

Tesis Doctoral

Uso de compuestos bioactivos en situaciones de retraso en el crecimiento y resistencia periférica a la acción de la insulina



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2024

Elvira Carolina Ortiz Moral

Directores:

D^a. M^a Dolores Girón González

D. Manuel Manzano Martín

Estudio financiado por:



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Elvira Carolina Ortiz Moral
ISBN: 978-84-1195-326-9
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92510>

Memoria de la Tesis Doctoral “Uso de compuestos bioactivos en situaciones de retraso en el crecimiento y resistencia periférica a la acción de la insulina”.

Que presenta la Gda. Elvira Carolina Ortiz Moral para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

Prof. Dra. D^a. M^a Dolores Girón González

Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Granada

Dr. D. Manuel Manzano Martín

Research Scientist

Abbott Nutrition R&D, Granada

Por la doctoranda:

Gda. D^a Elvira Carolina Ortiz Moral

D^a. M^a Dolores Girón González, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada.

D. Manuel Manzano Martín, Research Scientist, Abbott Nutrition R&D, Granada.

Certifican:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral “Uso de compuestos bioactivos en situaciones de retraso en el crecimiento y resistencia periférica a la acción de la insulina”, han sido realizados bajo nuestra dirección por la Graduada D^a. Elvira Carolina Ortiz Moral y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a 8 de febrero de 2024.

La doctoranda D^ª. Elvira Carolina Ortiz Moral y los directores de la Tesis: Dra. D^ª. M^ª Dolores Girón González y Dr. D. Manuel Manzano Martín

Garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 8 de febrero de 2024.

Fdo.: Prof. Dra. D^ª. M^ª Dolores Girón González

Directora de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dr. D. Manuel Manzano Martín

Director de la Tesis Doctoral

Gda. D^ª Elvira Carolina Ortiz Moral

Doctoranda

A mi madre y mi hermana

All children, except one, grow up. They soon know that they will grow up, and the way Wendy knew was this. One day when she was two years old, she was playing in a garden and she plucked another flower and ran with it to her mother. I suppose she must have looked rather delightful, for Mrs. Darling put her hand to her heart and cried, "Oh, why can't you remain like this forever!" This was all that passed between them on the subject, but henceforth Wendy knew that she must grow up. You always know after you are two. Two is the beginning of the end.

The adventures of Peter Pan

J.M. Barrie.

Índice

1	RESUMEN	18
2	INTRODUCCIÓN	22
2.1	CRECIMIENTO	22
2.1.1	ETAPAS DEL CRECIMIENTO. IMPORTANCIA DE LOS 1000 PRIMEROS DÍAS.	25
2.1.2	TÉCNICAS PARA DETERMINAR EL CRECIMIENTO	27
2.1.3	FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO	28
2.2	RETRASO EN EL CRECIMIENTO	30
2.3	CRECIMIENTO COMPENSATORIO O DE RECUPERACIÓN: <i>CATCH-UP GROWTH</i>	32
2.3.1	PERFILES QUE EXPERIMENTAN <i>CATCH-UP GROWTH</i> Y SUS IMPLICACIONES METABÓLICAS: <i>CATCH-UP FAT</i>	35
2.3.1.1	Mecanismos implicados en el <i>catch-up fat</i>	37
2.4	SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS. POSIBILIDADES DE ACTUACIÓN ANTE EL <i>CATCH-UP FAT</i>	43
2.5	IMPORTANCIA DE LA NUTRICIÓN EN EL CRECIMIENTO	45
2.5.1	PROTEÍNAS	46
2.5.2	LÍPIDOS	48
2.5.3	CARBOHIDRATOS	49
2.5.3.1	Prevalencia e impacto clínico de las enfermedades no transmisibles: diabetes	50
2.5.3.2	Carbohidratos: definición y clasificación	51
2.5.3.3	Concepto y relevancia de índice y carga glicémicas	53
2.5.3.4	Elección del tipo de carbohidrato	55

2.5.3.5	Mecanismos implicados en el control glicémico de los carbohidratos de digestión lenta y de baja digestibilidad	56
2.5.3.6	Elección del tipo de carbohidrato. Potencial de los carbohidratos	58
3	OBJETIVOS	61
4	MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.1	DISEÑO DEL EXPERIMENTO	63
4.1.1	PERÍODO DE RESTRICCIÓN	64
4.1.2	PERÍODO DE REALIMENTACIÓN	65
4.2	DIETAS EXPERIMENTALES	66
4.2.1	DIETAS HUMANIZADAS	68
4.3	COMPOSICIÓN CORPORAL	69
4.4	TEST DE AGARRE	70
4.5	CALORIMETRÍA INDIRECTA	70
4.6	TOMA DE MUESTRAS	71
4.7	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	72
4.8	ANÁLISIS DE <i>WESTERN BLOT</i>	73
4.9	PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	74
4.10	CUANTIFICACIÓN DE GLUCÓGENO	75
4.11	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CREATINA QUINASA (CK)	76
4.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
5	RESULTADOS	78

5.1	PERÍODO DE RESTRICCIÓN	78
5.1.1	DATOS DE INGESTA, MORFOMÉTRICOS, DE COMPOSICIÓN CORPORAL Y FUERZA	78
5.2	PERÍODO DE REALIMENTACIÓN	81
5.2.1	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE LA MORFOMETRÍA DE LOS ANIMALES	81
5.2.2	INGESTA DE DIETAS EXPERIMENTALES	83
5.2.3	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y LA FUERZA	85
5.2.4	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE LA LIBERACIÓN DE ADIPOQUINAS	89
5.2.5	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS SÉRICOS	90
5.2.6	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE EL INTESTINO	91
5.2.7	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE LA LIBERACIÓN DE DIFERENTES HORMONAS	93
5.2.8	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO	94
5.2.9	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO SÉRICO	95
5.2.10	EFFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE PARÁMETROS SÉRICOS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA	96
5.2.11	EFFECTOS DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA, SEÑALIZACIÓN Y RUTAS METABÓLICAS EN TEJIDO ADIPOSO	98
5.2.12	EFFECTOS DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA, SEÑALIZACIÓN Y RUTAS METABÓLICAS EN HÍGADO	102
5.2.13	EFFECTOS DE LA DIETA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA, SEÑALIZACIÓN Y RUTAS METABÓLICAS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO	107
6	DISCUSIÓN	115
6.1	EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL ANIMAL	116
6.2	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL ANIMAL	117
6.2.1	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE EL PESO CORPORAL, LA LONGITUD Y LA INGESTA	117

6.2.2	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL	118
6.2.2.1	Efecto de la realimentación sobre la función endocrina del tejido adiposo	119
6.2.2.2	Efecto de la realimentación sobre el estado de inflamación crónica de bajo grado	121
6.3	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE LA FUNCIONALIDAD INTESTINAL	122
6.3.1	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE HORMONAS INTESTINALES	123
6.4	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE EL METABOLISMO	126
6.4.1	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO	126
6.4.2	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO	127
6.4.3	EFFECTO DE LA REALIMENTACIÓN SOBRE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA	128
6.5	RUTAS DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR IMPLICADAS EN EL EFFECTO DE LAS DIETAS SOBRE EL METABOLISMO	129
6.5.1	EXPRESIÓN GÉNICA, SEÑALIZACIÓN Y RUTAS METABÓLICAS EN EL TEJIDO ADIPOSO	130
6.5.2	EXPRESIÓN GÉNICA, SEÑALIZACIÓN Y RUTAS METABÓLICAS EN EL TEJIDO HEPÁTICO	136
6.5.3	EXPRESIÓN GÉNICA, SEÑALIZACIÓN Y RUTAS METABÓLICAS EN EL TEJIDO MUSCULAR	141
7	CONCLUSIONES	153
8	RESUMEN GRÁFICO	156
9	ÍNDICE DE FIGURAS	160
10	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	168
11	BIBLIOGRAFÍA	172

1 RESUMEN

El crecimiento es un período fundamental en la vida de todo individuo: en él se producen numerosos cambios, tanto biológicos como físicos. El retraso en el crecimiento puede tener múltiples causas, la más común es la nutrición. UNICEF estimó que en 2021 el 22% de los niños menores de 5 años, presentaban algún tipo de retraso en el crecimiento. Cuando las condiciones que causan el retraso se restablecen, los individuos comienzan a experimentar un crecimiento rápido compensatorio conocido como *catch-up growth*. En rasgos generales, es beneficioso para alcanzar la talla programada genéticamente, pero se ha visto que estos individuos se caracterizan por tener el denominado “fenotipo ahorrador” que permanece en la edad adulta y que implica un mayor riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. La explicación a esta tendencia, es un mecanismo que aparece en respuesta a la reducción de las reservas de grasa en el que se produce una supresión de la termogénesis en el músculo esquelético, con el objetivo de desviar la glucosa al tejido adiposo y rellenar las reservas grasas. Este proceso está regulado por una serie de señales: entre ellas la resistencia a la leptina y la insulina. En esta Tesis Doctoral se ha considerado prometedor la introducción, en forma de suplemento nutricional, de carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico por las características beneficiosas en términos de control de la glucemia y deposición grasa que presentan, con el objetivo de prevenir las consecuencias *negativas del catch-up growth*.

El modelo animal que se ha empleado consta de un período de desnutrición calórica en el que las ratas ingerían el 70% de lo que tomaban los animales controles. Tras este período, los animales restringidos se dividieron en dos grupos experimentales. En ambos grupos, el 50% de la energía provenía de la dieta estandarizada de roedor. En el grupo RDC, el otro 50% de la energía era proveniente de una mezcla de carbohidratos de rápida digestibilidad y alto índice glicémico. En el caso del grupo SDC, este 50% era de una mezcla de carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico.

