioxidante se mantiene en la fase intestinal. Sin embargo, una vez que los compuestos son absorbidos (fase intestinal dializada), los valores disminuyen considerablemente en ambos métodos. El método ORAC es más sensible que el DPPH para medir estas variaciones en la actividad debido al proceso de digestión.

Parece ser que los glucosinolatos y sus metabolitos no los responsables de la eliminación de radicales libres de un modo directo. Actualmente se sabe que las propiedades antioxidantes de los glucosinolatos y sus metabolitos derivan fundamentalmente de la activación de factores de transcripción relacionados con la síntesis de enzimas antioxidantes y por lo tanto actuarían como antioxidantes indirectos¹⁵⁷. Es posible que la actividad antioxidante observada en nuestro estudio se deba a los compuestos polifenólicos presentes en el brócoli, especialmente los ácidos sinápicos, que aumentan especialmente con el proceso de digestión.

Por otro lado, Rychlik et al.,¹⁵⁸ observaron que la capacidad antioxidante del extracto de brotes de brócoli sometido a digestión gastrointestinal fue similar o superior a la determinada para los brotes de brócoli no digeridos. Estos autores también mostraron que el extracto digerido exhibía una capacidad inhibidora de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de colon humano NCM460, concretamente una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mostraba un aclaramiento de ROS del 76,59%. Se observó una reducción del 57,33% en el daño oxidativo del ADN en las células NCM460 debido al tratamiento con extracto de brotes de brócoli digeridos.

6.2 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LOS BROTES DE BRÓCOLI

La inhibición de la enzima α -glucosidasa se considera una de las medidas efectivas para regular la diabetes tipo II, mediante el control de la absorción de glucosa¹⁵⁹. Los inhibidores de la α -glucosidasa y α -amilasa pueden retrasar la digestión de carbohidratos y reducir la tasa de absorción en glucosa, por lo que ayudan a retrasar el aumento en sangre de glucosa postprandial.

En el presente estudio, la inhibición de la α -glucosidasa por los brotes de brócoli analizados al final del proceso de digestión es $10,70 \pm 2,36\%$. La mayor inhibición de la actividad de la α -glucosidasa se produce en la fase gástrica, probablemente debido a la liberación de ácidos fenólicos de la matriz, como se puede ver en el aumento de los ácidos sinápicos hasta 4 veces desde la condición inicial. Considerando la fase intestinal, la inhibición es más importante al comienzo de la digestión y fuera del intestino, en la porción no absorbida.

La inhibición de la α -glucosidasa reduce la hiperglucemia postprandial y la secreción de insulina, debido al retraso en la digestión de los carbohidratos. Existen estudios que demuestran que los ácidos fenólicos, además de inhibir la α -glucosidasa y disminuir el pico máximo de la glucosa postprandial, también permite reducir el peso corporal¹⁶⁰. La inhibición de la actividad de la α -

glucosidasa intestinal puede ser un mecanismo potencial que contribuye a la potencial propiedad antidiabética del brócoli¹⁶¹.

Los compuestos alimenticios que actúan como inhibidores de las glucosidasas son elementos clave para la prevención de patologías relacionadas con el exceso de la glucosa en sangre, evitando la acumulación de carbohidratos en el organismo. Entre las patologías que podrían verse afectadas positivamente están la diabetes mellitus, el sobrepeso y la obesidad, y el cáncer colorrectal. Además, la acción antihiper glucémica de estos inhibidores también podría tener efectos positivos sobre las enfermedades cardiovasculares.

Los fármacos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la lipasa pancreática, que hidroliza los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos absorbibles, se emplean para el tratamiento de la obesidad en países desarrollados¹⁶². Estos inhibidores de la lipasa gastrointestinal dificultan la digestión y absorción de grasas.

La inhibición de la actividad α -glucosidasa en enfermedades crónicas, como es el caso de la diabetes tipo II es una necesidad a nivel mundial, ya que aumenta continuamente en todo el mundo a gran velocidad. Un estudio *in vitro*, realizado en Italia¹⁶³, demostró que las pieles de la uva blanca eran ricas en compuestos fenólicos, utilizadas en alimentos como el pan y el puré de tomate pueden inhibir la enzima α -glucosidasa de manera más eficiente que la acarbosa.

6.3 EFECTO IN VIVO DE LOS BROTES DE BRÓCOLI Y BIODISPONIBILIDAD

Realizamos un estudio de intervención para evaluar si el consumo diario de brotes de brócoli mejora los biomarcadores de la inflamación en sujetos con sobrepeso. El tejido adiposo está relacionado con una mayor secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, y los niveles de estas proteínas se encuentran elevados en personas con sobrepeso^{164,165}. Estas proteínas están vinculadas al desarrollo de varias patologías¹⁶⁶ y concretamente la proteína C reactiva es un importante marcador predictivo de las enfermedades cardiovasculares¹⁶⁷. A través del consumo de un alimento con propiedades anti-

inflamatorias como los brotes de brócoli podríamos contribuir a una reducción de los niveles inflamatorios y obtener así un mejor pronóstico en trastornos asociados a la obesidad.

En nuestro estudio observamos un notable efecto antiinflamatorio después de la ingesta de brotes de brócoli, con una reducción significativa en un 38% y 59%, en IL-6 y proteína C reactiva, respectivamente. Ambas proteínas están involucradas en la respuesta inflamatoria y aumentan en personas con sobrepeso.

Los estudios clínicos en humanos sobre las propiedades antiinflamatorias del género *Brassica* son escasos. Nuestro grupo de investigación describió previamente una disminución significativa en los marcadores de procesos inflamatorios, como los metabolitos tetranor-PGEM (derivado de las prostaglandinas E₁ y E₂) y 11-β-PGF2α (derivado de la prostanglandina D₂) después del consumo de una sola porción de brotes de brócoli¹⁶⁸.

Otros autores han observado disminuciones en los niveles de proteína C reactiva en un 48% después de 10 días de ingesta de brotes de brócoli (250 g/día) en fumadores, confirmando nuestros resultados; sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de IL-6¹⁶⁹. También se apreciaron disminuciones en IL-6 y proteína C reactiva después de 14 días del consumo de brotes de brócoli¹⁷⁰, pero las cantidades utilizadas (7 g/kg peso corporal, 14 g/kg de peso corporal) superaron con creces a las de nuestro estudio.

Las diferencias en nuestra muestra poblacional, diseño del estudio, tipo de *Brassica* o cantidad de producto consumido, podrían explicar los diferentes resultados observados. Los brotes de brócoli utilizados en nuestro estudio contenían cantidades significativas de glucosinolatos alifáticos como glucorafanina, glucoinerina y glucoerucina, que derivan del aminoácido metionina, así como los glucosinolatos indólicos como derivados metoxi e hidroxilo de glucobrassicina, que derivan del aminoácido triptófano. Hay que destacar que los brotes de brócoli son especialmente ricos en glucorafanina (hasta 10 veces

superior a los del brócoli adulto (inflorescencias), cuyos niveles caen con la planta en crecimiento, a medida que el material vegetal aumenta sin síntesis de glucorafanina⁴⁷. Por lo tanto, la concentración potencialmente beneficiosa es más fácil de lograr consumiendo raciones de brotes de brócoli que consumiendo las inflorescencias maduras de brócoli (pellas).

Los niveles de glucosinolatos y sus metabolitos, los isotiocianatos, se midieron en orina de 24 h por UHPLC-MS/MS con el fin de determinar el consumo de brócoli y con el objetivo de comprobar si existen metabolitos relacionados con los cambios en los parámetros bioquímicos observados. No se apreciaron niveles significativos de glucosinolatos en las muestras de orina de 24 h, lo que se explica fácilmente ya que estos compuestos sufren grandes modificaciones antes de que se produzca la absorción en el intestino. Estos compuestos se encuentran presentes en la planta intacta como glucósidos, y tras producirse el daño tisular, la enzima mirosinasa cataliza su hidrólisis del resto de la glucosa¹⁷¹. La hidrólisis puede producirse también mediante el proceso de masticación o bien a través de las glucosidasas del tracto gastrointestinal. La aglicona de cada glucosinolato puede sufrir asimismo modificaciones posteriores y el conjunto de metabolitos formados son los isotiocianatos. Estos compuestos son absorbidos por enterocitos y distribuidos sistemáticamente¹⁷². En particular, el isotiocianato sulforafano (1-isotiocianato-4-metil-sulfinilbutano) se forma a partir del glucosinolato glucorafanina (4-metil-sulfinilbutil-glucosinolato). Por lo tanto, los isotiocianatos son los compuestos presentes principalmente en los tejidos a los que se les pueden atribuir las actividades biológicas.