Tras la restricción calórica llevamos a cabo la intervención nutricional y apreciamos una mayor deposición grasa en los animales alimentados con la dieta RDC y mayores niveles séricos de leptina. En el estudio de calorimetría indirecta se puso de manifiesto una menor flexibilidad metabólica para éste mismo grupo, asociada a la peor sensibilidad a la insulina apreciada en la relación de insulinemia frente a glucemia. Por su parte, el grupo SDC mostró mayores valores séricos de GLP-1, que se relaciona directamente con el perfil de carbohidratos de la dieta.

En cuanto a las rutas de señalización en el tejido adiposo, el grupo RDC mostró una menor sensibilidad a la insulina y un mayor uso glucolítico de la glucosa, acompañado de una sobreexpresión de PC y AGS responsables de la síntesis de *novo* de ácidos grasos y finalmente de triglicéridos. En el grupo SDC, apreciamos un uso más eficiente de la glucosa no asociada a una mayor adiposidad. Los efectos sobre el uso de combustibles por parte del tejido adiposo en el grupo SDC parecen estar regulados principalmente por la vía mediada por PPAR γ .

El análisis de las rutas de señalización implicadas en el tejido hepático muestra una disminución del flujo glucolítico (PKM $\frac{1}{2}$) en el grupo SDC que implica un menor uso de la glucosa como combustible metabólico que, junto a la menor expresión de AGS, previene el almacenamiento hepático de triglicéridos. Además, en este grupo se aprecia un mayor almacenamiento de glucógeno con respecto al grupo RDC.

En el caso del músculo, la dieta SDC actúa a través de PPAR δ al favorecer una mayor expresión de PDK4, que regula negativamente el catabolismo de la glucosa. Junto a la mayor expresión de Cpt1b confirma lo observado en el equipo de calorimetría indirecta y es que hay un cambio en el uso de los ácidos grasos como combustible metabólico. Esto refleja una mejor sensibilidad a la insulina, que concuerdan con la mayor fosforilación de Akt y la menor expresión de ChREBP observada en este grupo. Estos datos, junto a una mayor reserva de glucógeno, reflejan una mejor flexibilidad metabólica del tejido. Además, hallamos una mejor

funcionalidad muscular ya que estos animales obtuvieron mejores datos en la prueba de agarre que los animales del grupo RDC, y los valores de MEF2D y CK así lo avalan.

Por lo tanto, los carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico, administrados en forma de suplementación tras una restricción calórica, permiten prevenir los efectos negativos del *catch-up growth*, mejorando la sensibilidad a la insulina y asegurando una adecuada flexibilidad metabólica de los tejidos.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Crecimiento

En el contexto de los primeros años de vida de un individuo, el crecimiento puede definirse como un proceso constante e irreversible de aumento de la masa corporal. A lo largo de los años, este proceso lleva a la maduración de todos los órganos y sistemas y confiere al individuo una capacidad funcional completa, preparándolo para la supervivencia y la reproducción [5, 6]. El crecimiento es un proceso tanto cuantitativo como cualitativo. Desde una perspectiva cuantitativa o biológica, se caracteriza macroscópicamente por un cambio en la apariencia y el tamaño del organismo. Histológicamente, se produce un aumento en la cantidad y complejidad de las células y moléculas extracelulares, junto con una diversidad creciente de sistemas celulares. A nivel bioquímico, existe una interacción molecular que genera reacciones y rutas metabólicas cada vez más complejas. Además, desde una perspectiva bioenergética, el crecimiento requiere a su vez un aporte continuo de energía que alimente todos los eventos mencionados. En definitiva, se trata de un proceso fisicoquímico, lo cual lo diferencia de cualquier otro aumento de masa, permitiendo finalmente que la célula inicial o cigoto se transforme en un adulto [6].

El desarrollo, por otro lado, es un proceso cualitativo fundamental en el cual se incrementa la capacidad psicomotora [6]. Este proceso está intrínsecamente relacionado con el crecimiento biológico y conduce a una mejor organización y complejidad de todas estas estructuras, confiriéndole una maduración funcional al organismo [7]. A diferencia del crecimiento, el cual cesa tras la adolescencia, el desarrollo ocurre desde la etapa neonatal hasta la edad adulta [8]. Ambos procesos están influenciados por factores genéticos, nutricionales y ambientales [6].

El sistema endocrino, junto al sistema nervioso central, son los responsables de controlar la homeostasis del crecimiento (Figura 1). El sistema endocrino está formado por un conjunto de glándulas que producen y secretan hormonas reguladoras. La principal hormona reguladora del crecimiento humano es la hormona del crecimiento (GH), un polipéptido que es secretado, almacenado y liberado, por las células somatotropas de las zonas laterales de la adenohipófisis. La síntesis y la secreción de la GH están reguladas por el hipotálamo mediante un sistema de retroalimentación negativa que involucra a dos hormonas: la hormona liberadora de GH (GHRH), que promueve la liberación de la GH y la somatostatina (SS), que produce una inhibición de la liberación de la hormona de crecimiento [8].

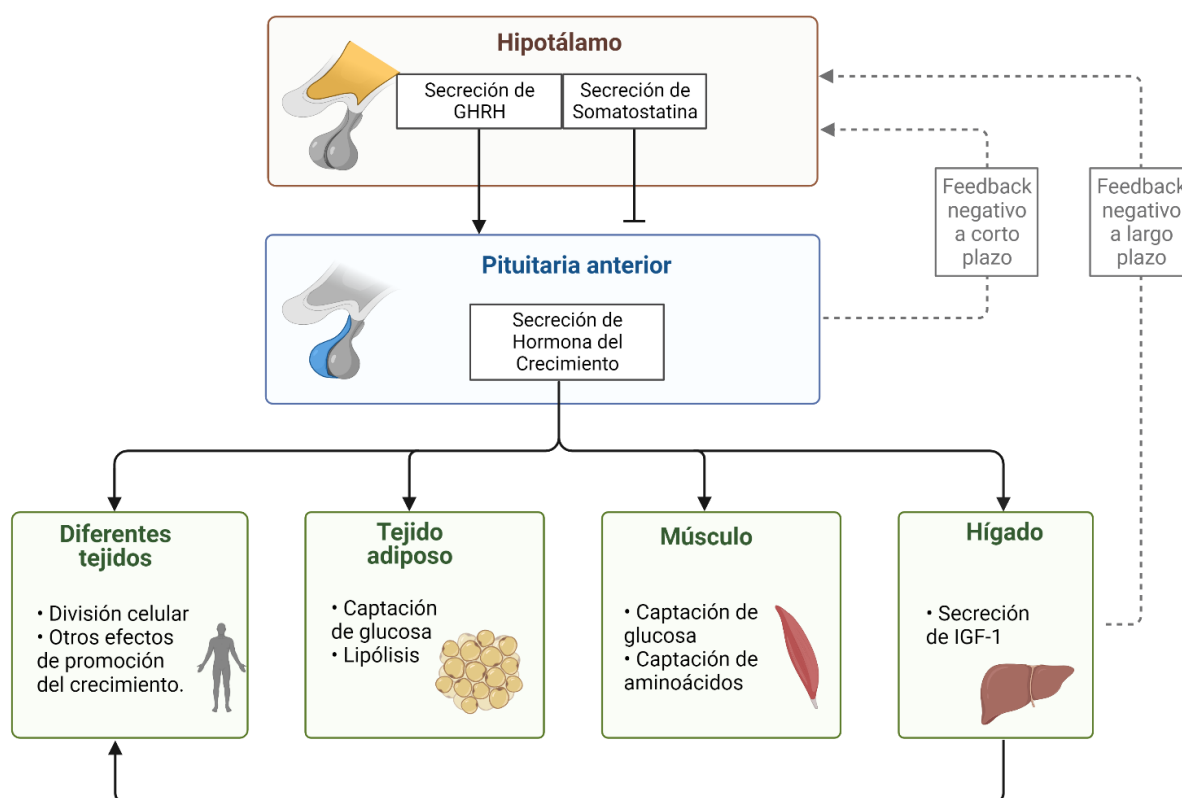


Figura 1. Sistemas implicados en el control de la homeostasis del crecimiento. Adaptado de [4]. Creada con Biorender.com.

La GH tiene un patrón de liberación pulsátil a lo largo del día, con pulsos especialmente acentuados durante la noche [8]. Tras su secreción, actúa sobre el hígado provocando la

liberación de somatomedinas, siendo el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) el más importante. La interacción de IGF-1 con sus receptores distribuidos por todo el organismo favorece la liberación de ácidos grasos de los adipocitos, que serán utilizados como fuente de energía para la formación de músculo y hueso. A nivel muscular y en los órganos, se producirá un aumento de la captación de aminoácidos y de la síntesis de proteínas [9-11], contribuyendo al aumento de la masa corporal.

En el hueso, las somatomedinas estimulan la actividad de los osteoblastos, aumentando la síntesis de colágeno y la formación de tejido óseo. Además, favorecen el crecimiento longitudinal de los huesos al actuar sobre los condrocitos en la placa de crecimiento. Esta estructura compuesta por las zonas de reposo, proliferativa e hipertrófica, alberga condrocitos que experimentan una replicación continua. Los condrocitos de la zona de reposo son células progenitoras que se encuentran alineadas en columnas paralelas al eje largo del hueso. Se replican repetidamente, pero eventualmente sufren una diferenciación terminal y aumentan de tamaño para constituir la zona hipertrófica. La hiperplasia e hipertrofia de condrocitos, combinada con la síntesis de la matriz de cartílago, resultan en la formación de cartílago nuevo. Una vez formado, este cartílago es colonizado por vasos sanguíneos y células óseas, dando lugar a la formación de tejido óseo. El resultado final es el alargamiento del hueso. Si bien la GH es el principal efector del crecimiento longitudinal del hueso, su regulación implica un entramado de mecanismos locales y sistémicos en el que participan hormonas, factores genéticos, el entorno y de manera destacada, la nutrición [8, 10, 12-14].

En resumen, el crecimiento es un proceso esencial en los primeros años de vida que abarca el aumento cuantitativo y cualitativo de la masa corporal y la maduración de los sistemas orgánicos, mientras que el desarrollo continúa durante toda la vida y se relaciona con la capacidad funcional. Las hormonas de crecimiento y otras hormonas endocrinas desempeñarán un papel crítico en este proceso, expresando un crecimiento y desarrollo adecuado.

2.1.1 Etapas del crecimiento. Importancia de los 1000 primeros días.

El período que abarca desde la concepción hasta los 2 años de vida, comúnmente conocida como los 1000 primeros días, emerge como un lapso crítico en el contexto del crecimiento infantil. Esta ventana temporal, no sólo preside una fase acelerada de crecimiento físico, sino que además, desempeña un papel fundamental en la programación y desarrollo neurológicos y la predisposición a ciertas patologías a largo plazo [15]. Por citar un ejemplo, en esta ventana de tiempo algunos de los factores de riesgo de obesidad ya son identificables [16] y se conoce que alteraciones en este período de la vida pueden dar lugar al desarrollo de enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer u otras enfermedades crónicas [17]. La nutrición es el principal factor que influye en el crecimiento durante esta etapa, hasta tal punto que durante los primeros 24 meses de vida los niños a menudo cruzan líneas de percentiles de crecimiento [18, 19].

Durante la etapa fetal se observa un asombroso aumento exponencial en el número de células. Durante el primer trimestre de gestación tiene lugar la fase crucial de organogénesis; a partir del segundo trimestre, el ritmo de crecimiento alcanza un punto crítico, llegando a ser de hasta 2,5 cm por semana [18]. Este crecimiento depende fundamentalmente de la placenta y la salud de la madre, por lo que la nutrición de la gestante será clave durante este período para establecer un entorno intrauterino adecuado. Se trata de una etapa muy relevante en el desarrollo del organismo, mostrando una notable sensibilidad a las alteraciones, que podrían desarrollar trastornos de crecimiento postnatales [6]. Desde el punto de vista metabólico, los principales factores implicados en el crecimiento del feto son la insulina y el IGF-1 [8].

En la etapa postnatal o de lactancia, el ritmo de crecimiento experimenta una ralentización y es cuando tiene lugar el fenómeno de canalización hacia la talla genéticamente determinada [6]. El término “canalización” fue descrito por el genetista británico Waddington, quien señaló que cuando los niños se encuentran en un entorno que no restringe su

crecimiento, éste tendrá un patrón que seguirá un percentil concreto, ya que la talla tiene una considerable influencia genética [20]. Desde el punto de vista endocrino, las principales moléculas implicadas en este período son la hormona tiroidea y la hormona del crecimiento [19]. La velocidad de crecimiento durante el primer año de vida disminuye de los 20 cm/año en los primeros meses hasta 10 o 12 cm/año al cumplir 1 año de edad. Durante este periodo, la longitud de media se incrementa en un 50% y el peso se triplica [18].

La siguiente etapa es la infancia, que se subdivide en dos fases: la infancia temprana que ocurre aproximadamente desde el final del período de lactancia hasta los 8 años [21], mientras que la infancia tardía se extiende de los 8 a los 12 años. Durante el primer año, la tasa de crecimiento permanece elevada, ralentizándose hasta aproximadamente la mitad del segundo, año alcanzando entre 7,5-10/cm por año. El crecimiento en las primeras etapas de la infancia temprana está caracterizado por ocurrir un cambio rápido en las proporciones corporales, en las que hay un crecimiento más rápido de las piernas que del tronco; y ambos, a su vez, crecen mucho más que la cabeza en proporción a la longitud total del cuerpo [18].

La infancia tardía se caracteriza por un crecimiento más lento, que se estabiliza en unos 5 o 6 cm/año, con una marcada diferencia entre las tasas de crecimiento de los tejidos y los órganos [18]. Existe una desigualdad en la relación de crecimiento entre niños y niñas, siendo los primeros ligeramente más altos [19].

La etapa final del crecimiento corresponde a la pubertad, que aborda desde los 12 hasta los 18 años. En la edad biológica apropiada, se observa una supresión del eje hipotálamo-gonadotropinas y los niveles de hormonas sexuales van aumentando lentamente, marcando el inicio de la adolescencia. Las hormonas sexuales desempeñan un papel predominante, principalmente los estrógenos en las niñas y la testosterona en los niños, influyendo positivamente en la GH y dando lugar a una relación de crecimiento mayor a la del período anterior. Estas mismas hormonas sexuales inducen la proliferación de los condrocitos de la placa de crecimiento, que se agrandan y osifican, terminando en una fusión

de las zonas epifisaria distal y metafisaria central. Este momento marca el cese del crecimiento longitudinal de los huesos y con ello, del individuo [19]. Esta etapa fundamental del crecimiento es responsable de más del 20% de la altura del adulto y aproximadamente del 50% de la acumulación de masa ósea [18].

2.1.2 Técnicas para determinar el crecimiento

El proceso de crecimiento es muy complejo aunque relativamente predecible y es uno de los indicadores más utilizados para conocer el estado de salud de los niños. Su monitorización constituye una parte esencial en exámenes periódicos de los programas sanitarios pediátricos [8]. La antropometría es el estándar de oro para valorar el estado de salud y nutricional de los niños [22].

Hasta los 2 años, las principales medidas antropométricas utilizadas son: el peso, medido en una balanza sin ropa; la longitud, medida situando al niño en decúbito supino sobre una tabla para medir bebés; y la medida de perímetro cefálico, que se mide en el perímetro máximo de la cabeza, utilizando como referencia de punto máximo las cejas hasta la parte posterior de la cabeza. Además, se emplea la relación de peso y longitud que se utiliza como indicador para detectar sobrepeso u obesidad [6, 23].

El objetivo de la obtención de estas medidas antropométricas es compararlas con una serie de tablas que permiten a los pediatras valorar el crecimiento de los niños. Actualmente se utilizan las tablas generadas por la OMS en 2006. Estas tablas se realizaron tras una recopilación de datos de niños de entre 0 y 24 meses (y de hasta 72 meses en algunos datos transversales) en 6 países: Brasil, Estados Unidos, Noruega, India, Ghana y Omán [24]. Los niños implicados fueron alimentados con lactancia materna, provenían de entornos en los que no había dietas deficientes ni infecciones y con madres que no fumaron durante ni después del embarazo (Figura 2) [25]. De esta forma se generaron percentiles y curvas de desviación

estándar, para cada edad y sexo, que permiten conocer el porcentaje de individuos en diferentes percentiles de crecimiento [8, 24-26].

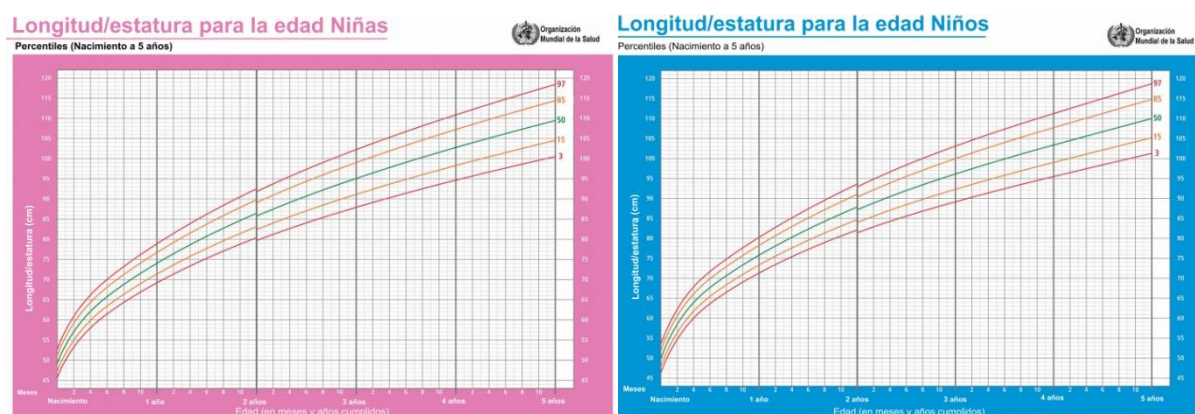


Figura 2. Tablas de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud.

2.1.3 Factores que afectan al crecimiento

El patrón de crecimiento está regulado por factores endocrinos y ambientales que actuarán de forma independiente o conjunta para modificar el potencial genético del individuo [10, 27]. De esta forma, dos genotipos similares que alcanzarían la misma estatura en condiciones ideales pueden tener un desarrollo diferente en circunstancias ambientales adversas [22]. El crecimiento óptimo se alcanzará cuando factores como la nutrición, el estado de salud y el bienestar general actúen en armonía [6, 19, 28].

Los factores intrínsecos que intervienen en el crecimiento, como la herencia genética, las enfermedades o las hormonas, pueden verse alterados por factores extrínsecos [28, 29]. Entre ellos se encuentran los factores geográficos, como la temperatura o la altitud del entorno [30]; la actividad física, que favorece el crecimiento normal [31]; la tendencia secular, es decir, las modificaciones ocurridas entre generaciones en relación con el crecimiento y desarrollo [32]; o aspectos socioeconómicos que puedan afectar al nivel de vida y con ello el acceso a la sanidad o la nutrición. Habicht et al. [33] realizaron un estudio con niños de 7 años en el que observaron mayores diferencias en el tamaño entre niños de una misma raza o etnia, pero con distinta situación socioeconómica, que entre niños de distinta raza, pero de igual

situación socioeconómica. Concluyeron que los factores socioeconómicos parecen tener incluso una mayor influencia que los raciales o genéticos sobre los niños en edad preescolar.

Dentro de los factores extrínsecos, la nutrición es el principal factor que influye en el crecimiento. Una correcta y equilibrada alimentación asegura el aporte adecuado de macro y micronutrientes que servirán para la formación de estructuras fundamentales necesarias para este período crítico de la vida [10, 34]. Según datos de UNICEF, la salud de más de 200 millones de niños en todo el mundo depende de su estado nutricional, con consecuencias para su desarrollo y crecimiento, siendo una de las principales causas de morbilidad pediátrica [17].