En los seres humanos, los isotiocianatos se metabolizan a través de la vía del ácido mercaptúrico. La conjugación con glutatión (GSSH) es catalizada por la enzima glutatión transferasa y los conjugados son posteriormente metabolizados, dando lugar a SFN-CYS y SFN-NAC. Se ha demostrado que los polimorfismos de estas enzimas glutatión transferasas tienen un impacto significativo en el metabolismo de los isotiocianatos¹⁷³. En el presente estudio, a partir de los resultados descritos, los metabolitos SFN-NAC, SNF-NAC, SFN-CYS y SFN pueden considerarse como buenos marcadores de ingesta, ya que su presencia

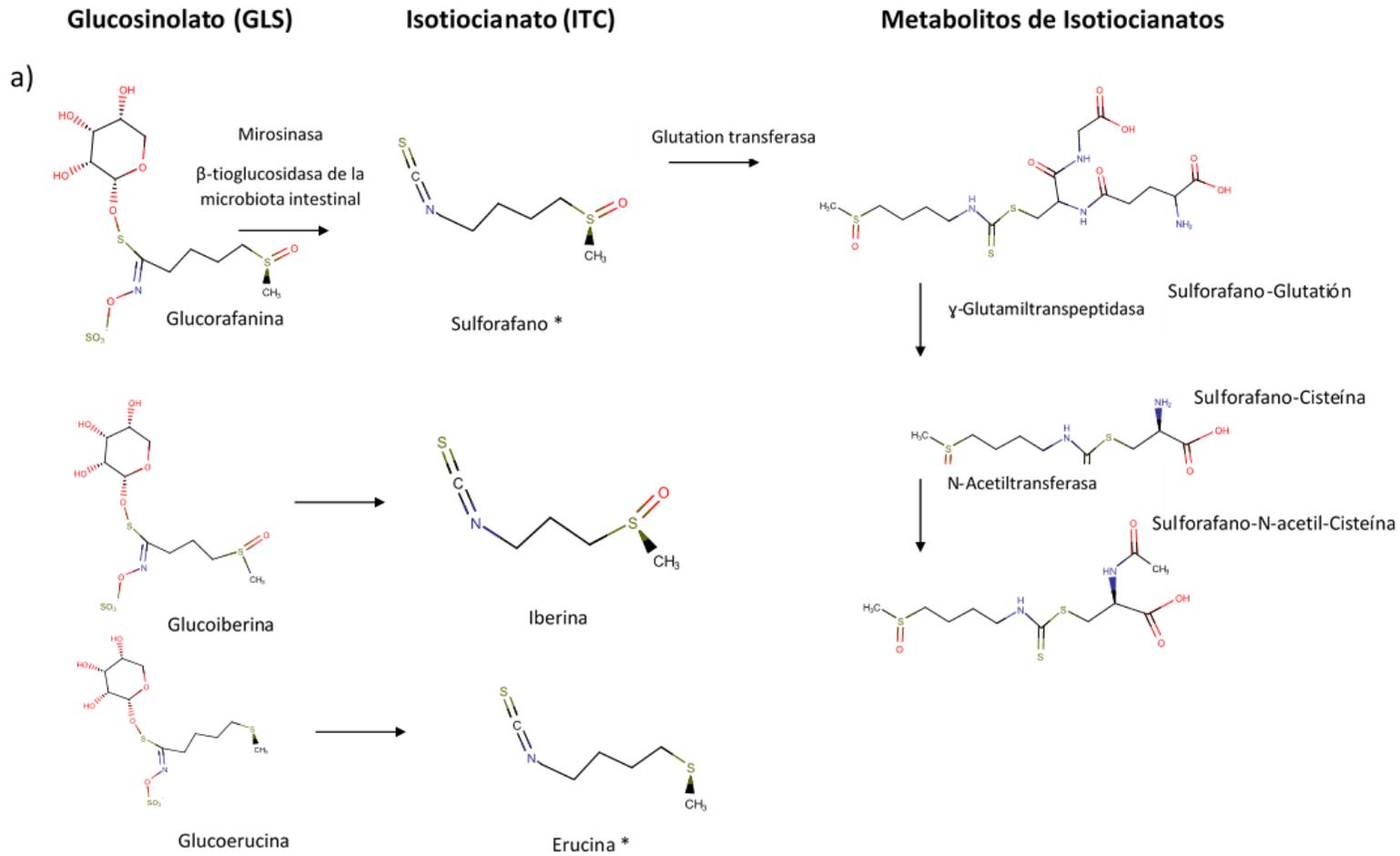
está relacionada sólo con la fase de ingesta de brócoli, indicando así el cumplimiento de la intervención dietética con brotes.

Con respecto a los glucosinolatos indólicos, el indol-3-carbinol (I3C) se libera por hidrólisis de la glucobrasicina (3-indolil-metil-glucosinolato) por acción de la mirosinasa. Estos tipos de glucosinolatos indólicos están presentes en semillas, plantas maduras y algunos brotes, pero no están presentes en todas las variedades del género *Brassica*^{174,175}.

Después de la ingestión de los brotes de brócoli, el I3C es modificado por el pH ácido del estómago y se dimeriza a 3,3'-diindolimetano (3,3'-DIM)¹⁷⁶. Por lo tanto, la presencia de 3,3'-DIM en las muestras de orina de 24 h está relacionada con el metabolismo de los derivados de la glucobrasicina, presente en los brotes de brócoli. (Figura 20).

6.4. ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Las diferentes definiciones de Dieta Mediterránea podrían limitar la comprensión de los mecanismos por los que la dieta mediterránea produce beneficios para la salud. En nuestra muestra poblacional se observa un resultado de adherencia a la dieta mediterránea moderado, que indica que se deben realizar modificaciones en los hábitos dietéticos, aumentando el consumo de frutas, verduras y pescado fundamentalmente. Este resultado es llamativo ya que vivimos en un área geográfica agrícola y líder en exportación de frutas y verduras. Estos resultados coinciden con los observados por Abellán et al.¹⁷⁷, en un estudio realizado en 1732 voluntarios de diferentes áreas de salud de España.



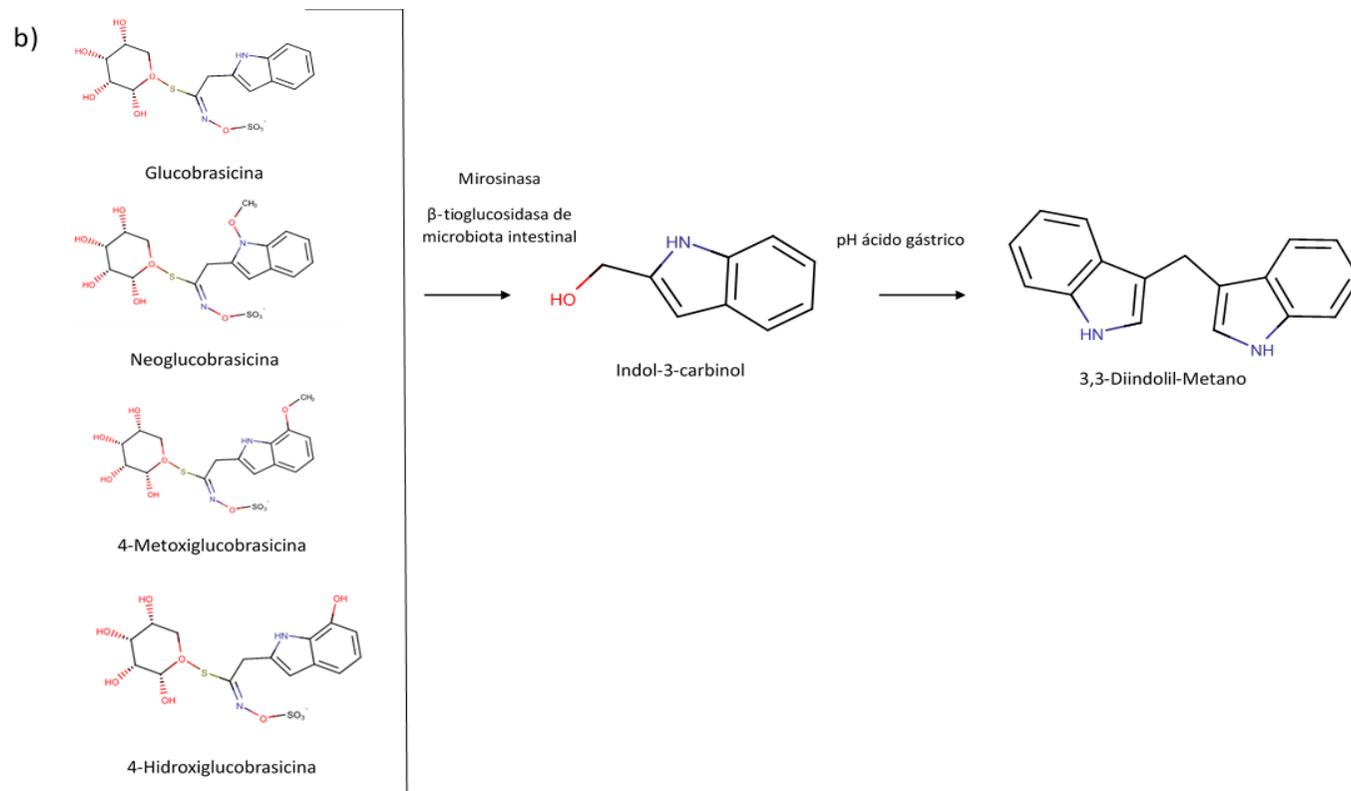


Figura 20. Estructuras químicas de los glucosinatos, isotiocianatos y metabolitos de los brotes de brócoli en humanos¹⁷⁸. a) alifáticos, b) indolicos, * interconversión

El aumento en los metabolitos de los brotes brócoli que observamos está relacionado significativamente con la disminución de los niveles de IL-6 y proteína C reactiva, lo que sugiere su implicación en la modulación de las proteínas proinflamatorias. Los estudios sobre modelos celulares han demostrado que el mecanismo de interacción es común en los isotiocianatos y similar al de las hormonas endógenas como esteroides o vitaminas A y D. Este tipo de compuestos posee grupos electrófilos que interactúan con los restos nucleófilos de los factores de transcripción, regulando su actividad¹⁷⁹; se ha demostrado que el sulforafano interactúa con el factor de transcripción redox-sensible Nrf2, para permitir su translocación hacia el núcleo, donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) y activa la síntesis de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés, como las enzimas de Fase II de detoxificación y las quinona reductasas¹⁸⁰⁻¹⁸³.

Además, el SFN inhibe la activación de NF- κ B, un factor de transcripción central en la inflamación del proceso y la expresión génica de mediadores proinflamatorios^{59,183}. Esta vía de señalización es redox-sensible, ya que depende del equilibrio existente entre la concentración intracelular de ROS y los niveles GSH. Los cambios en los niveles de GSH por SFN pueden influir en esta acción antiinflamatoria. Otros autores observaron un efecto antiinflamatorio por inducción de la vía Nrf2 de extractos de brotes de brócoli en piel¹⁸⁴ y células nasales¹⁸¹ en sujetos sanos, así como en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)¹⁸⁵.

El 3,3'-DIM ha demostrado reducir la actividad transcripcional de NF- κ B, lo que resulta en niveles más bajos de mediadores inflamatorios como IL-6, en macrófagos activados¹⁸⁶, así como en diferentes modelos de inflamación, en ratones^{187,188}.

Se ha señalado la posible interacción sinérgica de SFN y 3,3-DIM²² y los isotiocianatos erucina y sulforafano son interconvertibles¹⁸⁹, por lo que los efectos antiinflamatorios observados con la ingesta de brotes de brócoli probablemente se

deban a los efectos combinados de todos los productos de hidrólisis de gluconisolatos.

En cuanto a los parámetros antropométricos, después de 10 semanas del consumo diario de brotes de brócoli, el peso y el índice de masa corporal no fueron alterados; sin embargo, la masa grasa corporal disminuyó significativamente tras la ingesta de brotes de brócoli. se ha descrito que el metabolito I3C disminuye la adipogénesis al suprimir las vías de acumulación de los lípidos mediadas por PPAR γ ¹⁹⁰; sin embargo, no detectamos I3C en la orina de 24h, ya que se excreta principalmente en forma de su metabolito 3,3'-DIM.

No observamos una correlación significativa entre el aumento de 3,3'-DIM y la disminución de la masa grasa; no se han realizado más experimentos para corroborar una hipótesis adicional sobre los efectos en la adipogénesis.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- Los brotes de brócoli elicitados con metiljasmonato poseen una concentración elevada de glucosinolatos alifáticos, principalmente de glucorafanina, siendo dos veces superior a la concentración de glucosinolatos indólicos, representados principalmente por la neoglucobrasicina
- El proceso de digestión *in vitro* libera compuestos bioactivos de la matriz del brócoli, que han demostrado capacidad para inhibir enzimas del metabolismo lipídico (lipasas) y glucídico (glucosidasas). Los valores de inhibición más elevados se observan en la fase gástrica, coincidente con la mayor liberación de compuestos fenólicos.
- El método ORAC es más sensible a las variaciones en la capacidad antioxidante de los brotes de brócoli debido al proceso de digestión, siendo más elevados en la fase gástrica. Los niveles de vitamina C se mantienen invariables y no se ven afectados por este proceso.
- El consumo de brotes de brócoli durante 60 días es capaz de reducir los niveles de IL-6 hasta un 40 % en sujetos con sobrepeso, así como los niveles de proteína C reactiva, que se encuentran elevados en esta población. La reducción es mayor cuanto mayor es el estado inflamatorio del individuo.
- Los glucosinolatos de los brotes de brócoli son biodisponibles y se metabolizan en sulforafano y sus derivados de la vía del ácido mercaptúrico, como sulforafano-cisteína y sulforafano-N-acetilcisteína. El 3,3'-diindolilmetano es el metabolito derivado de los glucosinolatos indólicos y sus niveles se correlacionan con el descenso observado en los parámetros inflamatorios.

- La incorporación en la dieta de raciones de brotes de brócoli de 30 g/día pueden servir como coadyuvantes en el tratamiento del sobrepeso y para prevenir patologías con un componente inflamatorio asociado, en la población general.

**CAPÍTULO VIII:
LIMITACIONES Y
FUTURAS LÍNEAS DE
INVESTIGACIÓN**

8. LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

La búsqueda de soluciones para el tratamiento de la obesidad en la edad adulta, es una cuestión de salud pública e individual que preocupa a científicos, a la clase política y a la sociedad en general. En este proyecto se ha evaluado desde el campo y la investigación agroalimentaria, la influencia en la nutrición y la salud, de los brotes de brócoli, alimento y fuente natural de compuestos bioactivos (GLS/ITC), que ejercen funciones sobre dianas fisiológicas de la obesidad y sus condiciones asociadas (metabolismo lipídico, glucídico, inflamación), todas ellas relacionadas también con el riesgo vascular y otras enfermedades crónicas.

Una limitación del presente estudio, ha sido la falta de un grupo control paralelo aleatorizado, que permitiría establecer vínculos de causalidad entre la ingesta de los brotes de brócoli y el cambio en los niveles de los biomarcadores. El seguimiento posterior a la intervención no ha sido un periodo de control ideal ya que pueden influir otros muchos factores pudiendo producir cambios en la persona o el medioambiente. Sin embargo, los cambios tan drásticos observados en los marcadores inflamatorios al final de la intervención y su recuperación posterior podría ser una indicación del efecto beneficioso de los brotes de brócoli.