Así, la estatura de los adultos es el resultado tanto el genotipo individual como de los factores ambientales que influyeron en el crecimiento y limitaron la expresión fenotípica de su genotipo. Desde el momento de la concepción hasta la adolescencia, existe una plasticidad que puede provocar que ciertos factores externos den lugar a fenotipos diferentes, que podrían transmitirse de generación en generación [35]. La secuencia de ADN no puede ser modificada por el entorno, pero sí es posible que ciertos estímulos exógenos provoquen cambios epigenéticos que afecten directamente a la expresión de los genes, alterando la estructura de las proteínas o su interacción con otras moléculas. Estas modificaciones reversibles parecen ser el vínculo entre los factores ambientales y los cambios en el fenotipo de la expresión de los genes. La explicación radica en que a pesar de que el objetivo es la adaptación, debido a que se trata de una época de la vida en la que hay un rápido crecimiento de los tejidos, estas modificaciones podrían resultar perjudiciales para el organismo en desarrollo [15, 17]. Tanner [36] lo describió en su definición de crecimiento como “un espejo de las condiciones de la sociedad, especialmente el estado nutricional e higiénico de la población”.

2.2 Retraso en el crecimiento

El retraso en el crecimiento o restricción del crecimiento lineal, es una condición en la que ocurre una reducción en la velocidad de crecimiento físico o incluso una detención de éste. La OMS utilizando las tablas de crecimiento establece que, una situación de retraso del crecimiento lineal ocurre cuando la altura de un niño se encuentra por debajo del percentil 10 o a -2 desviaciones estándar con respecto a los de su misma edad o sexo. El retraso en el crecimiento se considerará grave cuando se sitúa ante -3 desviaciones estándar de los niños de su misma edad o sexo [37].

Con la premisa de la complejidad de un proceso como el crecimiento, resultaría ingenuo limitar este concepto a una delgada línea que, basándose en una única medida antropométrica, distinga una situación como patológica. Prendregast et al. [38] describen que, aunque los niños que presentan retraso en el crecimiento son identificados clásicamente por tener una menor altura con respecto a los de su misma edad y sexo, una baja estatura no es *per se* un problema. Lo identifican como un síndrome de retraso en el crecimiento que implica múltiples alteraciones físicas y bioquímicas en un período vital crítico para el organismo. Es, además, indicador de trastornos que se asocian con una mayor morbilidad y mortalidad, como la pérdida del potencial de crecimiento físico o la reducción de la función cognitiva y del desarrollo neurológico, lo que predispone a enfermedades crónicas en la edad adulta y trastornos inmunológicos que hacen que los individuos sean más susceptibles a padecer infecciones como neumonía y diarrea, sepsis, meningitis, tuberculosis y hepatitis [37, 39].

Numerosos estudios muestran cómo los niños cuyas madres tienen un entorno nutricional e higiénico adecuado tienen un crecimiento fetal y de los primeros años de vida muy similar, incluso en áreas geográficas distintas. Estos datos confieren a los factores ambientales el papel de desencadenantes principales del retraso en el crecimiento [38]. En España, la prevalencia de niños pequeños por su edad gestacional oscila entre el 3 y el 7%, experimentando un aumento atribuido a efectos como tabaquismo, alcohol, drogas

psicoactivas, así como la edad materna avanzada [40, 41]. En paralelo, los partos prematuros constituyen el 10% en España, alrededor de 30000 nacimientos al año, con una tendencia creciente [42, 43]. A nivel global, entre el 15 y el 20% de los nacimientos son prematuros o de bajo peso al nacer, afectando a 15 millones de niños anualmente, lo que equivale a 1 de cada 10 nacimientos [44]. Experimentos como el de Christian et al. [45] revelan un riesgo considerablemente mayor de retraso en el crecimiento postnatal en bebés prematuros o pequeños para su edad gestacional.

El retraso en el crecimiento está también directa o indirectamente asociado a distintas patologías como las alteraciones cromosómicas, síndromes genéticos, displasias esqueléticas y trastornos del crecimiento [46, 47]. Pero la OMS señala que el retraso en el crecimiento vinculado a la desnutrición prevalece globalmente y se vincula a una nutrición inadecuada e infecciones recurrentes, especialmente en los 1000 primeros días de vida, destacando la importancia de nutrientes como la vitamina A, el zinc, el hierro o el yodo [48]. Entre los 6 y los 24 meses, en los países en desarrollo se observa una mayor prevalencia de retraso en el crecimiento debido a la alta demanda de nutrientes unida a la limitada disponibilidad y baja calidad de los alimentos [38]. Por tanto, la nutrición desempeña un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento del crecimiento lineal [49, 50] mientras que la malnutrición se asocia a una mayor susceptibilidad a infecciones, estableciéndose un círculo vicioso de deterioro nutricional e infecciones recurrentes [39].

Además, el retraso en el crecimiento se asocia, a corto plazo, con una mayor morbilidad y mortalidad por infecciones. A medio plazo, hay un impacto sobre componentes cognitivos. Y se ha descrito en adultos que sufrieron retraso en el crecimiento en la primera infancia, que existen ciertas alteraciones metabólicas relacionadas con la homeostasis de la glucosa y la regulación de la deposición grasa, que no aparecen en aquellos que experimentaron un crecimiento infantil normal [38, 51].

UNICEF, en colaboración con la OMS y el Banco Mundial, estimaron que en 2021 el 22% de los niños menores de 5 años presentaron un retraso en el crecimiento, con una desviación estándar de estatura para la edad por debajo de -2. [52]. La comunidad científica está al tanto de la importancia del retraso en el crecimiento; y por ello, en 2012 la Asamblea Mundial de la Salud determinó incluirlo dentro de los Seis Objetivos Mundiales de Nutrición para 2025 [39].

2.3 Crecimiento compensatorio o de recuperación: *catch-up growth*

Bauer [53] acuñó por primera vez el término “*catch-up growth*”, crecimiento compensatorio o de recuperación en inglés, al observar el crecimiento recuperador que experimentaron 19 niños tras mejorar del síndrome nefrótico que padecían. En 1963, Prader et al. [54] describieron que, durante períodos de hambrunas o malnutrición, la curva de crecimiento de los individuos se veía reducida. Estudiaron diferentes situaciones, entre ellas anorexia, raquitismo, tumores, celiaquía e hipotiroidismo y apreciaron que, tras la resolución de cada uno de los factores que afectaban negativamente al crecimiento, éste se desarrolló con rapidez. Observaron que durante la fase de crecimiento compensatorio, de aquí en adelante *catch-up growth*, la relación de ganancia de peso y de altura, en algunos casos, cuadruplicó lo esperado para su edad cronológica. Hipotetizaron que el objetivo de esta exacerbada velocidad de crecimiento era alcanzar cuanto antes la curva de crecimiento previa al retraso de éste [9, 55].

En los años 1981 y 1990, Tanner [56, 57] distinguió 3 posibles mecanismos para explicar el *catch-up growth*. En el primer patrón A, tras el cese del retraso en el crecimiento ocurre un incremento en la velocidad del mismo de hasta 4 veces la correspondiente para la edad cronológica del individuo, lo que le lleva a erradicar por completo el déficit de crecimiento y la velocidad del mismo vuelve a ser normal. En el segundo patrón B, tras restablecerse las condiciones que inhibían el crecimiento, los niños crecen relativamente más rápido de lo normal para su edad, pero a una velocidad normal acorde a su edad ósea, lo que

da lugar a un período de crecimiento más largo y una altura del adulto normal. El tercer patrón C, plantea una velocidad de crecimiento en la media para la edad cronológica con un retraso en la maduración ósea, lo que da lugar a un crecimiento que se extiende en el tiempo más de lo normal. Tanto el propio Tanner como de Wit et al. [55] descartan esta última alternativa, ya que por definición, el concepto *catch-up growth* lleva implícita una velocidad superior a la normal y en este patrón no encontramos esta condición.

Tras observar las curvas de crecimiento de numerosos niños con retraso en el mismo, De Wit et al. [55] plantearon la posibilidad de un mecanismo intermedio a los ya descritos A y B. Este denominado “patrón AB” tiene una fase inicial de crecimiento más rápido de lo normal para la edad ósea del individuo, que precede a otra fase de estatura estable en la que aún no se ha alcanzado el percentil previo al factor causante del retraso en el crecimiento. Sin embargo, un retraso en la aparición de la pubertad permitiría al individuo alcanzar la altura objetivo de su percentil [20, 58].

En la búsqueda de los mecanismos que subyacen a la capacidad del organismo para recuperar el crecimiento, en 1963 Tanner [59] planteó la posibilidad de la existencia de un factor neuroendocrino, sin identificar, que compararía el tamaño del individuo en ese momento con el tamaño esperado cronológicamente y que en consecuencia ajustaría la tasa de crecimiento. Años más tarde esta hipótesis fue desestimada y cobró más fuerza la teoría de que el *catch-up growth* está basado en un proceso de senescencia a nivel local. La senescencia en la placa de crecimiento provoca un enlentecimiento del crecimiento óseo a lo largo de los años durante la vida juvenil. Ocurre tanto una pérdida fisiológica de funcionalidad como una involución estructural en la que hay una disminución progresiva de la proliferación de condrocitos y de la altura total de la placa de crecimiento, además de apreciarse una disminución del número de condrocitos proliferativos e hipertróficos [60].

La senescencia no ocurre sólo en la masa ósea, sino también en todos los órganos y tejidos y en la masa corporal total. Ello implica que durante los primeros años de vida exista

una proliferación celular rápida que se ve ralentizada con el paso de los años, fundamentalmente debida a una disminución en la fracción de células que permanecen en el ciclo celular [60]. Evidencias recientes demuestran que la proliferación celular se suprime con la edad debido a un programa genético limitante del crecimiento que ocurre durante la juventud en los tejidos [61].