Por otro lado, el sobrepeso es asociado frecuentemente con otras patologías como la hipertensión, enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina o diabetes tipo II, y debido a todas las complejas interacciones entre ellas, limitamos el estudio a personas con sobrepeso según los criterios de la OMS, pero sin ninguna patología o trastorno clínico diagnosticado. Por lo tanto, nuestro resultado solo se puede extrapolar a este tipo de población y no al resto de personas con alguna patología concomitante.

En la actualidad, existe una evolución importante sobre el conocimiento de los fitoquímicos en las crucíferas entre los científicos, los productores y la industria, así como los consumidores. Las líneas de trabajo se están redirigiendo hacia la mejora de la calidad y de la producción de estos vegetales. Estas investigaciones sobre la biofortificación de Brásicas tiene un gran potencial para el desarrollo de estudios en pacientes y sujetos adultos sobre los efectos específicos de un compuesto en la salud. Los trabajos recientes sugieren que el potencial antiinflamatorio y quimiopreventivo de estos alimentos mediante su inclusión en la dieta requiere establecer recomendaciones dietéticas que incluyan de 3 a 5 raciones al día de frutas y hortalizas, basándonos en la evidencias científicas y epidemiológicas sobre la influencia de los compuestos bioactivos del brócoli y otras crucíferas, sobre los diferentes estados de enfermedades degenerativas y cáncer.

Podríamos decir que son necesarias más investigaciones con brotes de brócoli, incluyendo otros biomarcadores para establecer el papel de este rico y sano producto alimenticio nutritivo, pero estos prometedores resultados apoyan la evidencia actual sobre las propiedades de esta especie "*Brassica oleracea* var. *Italica*" para la prevención de la enfermedad.

**CAPÍTULO IX:
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Minich DM, Bland JS. A review of the clinical efficacy and safety of cruciferous vegetable phytochemicals. *Nutr. Rev.* 2007; 65 (6 Pt 1): 259-267.
2. Nestle M. Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: clinical, dietary, and policy implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94 (21): 11149-51.
3. Brócoli, taxonomía, y descripciones botánicas, morfológicas, fisiológicas y ciclo biológico, www.agroes.es.
4. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística. Avance 2015. Madrid; 2016.
5. Brócoli- Historia - Región de Murcia Digital. <https://images.app.goo.gl/PNtz6yCEALjg7azGA>. www.reg.murcia.com.
6. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. Material vegetal: Coliflor y brócoli. <http://www.mapama.gob.es>.
7. Fuente: Wiki commons.
8. Cultivo y manejo. www.abcagro.es.
9. Kumar S, Andy A. Health promoting bioactive phytochemicals from brassica. *Int Food Res J.* 2012;19(1):141-52.
10. Manchali S, Chidambara Murthy KN, Patil BS. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *J Funct Foods.* 2012;4(1):94-106.
11. Latté KP, Appel K-E, Lampen A. Health benefits and possible risks of broccoli - an overview. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(12):3287-309.

12. Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA, Van Poppel G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact.* 1997;103(2):79-129.
13. Ettlinger, M. G. and Kjaer, A. Sulfur compounds plants. *Recent Adv Phytochem.* 1968; (1): 59-144.
14. Niels Agerbirk, Carl Erik Olsen. Glucosinolate structures in evolution, *Phytochem.* 2012; (77):16-45.
15. Chen Y, Yan X, Chen S. El análisis bioinformático de la red molecular de la biosíntesis de glucosinolatos. *Comput Biol Chem.* 2011; (35):10-18.
16. Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry.* 2001; (56): 5–51.
17. Yan X, Chen S. Regulación del metabolismo de glucosinolatos. 2007; (226):1343-1352.
18. Sonderby IE, Geu-Flores F, Halkier BA. Biosíntesis del descubrimiento glucosinolatos-gen. *Trends Plant Science.* 2010; (15):283-290.
19. Latté, K. P., Appel, K. E., & Lampen, A. Health benefits and possible risks of broccoli—an overview. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(12): 3287-3309.
20. Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C., & García-Viguera, C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharma Biomed Anal* 2006; 41(5): 1508-1522.
21. Domínguez-Perles R, Martínez MC, Carvajal M, et al. Broccoli-derived by-products—A promising source of bioactive ingredients. *J. Food Sci.* 2010; (75): C383-392.
22. Jeffery EH, Araya M. Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochem Rev.* 2009; (8): 283-298.

23. Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5): 904-910.
24. Moreno DA, Pérez-Balibrea S, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, García-Viguera C. Acylated anthocyanins in broccoli sprouts. *Food Chem.* 2010; 123(2):358-63.
25. Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. Glucosinolates in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*) as conditioned by sulphate supply during germination. *J Food Sci.* 2010; 75(8):C673--C677.
26. Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chem.* 2011; 125(2), 348-354.
27. Baenas N, García-Viguera C, Moreno Da. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules.* 2014; 19 (9), 13541-63.
28. Pérez, A. R. Biosíntesis de los glucosinolatos e importancia nutricional humana y funciones de protección a las plantas. *Alimentos hoy.* 2014; 22(31), 64-80.
29. Parada J, Aguilera JM. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* 2007; 72(2):21-32.
30. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(2):220-235.
31. Holst B, Williamson G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19:73-82.

32. Matusheski NV, Jeffery EH. Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J. Agric Food Chem.* 2001; 49 (1): 5743-9.
33. Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine.* 2012; 18 (6), 337-347.
34. Seow A, Yuan JM, Sun CL, Van den Berg D, Lee HP, Yu MC. Isotiocianatos dietéticos, polimorfismos de glutatión S-transferasa y de riesgo de cáncer colorrectal. Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis.* 2002; 23:2055-2061.
35. Hsu CC, Chow WH, Boffeta P, Moore L, Zaridze Z, Moukeria A, et al. Factores de riesgo alimentario. *Am J. Epidemiol.* 2007; 166:62-70.
36. Kirsh VA, Peters U, Mayre ST, Subar AF, Chatterjee N, Jhonson CC, et al. Estudio prospectivo de la ingesta de verduras. *J. Natl Cancer Inst.* 2007; 99:1200-1209.
37. Ruczinski I, Helzlsouer KJ, Shugart YY. Ingesta de verduras crucíferas. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2010; 19:2534-2540.
38. Bosetti, C., Filomeno, M., Riso, P., Polesel, J., Levi, F., Talamini, R., ... & La Vecchia, C. Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. *Annals of Oncology.* 2012; 23(8): 2198-2203.
39. Richman, E. L., Carroll, P. R., & Chan, J. M. Vegetable and fruit intake after diagnosis and risk of prostate cancer progression. *Int J Cancer* 2012; 131(1): 201-210.
40. Wu QJ, Yang Y, Vogtmann E, Wang J, Han LH. Ingesta de verduras crucíferas. *Ann Oncol.* 2013; 24:1079-1087.

41. Liu B, Mao Q, Cao M. Ingesta de verduras crucíferas. *Int J. Urol.* 2012; 19(134-141). Liu B, Mao Q, Lin Y, Xie L. Asociación de ingesta de verduras y riesgo de cáncer. *Mundial. J. Urol.* 2013; 31:127-133.
42. Baenas N, Francisco M, Velasco P, Cartea ME, García-Viguera C, Moreno DA. Bioactive Compounds from Brassicaceae as Health Promoters. In: Luis R. da Silva and Branca Solva (Eds.), *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters: Part 2.* (pp. 27-47). Sharjah, United Arab Emirates: Bentham Science Publishers Ltd. 2016; ISBN: 978-1-68108-244-8.
43. Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen J-G, et al. Keap1-Nrf2 signaling: A target for cancer prevention by sulforaphane. *Top Curr Chem.* 2013; 329:163-78.
44. Vomhof-DeKrey EE, Picklo MJ. The Nrf2-antioxidant response element pathway: A target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem.* 2012;23(10):1201-6.
45. Evans PC. The influence of sulforaphane on vascular health and its relevance to nutritional approaches to prevent cardiovascular disease. *EPMA J.* 2011;2(1):9-14.
46. Turpaev KT. Keap1-Nrf2 signaling pathway: Mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochem.* 2013;78(2):111-26.
47. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Los brotes de brócoli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 94:10367-10372.
48. Fahey, J. W., Wehage, S. L., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W., Egner, P. A., Shapiro, T. A., & Talalay, P. Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Prevention Research.* 2012; 5(4), 603-611.