Los factores que provocan el retraso en el crecimiento ralentizan tanto la proliferación de condrocitos como la senescencia, lo que indica que la senescencia no depende tanto de la edad, si no de la proliferación de condrocitos, tal y como observaron en un estudio realizado con ratas *Sprague-Dawley* [62]. Es decir, cuando se resuelven las condiciones inhibitoras del crecimiento, las placas de crecimiento tienen una menor senescencia de lo normal para la edad del niño, de manera que proliferan a un ritmo mayor que el normal para su edad, resultando en un *catch-up growth* [14, 63, 64]. En el caso de los órganos y tejidos ocurre de forma similar. Su programación no es dependiente del tiempo, sino del crecimiento, por lo que las condiciones que lo inhiben retrasan la evolución del programa genético y de este modo conservan el potencial del crecimiento futuro. Distintos experimentos demuestran que los órganos trasplantados continúan creciendo rápidamente al cambiar de receptor, lo que sugiere que la aceleración o desaceleración del crecimiento es una propiedad intrínseca del órgano [14, 65-67].

Así, el *catch-up growth* es una adaptación fisiológica gracias a la cual se alcanza la trayectoria de crecimiento programada genéticamente para el individuo [68]. También parece existir una importante relación entre el peso y el crecimiento lineal, como destacan los estudios realizados en niños con muy bajo peso, donde observaron que la recuperación de la altura ocurre juntamente con la recuperación del 85% del peso para la talla. Estos datos otorgan a una ingesta nutricional adecuada un papel trascendental ya que permite que los niños con bajo peso al nacer desarrollen su potencial de recuperación de peso [69-71].

2.3.1 Perfiles que experimentan *catch-up growth* y sus implicaciones metabólicas: *Catch-up fat*

En 1933, McCay [72] fue el primero en proponer que el crecimiento rápido y la longevidad no eran compatibles, basándose en estudios previos realizados en distintas especies. En ellas apreciaron que las dietas que estaban consumiendo los animales para recuperar el crecimiento lo antes posible parecían ser adecuadas para alcanzar su talla y reproducirse. Sin embargo, los animales que mostraron un crecimiento más lento y una madurez más tardía eran más longevos. Hasta 1970 no se publicó el primer estudio en humanos utilizando los datos de un grupo de niños nacidos en 1961 [73]. Fueron divididos en 3 grupos según la velocidad de crecimiento durante los primeros 6 meses de vida y valorados de nuevo en las edades comprendidas entre los 6 y los 8 años. Eid et al. [73] hallaron una relación directa entre un rápido aumento de peso durante los primeros 6 meses de vida y el riesgo de obesidad a los 6-8 años. Dada la relevancia de los resultados, numerosos estudios se han publicado *a posteriori* en concordancia con los mostrados en ese estudio, relacionándose un crecimiento infantil rápido con un mayor índice de masa corporal y mayor porcentaje de grasa [74, 75].

Acorde a lo anterior, Stevans et al. [76] analizaron el perfil metabólico de niños nacidos pequeños para su edad gestacional y encontraron que los niños que mostraron un crecimiento rápido presentaron un mayor IMC y niveles más altos de glucosa en ayunas que aquellos que tuvieron un crecimiento más pausado. En otro estudio llevado a cabo por Deng et al. [77] se investigó la resistencia a la insulina en niños nacidos pequeños para su edad gestacional (PEG). Aquellos niños que presentaron una recuperación del crecimiento rápida presentaban una mayor resistencia a la insulina que los niños PEG a término que no tuvieron recuperación y que los niños a término normopeso. Estos modelos han sido replicados posteriormente con animales con bajo peso al nacer que experimentan un *catch-up growth* y han observado una remodelación de la grasa subcutánea [78] y una alteración de la expresión génica en el tejido adiposo que conduce a la obesidad [79].

Diversos estudios observacionales [80] confirman que el *catch-up growth* que experimentan los niños con retraso en el crecimiento les proporciona ventajas en términos de crecimiento corporal, respuesta inmune y neurodesarrollo. Sin embargo, el bajo peso al nacer resultante de la restricción del crecimiento intrauterino o el nacimiento prematuro y el desarrollo de *catch-up growth* está asociado con mayores riesgos a largo plazo de desarrollar resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, hipertensión y enfermedades cardiovasculares mediante diferentes mecanismos que se detallarán más adelante [81].

Maeyama et al. [82] observaron el crecimiento de una cohorte de niños japoneses nacidos pequeños para su edad gestacional y estimaron que aproximadamente un 7% de los bebés PEG desarrollaron un rebote de adiposidad antes de cumplir los 3 años. El rebote de adiposidad es un fenómeno que, en condiciones normales, ocurre en torno a los 6-7 años y coincide con el pico en el que el índice de masa corporal (IMC) de los niños es el más bajo hasta ese momento de la vida. Es el punto de inflexión en el que el IMC vuelve a aumentar. Ya en 1984 un estudio mostró por primera vez que los niños que experimentaban el rebote de adiposidad antes de los 5 años y medio tenían una adiposidad notablemente mayor a los 16 años que los que lo tuvieron más tarde [83]. Que este incremento ocurra más temprano se ha asociado con una baja masa grasa previa al rebote, de forma similar al que experimentan los niños nacidos de manera prematura o pequeños para su edad gestacional cuando recuperan el crecimiento [84, 85].

Ciertas condiciones pediátricas, caracterizadas por alteraciones en el crecimiento en momentos vitales previos al rebote de adiposidad, hacen que éste se superponga al *catch-up growth* [86]. En relación con este concepto, se ha puesto de manifiesto que, independientemente del peso al nacer, un patrón de retraso en el crecimiento previo a un rebote de adiposidad predispone a un mayor riesgo de alteraciones de la homeostasis de la glucosa y diabetes tipo 2 en la edad adulta [5, 87, 88].

Desde el punto de vista de la supervivencia el fenómeno de *catch-up growth* resulta fundamental, ya que permite alcanzar cuanto antes la maduración sexual para asegurar un éxito reproductivo además de un aumento de tamaño que permita una protección frente a enfermedades y depredadores [5]. Pero esta recuperación predominante de masa grasa en lugar de masa magra se ha observado no sólo en las situaciones descritas anteriormente en las que hay una recuperación de crecimiento rápida, sino también tras hambrunas, malnutrición relacionada con la pobreza, anorexia y en otras situaciones patológicas en las que ocurría una pérdida alta de los depósitos de grasa. Lo común a todas ellas es que posteriormente a la pérdida de peso, existe una recuperación de este que se traducía en una recuperación exacerbada de los depósitos grasos [68, 89]. La tendencia al acúmulo de grasa es lo que le ha dado la denominación a este crecimiento de recuperación con predominancia grasa tal y como lo mencionaremos de aquí en adelante, “*catch-up fat*”, consiguiendo los niños tener la talla que tenían preestablecida genéticamente, pero con el coste de un mayor acúmulo graso [68] que supondrá efectos negativos a largo plazo como la diabetes tipo 2, la obesidad o las patologías cardiovasculares [5, 9, 86, 90].

2.3.1.1 Mecanismos implicados en el *catch-up fat*

Numerosos estudios a lo largo de los años han demostrado que las personas que sufrieron algún tipo de malnutrición durante la infancia, tuvieron bajo peso al nacer o lo hicieron prematuramente y que posteriormente experimentaron un *catch-up growth*, tienen una mayor susceptibilidad a la obesidad, alteraciones cardiovasculares, en la homeostasis de la glucosa y diabetes, entre otras, a lo largo de su vida [91].

Las primeras teorías se centraron en la posibilidad de que la causa del exceso de acúmulo graso fuera el incremento exagerado de la ingesta energética durante el *catch-up growth*, especialmente cuando éste se produce en el contexto de una nutrición con un alto contenido en grasa. Sin embargo, se ha observado esta misma relación desproporcionada de deposición grasa en ausencia de hiperfagia [92, 93].

En 1992, Hales y Barker [94] postularon acerca de la existencia de un fenotipo ahorrador para el que la vida pre y postnatal es un periodo crítico durante el cual las exposiciones ambientales que dificultan el crecimiento fomentan la aparición de ciertos mecanismos ahorrativos que permiten la adaptación a las condiciones que restringen el crecimiento, pero que a su vez contribuyen a aumentar el riesgo de la aparición de enfermedades futuras. Se observó que estos mecanismos ahorrativos implicaban una ganancia desproporcionalmente más alta de masa grasa que de tejido magro y se puso el foco en la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina como posibles causas principales de este mecanismo compensatorio [92].

Estudios experimentales de inanición y realimentación identificaron la termogénesis adaptativa como un sistema de control de peso en los mamíferos que actúa como regulador en el desequilibrio energético producido [95, 96]. Posteriormente, Dulloo [97] realizó un análisis de los datos obtenidos en el “Experimento de Minnesota” [98]. Fue un estudio llevado a cabo en 1950 en el que intervinieron 32 hombres sanos con peso normal que fueron sometidos a 24 semanas de ayuno parcial, durante el cual perdieron el 25% de su peso inicial, seguido de 12 semanas de realimentación con dietas relativamente bajas en grasas. En sus análisis advirtió que cuanto mayor era el grado de vaciamiento de las reservas de grasa de estos individuos durante la inanición, existía una mayor reducción de la relación metabólica basal. Observó además que esta reducción de la termogénesis continuó durante al menos 12 semanas después de la realimentación. Es decir, la relación entre la termogénesis suprimida y el agotamiento de grasa durante ambas fases indicaba la existencia de un sistema de control con un circuito de retroalimentación negativa entre la termogénesis y el estado de agotamiento de las reservas de grasa [97].