49. Brooks JD, Paton VG, Vidanes G. Potent induction of phase II enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10 (9): 949-54.
50. Lee, J. H., Moon, M. H., Jeong, J. K., Park, Y. G., Lee, Y. J., Seol, J. W., & Park, S. Y. Sulforaphane induced adipolysis via hormone sensitive lipase activation, regulated by AMPK signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012; 426(4), 492-497.
51. Wu L, Noyan Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, et al. Enfoque dietético para atenuar el estrés oxidativo, la hipertensión y la inflamación en el sistema CV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101:7094-7099.
52. Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L., & Wilson, R. S. Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology.* 2006; 67(8), 1370-1376.
53. Noyan-Ashraf MH, Sadeghinejad Z, Davies GF, et al. Phase II protein inducers in the diet promote healthier aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008; 63 (11): 1168-76.
54. Kallifatidis, G., & Labsch, S. Rausch v, Mattern J, Gladklich J, Moldenhauer G, Büchler MW, Salnikov A and Herr I: Sulforaphane increases drug-mediated cytotoxicity towards cancer stem-like cells of pancreas and prostate. *Mol Ther.* 2011; 19: 188-195.
55. Abbott A. Cáncer: la raíz del problema. *Naturaleza.* 2006; 442:742-743.
56. Kallifatidis, G., Rausch, V., Baumann, B., Apel, A., Beckermann, B. M., Groth, A., ... & Altevogt, P. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF- κ B-induced antiapoptotic signalling. *Gut.* 2009; 58(7): 949-963.
57. Wu L, Noyan Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, et al. Enfoque dietético para atenuar el estrés oxidativo, la hipertensión y la inflamación en el sistema CV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101:7094-7099.

58. Dinkova-Kostova AT, Taladay P. direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52 (Suppl 1): S128-38.
59. Heiss E, Herhaus C, Kilmo K, et al. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem.* 2001; 276 (34): 32008-15.
60. Moon DO, Kim MO, Kang SH, et al. Sulforaphane suppresses TNF- α -mediated activation of NF-kappa B and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett.* 2009; 274 (1): 132-42.
61. Noyan-Ashraf MH, Sadeghinedjad Z, Juurlink BH. Dietary approach to decrease aging-related CNS inflammation. *Nutr Neurosci.* 2005; 8 (2): 101-10.
62. Thejass P, Kuttan G. Immunomodulatory activity of Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate from broccoli (*Brassica oleácea*). *Phytomedicine.* 2007; 14 (7-8): 538-45.
63. Thejass P, Kuttan G. Modulation of cell-mediated immune response in B16F-10 melanoma-induced metastatic tumor-bearing C57BL/6 mice by sulforaphane. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2007; 29 (2): 173-86.
64. Yates, M. S., Tran, Q. T., Dolan, P. M., Osburn, W. O., Shin, S., McCulloch, C. C., ... & Liby, K. T. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis.* 2009; 30(6), 1024-1031.
65. McLain AL, Szweda PA, Szweda LI. Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa. *Free Radic Res.* 2011; 45:29-36.
66. Lee, J. J., Shin, H. D., Lee, Y. M., Kim, A. R., & Lee, M. Y. Effect of broccoli sprouts on cholesterol-lowering and anti-obesity effects in rats fed high fat diet. *Journal of the Korean Society of Food Sci Nutr.* 2009; 38(3): 309-318.

67. Paturi, G., Butts, C., Monroe, J., Nones, K., Martell, S., Butler, R., & Sutherland, J. Cecal and colonic responses in rats fed 5 or 30% corn oil diets containing either 7.5% broccoli dietary fiber or microcrystalline cellulose. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(10): 6510-6515.
68. Mandimika, T., Paturi, G., De Guzman, C. E., Butts, C. A., Nones, K., Monroe, J. A., ... & Ansell, J. Effects of dietary broccoli fibre and corn oil on serum lipids, faecal bile acid excretion and hepatic gene expression in rats. *Food Chem.* 2012; 131(4), 1272-1278.
69. Hang, H. P., Wang, M. L., Chan, M. H., Chiu, Y. S., & Chen, Y. H. Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. *Nutrition.* 2011; 27(4), 463-470.
70. Choi, Y., Um, S. J., & Park, T. Indole-3-carbinol directly targets SIRT1 to inhibit adipocyte differentiation. *Int J Obesity* 2013; 37(6), 881-884.
71. Okulicz, M. Multidirectional time-dependent effect of sinigrin and allyl isothiocyanate on metabolic parameters in rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65(3), 217-224.
72. Herr, I., & Büchler, M. W. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36(5): 377-383.
73. Murashima, M., Watanabe, S., Zhuo, X. G., Uehara, M., & Kurashige, A. Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors.* 2004; 22(1-4): 271-275.
74. Yochum, L., Kushi, L. H., & Meyer, K. Comparison of the protective effects of steamed and cooked broccolis on ischaemia-reperfusion-induced cardiac injury. *Am J Epidemiol.* 1999; 149: 943-949.
75. Mukherjee, S., Gangopadhyay, H., & Das, D. K. Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(2): 609-617.

76. Cornelis, M. C., El-Soehy, A., & Campos, H. GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(3): 752-758.
77. Cheney G. Vitamin U therapy of peptic ulcer. *Calif Med.* 1952; 77 (4): 248-52.
78. Haristoy X, Fahey JW, Scholtus I, et al. Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*. *Planta Med.* 2005; 71 (4): 326-30.
79. Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S, et al. Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prev Res.* 2009; 2(4):353-60.
80. Minich DM, Bland JS. A review of the clinical efficacy and safety of cruciferous vegetable phytochemicals. *Nutr Rev.* 2007; 65 (6 Pt 1): 259-67.
81. Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, et al. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett.* 2008; 262 (2): 153-63.
82. Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A, et al. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2012; 1822(5):753-83.
83. Innamorato, N. G. et al. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.* 2008; 181: 680-689.
84. Jazwa, A. et al. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 14: 2347-2360.

85. Davey, M.W., van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A. and Smirnoff, N. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 825-860.
86. Lee, S. K. and Kader, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Tec.* 2000; 20: 207-220.
87. Salas Martínez, S. Ácido ascórbico en hortalizas de uso frecuente en Navarra. TFG Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra (2018).
88. Block, G., Jense, C., Dietrich, M., Norkus, E. P., Hudes, M. and Packer, L. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *J Am Coll Nutr* 2004; 23: 141-147
89. Domínguez-Perles, R., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. Brassica foods as a dietary source of vitamin C: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014; 54(8): 1076-1091.
90. Vallejo, F., Tomás-Barberán, F., & García-Viguera, C. Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. *Eur Food Res Tec* 2002; 215(4): 310-316.
91. Soengas P, Sotelo T, Velasco P, Cartea ME. Antioxidants properties of Brassica vegetables. In: Teixeira da Silva J (ed) *Functional Plant Science and Biotechnology*, vol 5 (Special Issue 2). Global Science Books. 2011; pp. 43-55.
92. Ibrahim KE, Juvik JA. Feasibility for improving phytonutrient content in vegetable crops using conventional breeding strategies: case study with carotenoids and tocopherols in sweet corn and broccoli. *J Agric Food Chem.* 2009; 57:4636-4644.
93. Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Br J Nutr.* 2003; 90:487-502.

94. Podsedek, A., Sosnowska, D., Redzyna, M., & Anders, B. Antioxidant capacity and content of Brassica oleracea dietary antioxidants. *Int J Food Sci Tec* 2006; 41: 49-58.
95. Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., & Rai, M. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *J Food Comp Anal* 2007; 20(2): 106-112.
96. Olmedilla Alonso, B., Granado Lorenzo, F., Blanco Navarro, I. Carotenoides y salud humana. En: *Informes. Fundación Española de la Nutrición*. 2001; (FEN)
97. Bendich, A., Olson, J.A. Biological actions of carotenoids 1. *The FASEB Journal*. 1989; 3(8): 1927-1932.
98. Biesalski, H. Evidence from Intervention Studies. En: Walter P, Hornig, D, Moser, U (eds): *Functions of vitamins beyond Recommended Dietary Allowances*. *Bibl. Nutr. Dieta*. 2001; 55: 92-134.
99. Fernández-León, A. M., Lozano, M. González, D., Ayuso, M. C. Bioactive compounds content and total antioxidant activity of two Savoy cabbages. *Czech J Food Sci*. 2014; 32: 549-554.
100. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2013; 18(14), 1818-1892.
101. Moreno, D. A., Pérez-Balibrea, S., & García-Viguera, C. Phytochemical quality and bioactivity of edible sprouts. *Nat Prod Commun*. 2006; 1(11), 1934578X0600101120.
102. López Chillón, M., D. Vilaño, C. García Viguera & D. Moreno. *Brócoli: alimento natural con grandes beneficios en salud*. CEBAS-SCIS. Dpto. Ciencias de la Salud. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM) 2016.

103. OMS, (WHO). Obesity and Overweight. Fact Sheet 311. March 2011.
104. International Obesity Taskforce. Obesity. The Global Epidemic. IASO/IOTF análisis (2010). www.iaso.org.
105. Doak, C. M., Wijnhoven, T. M. A., Schokker, D. F., Visscher, T. L. S., & Seidell, J. C. Age standardization in mapping adult overweight and obesity trends in the WHO European Region. *Obes Rev* 2012; 13(2): 174-191.
106. Berghöfer, A., Pischon, T., Reinhold, T., Apovian, C. M., Sharma, A. M., & Willich, S. N. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC public health*. 2008; 8(1), 200.
107. Visscher TLS et al. *Clinical Obesity in Adults and Children*. 3rd Ed. 2010; ISBN 078-1-4051-8226-3.
108. Frühbeck, G. The Sir David Cuthbertson Medal Lecture Hunting for new pieces to the complex puzzle of obesity: The Annual Meeting of the Nutrition Society and the British Association for Parenteral and Enteral Nutrition was held at The International Centre, Telford on 16–17 November 2005. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2006; 65(4), 329-347.
109. Kopelman PG, Caterson ID, Dietz WH. *Clinical Obesity in Adults and Children*. 3rd Ed. John Wiley & Sons, UK, 2010; ISBN 978-1-4051-8226-3.
110. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of obesity. *Circulation*. 2009; 120(16): 1640-5.
111. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12):1595-607.

112. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001; 24(4):683-9]
113. De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991; 14(3):173-94.
114. Juan Carlos Lizarzaburu Robles. Síndrome Metabólico: concepto y aplicación práctica. *An Fac med*. 2013;74(4):315-20.
115. Lorenzo C, Serrano-Rios M, Martinez-Larrad MT, Gonzalez-Sanchez JL, Seclen S, Villena A, et al. Geographic variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III definitions of the metabolic syndrome in nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2006; 29(3):685-91.
116. Garber AJ, Handelsman y, Einhorn D, Bergman DA, Bloomgarden ZT, Fonseca V, et al. Diagnosis and management of prediabetes in the continuum of hyperglycemia: ¿when do the risks of diabetes begin? A consensus statement from the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocr Pract*. 2008; 14(7):933-46.
117. Fernández-Bergés, D., de León, A. C., Sanz, H., Elosua, R., Guembe, M. J., Alzamora, M., ... & Lama, C. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2012; 65(3), 241-248.
118. World Health Organization. Obesity and overweight. Updated March 2013 cited; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
119. Ikeoka, D., Mader, J. K., & Pieber, T. R. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010; 56(1), 116-121.

120. Vazzana, N., Santilli, F., Sestili, S., Cuccurullo, C., & Davi, G. Determinants of increased cardiovascular disease in obesity and metabolic syndrome. *Curr Med Chem.* 2011; 18(34): 5267-5280.
121. Lumeng, C. N., & Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2011; 121(6): 2111-2117.
122. Brooks, G. C., Blaha, M. J., & Blumenthal, R. S. Relation of C-reactive protein to abdominal adiposity. *Am J Cardiol.* 2010; 106(1): 56-61.
123. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-1695.
124. Kelsey, N. A., Wilkins, H. M., & Linseman, D. A. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules.* 2010; 15(11): 7792-7814.
125. Blundell, J. Making claims: functional foods for managing appetite and weight. *Nature Reviews Endocrinology.* 2010; 6(1): 53-56.
126. Hofbauer, K. G., Nicholson, J. R., & Boss, O. The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47: 565-592.
127. Clément, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C. A., ... & Vidal, H. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *The FASEB Journal.* 2004; 18(14): 1657-1669.
128. Wisse, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(11): 2792-2800.
129. Hirai, S., Takahashi, N., Goto, T., Lin, S., Uemura, T., Yu, R., & Kawada, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators of inflammation*, 2010.
130. Hartley, L., Igbinedion, E., Holmes, J., Flowers, N., Thorogood, M., Clarke, A., ... & Rees, K. Increased consumption of fruit and vegetables for the

primary prevention of cardiovascular diseases. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2013; (6).

131. Chedraui, P., & Pérez-López, F. R. Nutrition and health during mid-life : searching for solutions and meeting challenges for the aging population. *Climacteric*. 2013; 16(supl 1): 85-95.

132. Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C. Influence of light on health-promoting phytonutrients in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*). *J Sci Food Agric*. 2008; 88: 904-910.

133. Baenas, N., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(45): 11409-11420.

134. Baenas N, Villaño D, García-Viguera C, Moreno DA. Optimizing elicitation and seed priming to enrich broccoli and radish sprouts in glucosinolates. *Food Chem*. 2016; 204: 314-319.

135. Cramer JM, Jeffery EH. Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutr Cancer* 2011; 63(2):196-201.

136. Domínguez-Perles R, Medina S, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil-Izquierdo A. A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chem*. 2014; 143:132-8.

137. Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. A. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur Food Res Tec*. 2002; 214(2): 155-159.

138. Cerdá B, Espín J, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán F. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one

derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* 2004; 43(4):205-220.

139. Stockham K, Paimin R, Orbell JD, Adorno P, Buddhadasa S. Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labelling. *J Food Compos Anal* 2011; 24: 686-691.

140. Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 2001; 73(2):239-244.

141. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol-Leb* 1995; 28(1):25-30.

142. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *Food Sci Technol-Leb* 1997; 30(6):609-615.

143. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Wodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) Assays: A comparative study. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3122-3128.

144. Dávalos A, Gómez-Cordoves C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem* 2004; 52(1):48-54.

145. Lucas-Abellán C, Mercader-Ros MT, Zafrilla MP, Fortea MI, Gabaldón JA, Núñez-Delicado E. ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric Food Chem* 2008; 56(6): 2254-2259.

146. Gironés-Vilaplana, A., Villaño, D., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. New isotonic drinks with antioxidant and biological capacities from berries (maqui, açai and blackthorn) and lemon juice. *Int J Food Sci Nutr*. 2013; 64(7): 897-906.

147. Chan, H. H., Sun, H. D., Reddy, M. V. B., & Wu, T. S. Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* CA Meyer var. major. *Phytochem.* 2010; 71(11-12): 1360-1364.
148. Services, Food and Drug Administration (FDA), US Department of Health and Human (2001). Guidance for industry: Bioanalytical method validation.
149. Palermo M, Pellegrini N, Fogliano V. The Effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *J Sci. Food Agric.* 2014; 94: 1057-70.
150. Vermeulen M, Kleopping-Ketelaars IW, Van den Berg R, Vaes WH. Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *J Agric Food Chem.* 2008; 56:10505-9.
151. Baenas N, Suárez-Martínez C, García-Viguera C, Moreno DA. Bioavailability and new biomarkers of cruciferous sprouts consumption. *Food Res Int.* 2017; 100:497-503.
152. Baenas N, García-Viguera C, Moreno Da. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules.* 2014; 19 (9), 13541-63.
153. Mena P, Gil-Izquierdo Á, Moreno DA, Martí N & García-Viguera C., Assessment of the melatonin production in wines. *LWT-Food Science Technology.* 2012; 47 (1): 13-8.
154. Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem.* 11; 3426-3431.
155. Podsedek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology.* 2007; 40(1), 1-11.
156. Kurilich, A. C., Jeffery, E. H., Juvik, J. A., Wallig, M. A., & Klein, B. P. Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using

the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(18), 5053-5057.

157. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 activators: can the Clinician's expectation Be matched by the reality? *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 7857186-7857186.

158. Rychlik, J., Olejnik, A., Olkowicz, M., Kowalska, K., Juzwa, W., Myszkka, K., ... & Grajek, W. Antioxidant capacity of broccoli sprouts subjected to gastrointestinal digestion. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(9): 1892-1902.

159. Wang, Y., Huang, S., Shao, S., Qian, L., & Xu, P. Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α -amylase in vitro. *Ind Crop Prod.* 2012; 37(1): 520-526.

160. Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., ... & Chen, H. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules.* 2016; 21(10): 1374.

161. Mollica, A., Stefanucci, A., Zengin, G., Locatelli, M., Macedonio, G., Orlando, G., ... & Chiavaroli, A. Polyphenolic composition, enzyme inhibitory effects ex-vivo and in-vivo studies on two Brassicaceae of north-central Italy. *Biomed Pharmacother.* 2018; 107: 129-138.

162. Florez, J., Antonio Armijo, J., & Mediavilla, Á. *Farmacología Humana.* 6. Elsevier. 2014.

163. Lavelli, V., Harsha, P. S., Ferranti, P., Scarafoni, A., & Iametti, S. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian α -glucosidase and α -amylase—effect of food matrix and processing on efficacy. *Food Funct.* 2016; 7(3): 1655-1663.

164. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in dysfunction. *PloS One.* 2016; 11. E154003-e0154003.

165. Jorge ASB, Jorge GC, Paraiso AF, Franco RM, Vieira LJ, Hilzenderger AM, et al. Brown and white adipose tissue expression of IL6, UCP1 and SIRT1 are associated with alterations in clinical, metabolic and anthropometric parameters in obese humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017; 125: 163-70.

166. Bienvenu J, Monneret G, Fabien N, REvillard JP. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab Med*. 2000; 38:267-85.

167. Whelton SP, Roy P, Astor BC, Zhang L, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, et al. Elevated high-sensitivity C-Reactive protein as a risk marker of the attenuated relationship between serum cholesterol and cardiovascular events at older age. *Am J Epidemiol*. 2013; 178:1076-84.

168. Medina S, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil JI, Gil-Izquierdo A. The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *Food Chem*. 2015; 173:1187-94.

169. Riso P, Vendrame S, Del Bo C, Martini D, Martinetti A, Seregni E, et al. Effect of 10-day broccoli consumption on inflammatory status of young healthy smokers. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; 65:106-11.

170. Navarro SL, Schwarz Y, Song X, Wang C-Y, Cheng C, Trudo SP, et al. Cruciferous vegetables have variable effects on biomarkers of systemic inflammation in a randomized controlled trial in healthy young adults. *J Nutr*. 2014; 144:1850-7.

171. Bones AM, Rossiter JT. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochem*. 2006; 67:1053-67.

172. Angelino D, Jeffery E. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: focus on glucoraphanin. *J Funct Foods*. 2014; 7:67-76.

173. Joseph MA, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Bowman ED, Zhang Y, et al. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr Cancer*. 2004; 50:206-13.
174. Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res*. 2007; 55:224-36.
175. Sayeed MA, Bracci M, Lazzarini R, Tomasetti M, Amati M, Lucarini G, et al. Use of potential dietary phytochemicals to target miRNA: promising option for breast cancer prevention and treatment? *J Funct Foods*. 2017; 28:177-93.
176. Fujioka N, Ainslie-Waldman CE, Upadhyaya P, Carmella SG, Fritz VA, Rohwer C, et al. Urinary 3,3'-diindolylmethane: a biomarker of glucobrassicin exposure and indole-3-carbinol uptake in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014; 23:282-7.
177. Abellán Alemán J, Zafrilla Rentero MP, Montoro-García S, et al. Adherence to the "Mediterranean Diet" in Spain and Its Relationship with Cardiovascular Risk (DIMERICA Study). *Nutrients*. 2016;8(11):680.
178. Villaño, D., López-Chillón, M. T., Zafrilla, P., & Moreno, D. A. Bioavailability of broccoli sprouts in different human overweight populations. *J Funct Foods*. 2019; 59: 337-344.
179. Houghton, C. A., Fassett, R. G., & Coombes, J. S. Sulforaphane and other nutrigenomic Nrf2 activators: can the clinician's expectation be matched by the reality? *Oxid Med Cell Longev*. 2016.
180. Hu C, Eggler AL, Mesecar AD, van Breemen RB. Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24:515-21.
181. Riedl MA, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clin Immunol* 2009; 130: 244-51.

182. Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Dose J, Schultheiss G, Rimbach G. Antiinflammatory potential of allyl-isothiocyanateerole of Nrf2, NF-(k) B and microRNA-155. *J Cell Mol Med.* 2012; 16:836-43.
183. Sturm C, Wagner AE. Brassica-derived plant bioactives as modulators of chemopreventive and inflammatory signaling pathways. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
184. Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Wade KL, Jenkins SN, Shapiro TA, Fuchs EJ, et al. Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev: A Publ Am Assoc Cancer Res Cospons Am Soc Prev Oncol.* 2007; 16:847-51.
185. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S, Kong X, Yarmus L, Brown RH, et al. Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci Transl Med.* 2011;3. 78ra32-78ra32.
186. Cho HJ, Seon MR, Lee YM, Kim J, Kim JK, Kim SG, et al. 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Nutr.* 2008; 138:17e-3.
187. Jeon E-J, Davaatseren M, Hwang J-T, Park JH, Hur HJ, Lee AS, et al. Effect of oral administration of 3,3'-diindolylmethane on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. *J Agric Food Chem.* 2016; 64:7702-9.
188. Kim YH, Kwon H-S, Kim DH, Shin EK, Kang YH, Park JH, et al. 3,3'-diindolylmethane attenuates colonic inflammation and tumorigenesis in mice. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:1164-73.
189. Clarke JD, Hsu A, Riedl K, Bella D, Schwartz SJ, Stevens JF, et al. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacol Res.* 2011; 64:456-63.

190. Choi Y, Kim Y, Park S, Lee KW, Park T. Indole-3-carbinol prevents diet-induced obesity through modulation of multiple genes related to adipogenesis, thermogenesis or inflammation in the visceral adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem.* 2012; 23:1732-9.

CAPÍTULO X: ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO

ANEXO II

INFORMADO

Yo, con DNI:

DECLARO:

Heber sido informado/a del estudio "Efectos del consumo de brotes de brócoli en la población obesa" y de los procedimientos que se van a llevar a cabo en la investigación. Los investigadores que van a acceder a mis datos personales y a los resultados de las pruebas son los integrantes en el proyecto.

Asimismo, he podido hacer preguntas del estudio, comprendiendo que me presto de forma voluntaria al mismo y que en cualquier momento puedo abandonarlo sin que me suponga perjuicio de ningún tipo.

CONSIENTO:

- 1.-) Someterme a las siguientes pruebas exploratorias: encuestas de hábitos nutricionales y de estilo de vida, medidas antropométricas, análisis de sangre y de orina.
- 2.-) El uso de los datos obtenidos según lo indicado en el párrafo siguiente:
En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones a las que se va a someter pasará a formar parte del fichero automatizado INVESALUD, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN LAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO CIENCIAS EXPERIMENTALES Y CIENCIAS DE LA SALUD. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.

En Guadalupe (Murcia) a de de

Fdo:

Anexo 2. Encuestas hábitos dietéticos y estilo de vida

ENCUESTA DE SALUD

Identificación:

Sexo:

Peso:

Talla:

IMC:

Perímetro de la cintura:

FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Fumador

A sí

B no

C Exfumador

1. ¿Cuántos cigarrillos fuma al día??

5.9	Ninguno, Nunca fumo
B	Sólo fumo de forma ocasional
C	Menos de 5 cigarrillos al día
D	Entre 5-20 cigarrillos al día
E	Más de 20 cigarrillos al día

Tiempo en años.....

2. ¿Tiene el colesterol elevado?