Más tarde, Dulloo et al. [99] plantearon la existencia de dos sistemas de control distintos englobados dentro del término termogénesis adaptativa. En el primero de ellos hay un control por parte del sistema nervioso central y está regulado por factores ambientales, como el exceso de consumo de energía, la exposición al frío o la privación de alimentos y la

deficiencia de nutrientes esenciales. Se denomina control de la termogénesis no específico y ocurre en tejidos y órganos con tasas metabólicas altas, como el hígado, los riñones o la grasa parda. El otro sistema de control es independiente del sistema nervioso simpático y parece estar regulado únicamente por señales derivadas del estado de vaciamiento de las reservas de grasa del tejido adiposo, por lo que se denomina control de la termogénesis específica del tejido adiposo. La supresión de la termogénesis específica del tejido adiposo conduce a la conservación de energía, que se dirigirá específicamente a la reposición de las reservas de grasa de manera acelerada [99].

En estudios con modelos animales de *catch-up growth* se había descrito que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina observados estaban directamente asociados al aumento de la presión arterial, al exceso de grasa o al aumento de los ácidos grasos libres circulantes [100-102]. Crescenzo et al. [103], utilizando un modelo de restricción del crecimiento, observaron que existía una resistencia a la insulina en ratas sometidas a restricción calórica con respecto a los controles, pero no mostraban ni mayor grasa corporal ni mayor cantidad de ácidos grasos libres en suero. Realizaron un exhaustivo análisis y mostraron que los elevados valores de insulina plasmática, así como la proporción de insulina con respecto a la glucosa tras una carga oral de glucosa eran debidas a variaciones en la eficiencia energética, es decir, a la termogénesis.

Estos estudios sugirieron que la supresión de la termogénesis *per se* tiene un papel principal en el desarrollo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en el músculo esquelético durante el *catch-up growth* y destacaron el papel de la supresión de la termogénesis específica de tejido adiposo como principal vínculo entre éste y las enfermedades metabólicas crónicas [103].

El sistema de control de la termogénesis específica de tejido adiposo tiene como eje central al músculo esquelético debido a que es el órgano responsable de la conservación de la energía durante la inanición. El músculo es el principal tejido encargado de eliminar la

glucosa circulante mediada por la interacción de la insulina con sus receptores, por lo que la resistencia a la insulina provoca una reducción de la tasa metabólica de este órgano que genera una disminución de la utilización de glucosa. Las elevadas concentraciones de glucosa circulantes se utilizarán entonces en la lipogénesis de *novo* y en el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo (Figura 3). Este es el vínculo que une la termogénesis específica de tejido adiposo con el desarrollo de la resistencia a la insulina en el fenotipo ahorrador que describieron Hales y Barker [92, 94].

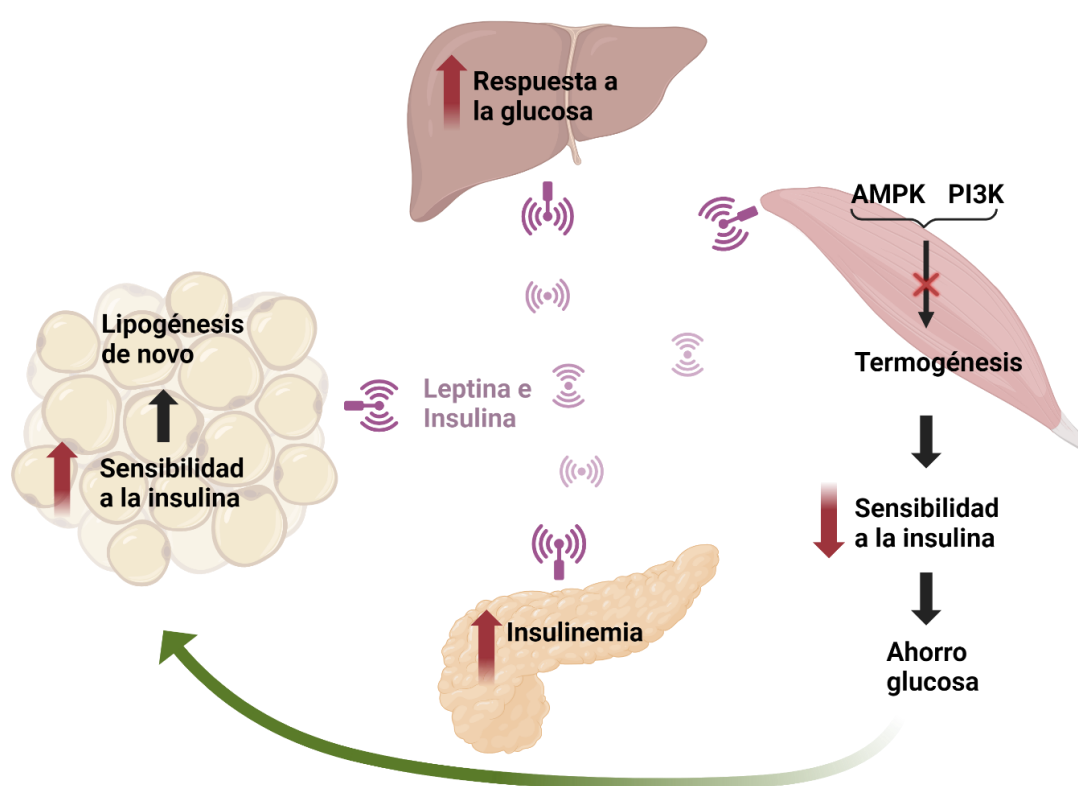


Figura 3. Esquema de los mecanismos implicados en el *catch-up fat*. Adaptado de [86] y [104]. Creado con Biorender.com.

Probablemente la hiperleptinemia y la resistencia a la leptina también sean responsables de la reducción del gasto energético al suprimir la actividad nerviosa simpática y de la inhibición de la sensación de saciedad [88, 92]. Esta hormona constituye la señal aferente en un circuito de retroalimentación negativa encargado de mantener el control homeostático del tejido adiposo. Es secretada por este tejido y sirve como indicador de las

reservas de grasa actuando como un adipostato [105]. Se han observado elevadas concentraciones de esta hormona durante el *catch-up growth* de niños nacidos pequeños para su edad gestacional o en aquellos que se recuperan de malnutriciones proteicas [92].

Las señales específicas del tejido adiposo que proporcionan la información sobre el estado de agotamiento de las reservas de grasa y que regulan la termogénesis, y con ello la lipogénesis de *novo*, parecen actuar interfiriendo en la señalización dependiente de fosfatidilinositol-3-quinasas (PI3K) y AMPK bajo el efecto de la insulina, la leptina y la adiponectina. La vía de PI3K es la principal vía por la que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos al interactuar con su receptor en la superficie celular [2]. Cuando esto ocurre, PI3K fosforila al lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato. Este sirve de anclaje para quinasas como la proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol o la proteína quinasa B o Akt. Akt es la quinasa encargada de regular varios de los efectos metabólicos de la insulina. Tiene un papel importante en la captación de glucosa en músculo y tejido adiposo ya que participa en la traslocación de su transportador GLUT4 desde vesículas intracelulares a la membrana celular para permitir la entrada de glucosa. Además, inhibe la gluconeogénesis y favorece la síntesis de glucógeno en el hígado; de lípidos en el tejido adiposo; y de proteínas en el músculo esquelético [106].

AMPK, por su parte, es una enzima implicada en la regulación del metabolismo energético. Su activación depende del aumento de la relación AMP/ATP en la célula y actúa sobre enzimas tan cruciales en el metabolismo energético como la acetil coenzima A carboxilasa o la ácido graso sintasa (AGS), regulando así la síntesis de ácidos grasos. En cuanto a los hidratos de carbono, actúan sobre la glucógeno sintasa mediante la represión génica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa, además de inhibir la glucogénesis al regular la glucógeno sintasa. A su vez, AMPK estimula la glucólisis al favorecer la fosforilación de la enzima reguladora de la glucólisis PFK1. También promueve la captación de glucosa mediante la inactivación de proteínas activadoras de Rab-GTPasa y de la histona

desacetilasa, lo que favorece el incremento en la expresión y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática [107, 108].

Estudios *ex vivo* de microcalorimetría en músculo esquelético han demostrado que la sensibilidad a la insulina, que está regulada por la señalización dependiente de PI3K y AMPK, es necesaria para la estimulación hormonal de la termogénesis muscular. Esto se ha comprobado bloqueando ambas rutas de señalización con inhibidores y observando la pérdida de los efectos termogénicos de la leptina y la insulina sobre el músculo esquelético [109].

También se ha descrito una alteración en el sistema energético celular en ratas que han experimentado *catch-up growth*. Los animales muestran una masa mitocondrial y una capacidad oxidativa disminuidas, especialmente en el compartimento subsarcolemal del músculo esquelético, que tiene un importante papel en el metabolismo bioenergético y el transporte de sustratos [110]. Los autores plantearon que la deficiencia en esta subpoblación de mitocondrias pueda contribuir a la alteración de la señalización de PI3K y AMPK [68].

Según el modelo presentado por Summermatter et al. [106], aunque muy probablemente la reducción del número de mitocondrias subsarcolemas contribuye *per se* a la supresión de la termogénesis, la alteración de la señal de PI3K y AMPK también puede intervenir en el ciclo entre la lipogénesis de *ново* y la oxidación de lípidos mitocondriales. Según su modelo, PI3K sería necesario para que exista un flujo eficiente de glucosa para la lipogénesis de *ново*, al igual que lo es AMPK para proporcionar un flujo constante de estos ácidos grasos sintetizados de *ново* a través de la oxidación mitocondrial. También PI3K tiene efecto positivo sobre la ácido graso sintasa, por lo que una reducción de su actividad podría reducir el flujo de sustratos a través de la lipogénesis de *ново*.