5.10	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

3. ¿Tiene elevados los triglicéridos?

5.11	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

4. ¿Es diabético?

5.12	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

5. ¿Tiene hipertensión?

5.13	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

6. ¿Dedica un tiempo a realizar ejercicio físico, incluyendo actividades como caminar o subir y bajar escaleras?

5.14	Todos los días
B	4-5 veces por semana
C	2-3 veces por semana
D	No

7. Si realiza ejercicio físico ¿Cuántas horas al día hace ejercicio físico?

5.15	Más de 2 horas
B	2 horas
C	1 hora y media
D	Media hora
E	Menos de media hora

8. Cuanto tiempo al día dedica a ver la televisión

5.16	30 minutos o menos
B	Entre 1-2 horas
C	Entre 2-3 horas
D	Más de 3 horas

9. ¿Es vegetariano?

5.17	No
B	Si

10. ¿Consumes suplementos nutricionales o vitamínicos?

5.18	No
B	Si
C	Ocasionalmente

11. ¿Qué estudios ha cursado?

5.19	Estudios primarios
B	Bachiller
C	Estudios universitarios de grado medio
D	Estudios universitarios de grado superior

ENCUESTA DE DIETA MEDITERRÁNEA

1. ¿Consumes cereales (arroz, pasta, pan, galletas, cereales de desayuno, etc....)?

5.20	Más de 7 raciones al día
B	5-7 raciones al día
C	3-4 raciones al día
D	1-2 raciones al día
E	Nunca

2. ¿Cuántas piezas de frutas consumes al día?

5.21	Más de 6 raciones al día
B	5-6 raciones al día
C	3-4 raciones al día
D	1-2 raciones al día
E	Ninguna

3. ¿Cuántas veces a la semana consumes legumbres?

5.22	Más de 4 veces a la semana
B	3-4 veces por semana
C	1-2 veces por semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

4. ¿Cuántas veces consumes verduras y hortalizas al día?

5.23	Más de 2 veces al día
B	2 veces al día
C	1 vez al día
D	Menos de una vez al día
E	Nunca

5. ¿Cuántas veces a la semana consume pescado?

5.24	Más de 4 veces a la semana
B	3-4 veces por semana
C	1-2 veces por semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

6. ¿Cuántas veces a la semana consume carne de ave?

5.25	Más de 4 veces a la semana
B	3-4 veces por semana
C	1-2 veces por semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

7. ¿Cuántas veces a la semana consume otro tipo de carne ?

5.26	Más de 4 veces a la semana
B	3-4 veces por semana
C	1-2 veces por semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

8. ¿Cuántas veces al día consume leche y derivados lácteos?

5.27	Más de 4 raciones al día
B	3-4 raciones al día
C	1-2 raciones al día
D	Nunca

9. ¿Qué tipo de aceite consume habitualmente?

5.28	Aceite de oliva
B	Aceite de semillas
C	Aceite de oliva y de semillas

10. ¿Utiliza aceite de oliva para cocinar?

5.29	Diariamente
B	3-5 veces a la semana
C	1-2 veces a la semana
D	Menos de 1 vez a la semana
E	Nunca

11. ¿Consume normalmente frutos secos?

5.30	Más de 5 veces a la semana
B	3-4 veces a la semana Menos de una vez a la semana
C	1-2 veces a la semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

12. ¿Cuántos huevos consume a la semana?

5.31	Más de 5 huevos a la semana
B	3-5 huevos a la semana
C	1-2 huevos a la semana
D	Menos de un huevo a la semana
E	Nunca

13. ¿Cuántas veces a la semana consume embutido?

5.32	Todos los días
B	3-5 veces por semana
C	1-2 veces por semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

14. ¿Consume normalmente vino tinto? (125 mL, un vasito de vino)

5.33	Más de 7 vasitos de vino a la semana
B	4-7 vasitos de vino a la semana
C	1-3 vasitos de vino a la semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

15. ¿ Con que frecuencia consume productos de bollería industrial

5.34	Diariamente
B	3 o 4 veces a la semana
C	1-2 veces a la semana
D	Menos de una vez a la semana
E	Nunca

Anexo 3. Comité de Ética CSIC, UCAM



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



COMITE DE ÉTICA
Subcomité de Bioética

INFORME DE EVALUACIÓN BIOÉTICA / BIOSEGURIDAD

El Subcomité de Bioética del CSIC ha evaluado los aspectos bioéticos y de bioseguridad de investigación propuesta (Experimentación con humanos, muestras humanas, datos procedentes de población humana que requieran protección, Organismos modificados genéticamente - OMGs - y/o Agentes biológicos de riesgo), y según los términos definidos en la misma, no ha encontrado ninguna objeción al respecto que pueda constituir un impedimento para su desarrollo. Y para que conste a los efectos oportunos, expide el presente informe de evaluación en Madrid, a catorce de octubre de 2014.

Datos del Investigador principal

Nombre	MORENO FERNÁNDEZ, DIEGO ÁNGEL
Centro / Instituto	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura – CEBAS (Murcia)
Teléfono	968396369
Correo electrónico	dmoreno@cebas.csic.es

Datos de la Investigación propuesta

Título	Efectos del consumo de brotes de brócoli en población obesa
Convocatoria	MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD (MINECO) Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia – Subprograma Estatal de Generación del Conocimiento Proyectos I+D 2013
Referencia	AGL2013-46247-P

Evaluación

FAVORABLE

Este informe solo tiene validez para la investigación propuesta y en las condiciones en ella descritas. Cualquier cambio que afecte a las implicaciones bioéticas y/o de bioseguridad de la misma, invalida este informe y deberá ser puesto en conocimiento de este Subcomité para su valoración.



 Miguel García Guerrero
 Presidente del Comité de Ética del CSIC



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

DATOS DEL PROYECTO

Título:	1. Efectos del consumo de brotes de brócoli en población obesa.	
Investigador Principal	Nombre P. P. Dra. Pilar Zafra Rentero y Diego Moreno (CEBAS)	Correo-e

INFORME DEL COMITÉ

Fecha	10/06/2014
--------------	------------

Tipo de Experimentación

Investigación experimental clínica con seres humanos.	<input checked="" type="checkbox"/>
Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, tejidos embrionarios o fetales.	<input type="checkbox"/>
Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos.	<input type="checkbox"/>
Investigación observacional con seres humanos o uso de datos personales, información genética, etc.	<input checked="" type="checkbox"/>
Experimentación animal.	<input type="checkbox"/>
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas.	<input type="checkbox"/>
Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs).	<input type="checkbox"/>

Comentarios Respecto al tipo de Experimentación
Nada Obsta

Comentarios Respecto a la metodología de experimentación
Nada Obsta

Anexo 4. Composición nutricional y análisis de seguridad alimentaria

Tabla nutricional de brotes de brócoli		
	Valor por 100 g	Unidad
Valor energético	89	KJ
	21	kcal
Nutrientes		
Humedad	93,3	g
Proteínas	2,86	g
Grasas totales	0,43	g
Hidratos de carbono	0,3	g
Fibra alimentaria	2,47	g
Cenizas	0,641	g
Minerales		
Cadmio, Cd	< 0.005	mg/kg
Plomo, Pb	< 0.005	mg/kg
Sodio, Na	0,07	mg
Seguridad alimentaria		
Microbiología		
10-jul-15		
Recuento de Coliformes totales	$5,2 \times 10^8$	ufc/g
Recuento de Escherichia coli (β -D-glucuronidasa positivo)	$1,0 \times 10^7$	ufc/g
Recuento de Mohos y levaduras	< 10	ufc/g
10-jun-15		
Recuento de Aerobios mesofilos	$5,2 \times 10^8$	ufc/g
Recuento de Coliformes totales	< 10	ufc/g
Recuento de Escherichia coli (β -D-glucuronidasa positivo)	< 10	ufc/g
Recuento de Mohos y levaduras	$2,9 \times 10^2$	ufc/g
Producción		
Tratándose de una producción ecológica no existen organismos tóxicos presentes en los brotes, además, estos se encuentran enriquecidos en compuestos bioactivos con técnicas de "elicitación", consideradas como sostenibles por tratarse de compuestos naturales, presentes en las plantas.		