En estudios llevados a cabo en animales que experimentaban un *catch-up growth* comprobaron que la utilización de glucosa estimulada por insulina es menor en el músculo esquelético, pero sin embargo era mayor en el tejido adiposo blanco. En este mismo estudio,

se confirmó además que, efectivamente, la resistencia a la insulina no se debe al efecto lipotóxico de los lípidos circulantes [111]. Por lo tanto, en conjunto estos datos sugieren que la resistencia a la insulina del músculo y la hipersensibilidad a esta hormona del tejido adiposo en los animales que experimentan un *catch-up growth* no están relacionados con el entorno lipotóxico, sino que se relacionan directamente con la supresión de la termogénesis del músculo esquelético [86].

Existen así evidencias suficientes de que alteraciones en la señalización de estas rutas en el músculo esquelético podrían relacionarse con la supresión de la termogénesis y la resistencia a la acción de la insulina y de la leptina durante el *catch-up growth* [68]. Y que estos son los mecanismos implicados en el exceso de grasa acumulada debido a que la glucosa no oxidada en el músculo se dirige a la lipogénesis de *novο* [92].

2.4 Situación actual y perspectivas futuras. Posibilidades de actuación ante el *catch-up fat*

Desde un punto de vista evolutivo, el mecanismo de *catch-up growth* pudo tener como objetivo favorecer la supervivencia, ya que tiene como prioridad rellenar las reservas de grasa sin comprometer la homeostasis de la glucosa en sangre [92]. Esto tendría sentido si contemplamos al hombre desde un punto de vista histórico, en el que ha pasado por hambrunas y períodos intermitentes de disponibilidad de alimentos. Pero esta compleja interacción entre las condiciones de nacimiento y crecimiento, la reprogramación endocrino-metabólica del individuo y su genética, así como el estilo de vida con una predominancia del sedentarismo y de dietas ultraprocesadas, provoca que hoy en día el *catch-up growth* se desarrolle en un entorno con una mayor hiperglucemia e hiperinsulinemia [68, 86].

Las alteraciones de la homeostasis de la glucosa experimentadas durante el *catch-up growth* permanecen durante la edad adulta como consecuencia de un efecto arrastre del metabolismo ahorrativo tras la recuperación de peso. Es lo que se conoce como fenotipo

ahorrador. Es el mismo que aparece también tras dietas de adelgazamiento o en la cantidad desproporcionadamente alta de grasa que hallamos en adultos tras períodos de desnutrición, anorexia o patologías cancerosas [68].

Diferentes estudios han constatado la permanencia de este fenotipo y/o programación metabólica. Así, estudios clásicos, como el realizado con ratas por Boyle et al. [112] en 1978 se observó una mayor eficiencia de la ingesta nutricional por parte del grupo de animales que habían sido sometidos a una restricción calórica respecto a los controles. Más tarde, Hill et al. [113] estudiaron el destino de la energía ingerida en ratas antes y después de una restricción calórica. Observaron que, durante el período de realimentación, los grupos experimentales emplearon la energía consumida en su almacenaje mediante la reducción del uso de la energía en el metabolismo basal, de manera proporcional a la restricción sufrida. A su vez, en el propio experimento de Minnesota citado anteriormente [97, 98] se describió una reducción de la termogénesis que continuó durante el período de realimentación. También se han observado cambios a nivel de expresión génica en animales que habían sufrido una restricción proteica prenatal, lo que les hizo tener una mayor predisposición a la acumulación grasa durante el *catch-up growth* postnatal [79]. En un estudio reciente, en el que se utilizaron sistemas de telemetría implantados en el abdomen de ratas que experimentaban un *catch-up growth* y que permitían el seguimiento continuo de la temperatura, observaron cómo hubo una reducción de la temperatura por la supresión de la termogénesis en las ratas experimentales respecto a las ratas controles. Incluso tras la realimentación, la temperatura continuó siendo baja, reflejo de la persistencia del metabolismo ahorrativo de los animales [114].

La permanencia en el tiempo de la baja tasa metabólica basal está asociada con numerosas enfermedades. En el estudio de un grupo de adultos que tuvieron bajo peso al nacer, se comprobó cómo el menor gasto de energía en reposo estaba asociado a una prevalencia dos veces mayor de síndrome metabólico que aquellos que nacieron con un peso normal [115]. En otro estudio, en Finlandia, se demostró que niños que fueron pequeños y delgados durante la infancia y que posteriormente tuvieron un *catch-up growth*, presentaron

sobrepeso en la edad adulta [116, 117]. Del mismo modo, en otro estudio publicado en 2005 con aproximadamente 9000 hombres y mujeres que pasaron por distintas situaciones que los llevaron a experimentar un *catch-up growth*, presentaron mayor riesgo de resistencia a la insulina y a enfermedades coronarias [118].

En consecuencia con la importancia y lo esencial del *catch-up growth*, resulta casi una obligación valorar opciones para convertir este período vital en inocuo. A lo largo de la historia, la nutrición se ha considerado fundamental para el crecimiento normal de los niños, por lo que podría ser una excelente herramienta cuyo uso tendría como objetivo que el fenotipo ahorrador adoptado no transforme los beneficios del *catch-up growth* en un organismo condenado al padecimiento de enfermedades no transmisibles, en el futuro.

2.5 Importancia de la nutrición en el crecimiento

La nutrición, definida por la OMS es “la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo”. Los humanos consumimos alimentos para satisfacer nuestras necesidades energéticas y para crear nuestras propias estructuras tisulares y orgánicas a partir de los nutrientes y otros compuestos bioactivos. Las necesidades de macronutrientes corresponden en un 12-15% a las proteínas, un 30-35% a los lípidos y un 50-60% a los hidratos de carbono de la dieta. Es, además, fundamental asegurar una ingesta adecuada y variada de vitaminas y minerales, así como adaptar la ingesta al gasto calórico de manera acorde a todas las etapas de la vida [119].

Centrándonos en las primeras etapas de la vida, la velocidad de crecimiento y la maquinaria para el desarrollo del organismo están en su máximo nivel, por lo que los requerimientos nutricionales, tanto a nivel calórico como de micronutrientes deben ser suficientemente abastecidos [120]. La salud y la nutrición en los primeros 2 años de vida es tanto una ventana de oportunidad como una ventana crítica, ya que es un período fundamental del crecimiento lineal y decisivo para la supervivencia infantil, la prevención de

la morbilidad, el desarrollo motor, el desarrollo y rendimiento cognitivos y la escolarización [121, 122]. Una nutrición inadecuada o insuficiente en esta época crítica de la vida se traduce en un déficit en el desarrollo físico, psíquico, metabólico y fisiológico de los menores [17, 38]. Según datos de UNICEF la salud de más de 200 millones de niños en el mundo depende de manera prácticamente íntegra de su estado nutricional y es la principal responsable de la mortalidad infantil en la mayoría de los países en desarrollo [17]. Uauy et al. [25] observaron que la ingesta de alimentos en poblaciones pobres con niños con retraso en el crecimiento resultó beneficioso para algunos, pero en la mayoría de ellos indujo obesidad.

Los patrones de crecimiento en los primeros años de vida están tomando especial relevancia desde el momento en que se relacionó un rápido aumento de peso en la infancia con los problemas de salud derivados de las alteraciones en la homeostasis de la glucosa y la excesiva acumulación de grasa. El mejor aliado a la hora de mejorar estos patrones de crecimiento es la alimentación, por lo que el foco ha de ponerse en la búsqueda de nutrientes de calidad con potencial preventivo, que puedan reconducir el *catch-up growth* hacia un estado más saludable desde el punto de vista metabólico y mejorar así las perspectivas de futuro de este tipo de individuos [123].

2.5.1 Proteínas

Las proteínas son los macronutrientes con mayor número de funciones en la célula. Desempeñan un importante papel en el metabolismo ya que son enzimas, hormonas y anticuerpos y regulan numerosos procesos, además de formar parte de la estructura básica de los tejidos. Son moléculas de gran tamaño formadas por cadenas de aminoácidos, su unidad fundamental, que se combinarán de diferente modo para dar lugar a las proteínas. Existen 9 aminoácidos esenciales que no podemos sintetizar y que es necesario que se incorporen en la dieta [124].

Durante el crecimiento hay una disminución de las necesidades de proteínas, representando entre el 5 y el 20% del valor calórico total, subiendo desde los 4 años hasta la adolescencia a entre el 10 y el 30%. [15]. En la década de 1960 se introdujo el término desnutrición proteico-calórica, que hizo saltar el debate sobre si la importancia nutricional recaía sobre las proteínas o dependía exclusivamente de la energía aportada. Se hizo un estudio en el que, a niños indios desnutridos cuya dieta se consideró suficiente en proteína, pero limitada en energía, se les administró un suplemento rico en energía y bajo en proteínas. De este modo hubo una ganancia de altura y de peso que permitió igualarse al crecimiento en el percentil 50 de las tablas de niños estadounidenses [125]. En otro estudio realizado en niños con retraso del crecimiento severo, con la adición de un suplemento rico en proteínas de buena calidad y uno libre de proteínas como control, se obtuvieron los mismos resultados que en el caso de los niños desnutridos citados anteriormente con restricción calórica, ya que vieron que fue la ingesta de energía, no la de proteínas, la que determinó la altura a los 3 años [15].

La baja relevancia de las proteínas en cuanto a su papel en las primeras etapas del crecimiento se vio reforzado por estudios posteriores, como el realizado en ratas en crecimiento que mostró que la acumulación de grasa corporal estaba directamente relacionada con el contenido proteico de la dieta ingerida, siendo inversamente proporcional al porcentaje graso y no relacionado con la cantidad de carbohidratos [126]. Estudios posteriores de Hoppe et al. [127] confirmaron que una elevada ingesta de proteínas, especialmente en niños con retraso en el crecimiento, en algunos casos por encima de los requisitos metabólicos pueden aumentar la secreción de insulina y del IGF-1. El aumento de esta hormona incrementa la proliferación celular, lo que conduce a un crecimiento acelerado y al aumento del tejido adiposo [128, 129]. Se cree, por lo tanto, que puede haber una relación entre la proteína, su influencia en las concentraciones de IGF-1 y en consecuencia su efecto sobre la programación de los trastornos asociados al retraso en el crecimiento [130].

Estos ensayos apuntan a la hipótesis de la “proteína temprana” postulada por Koletzko et al. [131], que relaciona un mayor aumento de peso en la primera infancia como consecuencia de una mayor ingesta de proteínas y la mediación de niveles elevados de IGF-1 y especialmente de aminoácidos de cadena ramificada [132-134]. Esta hipótesis se evaluó en un ensayo en el que determinaron si la ingesta proteica durante el primer año de vida influye en el crecimiento hasta los 2 años y el riesgo posterior de exceso de adiposidad. Se llevó a cabo en cinco países europeos con 1138 bebés sanos (Bélgica, Alemania, Italia, Polonia y España). Entre los resultados, se destaca que los lactantes alimentados con fórmulas de mayor contenido proteico muestran un mayor peso corporal y un mayor índice de masa corporal en comparación con aquellos alimentados con un contenido más bajo de proteínas y con aquellos que fueron alimentados con leche materna [123]. Algunos estudios epidemiológicos han mostrado además una relación significativa entre la alta ingesta de proteínas durante la infancia (pero no la de energía, grasas o carbohidratos) con la aparición de rebote de adiposidad temprano y con un índice de masa corporal alta [135, 136].

2.5.2 Lípidos

Los lípidos son moléculas hidrófobas con una gran presencia en la dieta. Además de la propia contribución de ácidos grasos esenciales, tienen numerosas funciones ya que aportan energía, forman parte de las membranas de las células, son transportadoras de otras moléculas como las vitaminas liposolubles y son mediadores hormonales [124]. El contenido y calidad de la grasa ingerida además se ve reflejada en la composición de los lípidos corporales, por lo que resultan fundamentales en la prevención de enfermedades crónicas. Los requerimientos de lípidos de los niños pueden considerarse de acuerdo a su necesidad como combustible metabólico, a su composición energética suficiente para satisfacer las necesidades, al correcto suministro de ácidos grasos esenciales y a la cantidad suficiente para la absorción adecuada de vitaminas liposolubles [137]. La OMS recomienda que al menos hasta los 2 años, la dieta de los menores debe contener entre un 30 y un 40% de energía procedente de grasas y que la cantidad de ácidos grasos esenciales sea similar a la que se

encuentra en la leche materna. Valores inferiores están asociados a una ingesta inadecuada de vitaminas, minerales y un mayor riesgo de crecimiento deficiente [138].

En estudios realizados en animales en crecimiento, se observó que las ratas que estaban alimentadas con una dieta rica en grasa consumieron la misma cantidad de energía que los controles, pero ganaron más peso. La proporción de grasa depositada aumentaba a medida que se incrementaba la cantidad de alimento consumido y la cantidad de grasa en la dieta. Este fenómeno se explica debido a su alta eficiencia energética, que asciende hasta un 96% cuando la fuente principal de energía es la grasa [139]. En el estudio realizado por Chen et al. [140], se observaron los clásicos efectos del *catch-up fat* sobre ratas que experimentaban un *catch-up growth*, que incluían un aumento en la deposición lipídica intramuscular e intrahepática, deposición de grasa visceral y resistencia a la insulina. Sin embargo, en el grupo de animales que fue alimentado con la dieta alta en grasas, todos estos efectos se agravaron. La utilización de un perfil de ácidos grasos esenciales, como linoleico y α -linolénico tampoco parece mejorar el fenotipo de *catch-up fat* en una recuperación del crecimiento, aunque sí reduce levemente la deposición grasa [141].

2.5.3 Carbohidratos

La importancia nutricional de los carbohidratos ha estado siempre muy estrechamente relacionada con la de proporcionar energía al organismo. Sin embargo, los carbohidratos no son sólo una fuente de energía. En los últimos 50 años se ha demostrado que tiene numerosos efectos fisiológicos positivos relacionados con la reducción del riesgo de enfermedades no transmisibles y la obesidad. La importancia de los carbohidratos desde el punto de vista de su utilización biológica se inició con el estudio de la fibra dietética y sus efectos fisiológicos, y de hecho es uno de los principales ingredientes utilizados en los alimentos funcionales, no sólo por su interés nutricional, sino también por sus efectos mejorando la salud en general. Los últimos avances en productos alimentarios tienen como principal objetivo aprovechar las

funciones tan diversas que tienen los carbohidratos en función del lugar, la relación, la velocidad de digestión y la fermentación en el intestino [142].

2.5.3.1 Prevalencia e impacto clínico de las enfermedades no transmisibles: diabetes

La OMS considera que las consecuencias humanas, sociales y económicas de las enfermedades no transmisibles (ENT) entre ellas la diabetes y las afecciones cardiometabólicas, son de especial interés en todos los países y pueden ser devastadoras en las poblaciones pobres y vulnerables. Según datos de 2023, la OMS las enfermedades no transmisibles producen la muerte de 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 74% de todas las muertes en el mundo. Las enfermedades cardiovasculares suponen la mayoría de las muertes por ENT (17,9 millones de personas cada año), seguidas del cáncer (9,3 millones), las enfermedades respiratorias crónicas (4,1 millones) y la diabetes (2,0 millones). Los principales factores de riesgo metabólicos que contribuyen al aumento del riesgo de padecer una enfermedad no transmisible son la hipertensión arterial, el sobrepeso y la obesidad, la hiperglucemia y la hiperlipidemia causados principalmente por el consumo de tabaco, la inactividad física, el consumo nocivo del alcohol, una alimentación poco saludable y la contaminación atmosférica [143].

El número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014 [144]. La diabetes se caracteriza por ser una hiperglucemia crónica, que puede dañar órganos como el riñón, los ojos, el corazón y los vasos sanguíneos y es una de las principales causas de fallo renal, amputaciones de miembros inferiores, ceguera y enfermedades cardiovasculares. El incremento en la prevalencia de esta patología está asociada con el aumento de individuos con sobrepeso y obesidad, pero también con la urbanización, incluyendo hábitos pobres de alimentación como dietas hipercalóricas, grandes porciones de comida o elevadas ingestas de grasas saturadas y azúcares y una reducida ingesta de fibra dietética [145, 146]. Ya en 2015, la OMS lanzó una nota informativa sobre la ingesta

de azúcares recomendada para adultos y niños. En ella alertaba del alto consumo de la misma en los últimos años y sus posibles riesgos asociados, animando a restringir su ingesta en el caso de los azúcares rápidamente absorbibles a menos de un 10% del total de macronutrientes e incluso a menos de un 5% para apreciar efectos beneficiosos [147].

En abril de 2021, la OMS puso en marcha el Pacto Mundial contra la Diabetes, una iniciativa mundial destinada a lograr mejoras sostenidas en la prevención y atención de la enfermedad, especialmente en los países de ingresos medianos y bajos. En mayo de 2021, la Asamblea Mundial de la Salud aprobó una resolución relativa al fortalecimiento de la prevención y el control de la diabetes y, en mayo de 2022, propuso cinco metas mundiales relativas al tratamiento de la diabetes y la cobertura de la atención a los afectados que se deben alcanzar de aquí a 2030. La alimentación saludable, el ejercicio físico regular, el mantenimiento de un peso normal y evitar el consumo de tabaco previenen la diabetes de tipo 2 o retrasan su aparición [144]. En la actualidad, los suplementos destinados a mejorar el estado nutricional y a completar el desarrollo de los niños malnutridos están basados normalmente en productos con una gran cantidad de energía procedente de azúcares fácilmente digeribles con poco valor nutritivo. Por este motivo, la mejora del perfil de carbohidratos de los productos destinados a menores parece un adecuado punto de partida, especialmente aquellos que puedan estar orientados hacia la recuperación del crecimiento.

2.5.3.2 Carbohidratos: definición y clasificación

Existen numerosas clasificaciones de los carbohidratos. La clasificación química, determinada por el grado de polimerización, el tipo de enlace (α o β) y el tipo de monómero fue la propuesta de la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas en 1998 [148]. Clasificaron los carbohidratos en 3 clases: azúcares con grado de polimerización 1 o 2 que incluye a los monosacáridos, disacáridos y polioles; oligosacáridos con grado de polimerización entre 3 y 9, como los malto-oligosacáridos y otros oligosacáridos y por último

los polisacáridos, con el grado de polimerización por encima de 9, que engloban a los almidones y otros polisacáridos [149].

Estas macromoléculas también pueden ser clasificadas según su digestibilidad. Los carbohidratos disponibles son aquellos que pueden ser digeridos y absorbidos en el tracto gastrointestinal. Se clasifican de acuerdo a su grado de hidrólisis y pueden ser divididos en: disacáridos que se digieren rápidamente (sacarosa, lactosa, maltosa) o de digestión lenta (isomaltulosa), oligosacáridos de digestión rápida (maltodextrinas) o de digestión lenta (maltodextrinas resistentes) y polisacáridos que se digieren de forma rápida (almidones) y lentamente (fibra) [150]. Las maltodextrinas se producen por hidrólisis de almidón procedente de diferentes fuentes. Tras su degradación, quedan cadenas de unidades de D-glucosa de longitud y estructura diversa. Los gránulos de almidón contienen cantidades variables de dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. En la amilosa, las unidades de glucosa están unidas por enlaces glucosídicos 1-4, mientras que, en la amilopectina, algunos de estos enlaces son 1,6, lo que da lugar a estructuras ramificadas. La mayoría de los almidones contienen aproximadamente entre un 70 y un 80% de amilopectina y entre el 20 y el 30% de amilosa. Este último se digiere con menor rapidez por la amilasa pancreática, por lo que dependiendo del contenido de amilosa y amilopectina del almidón nativo puede haber diferencias en la respuesta de glucosa en sangre y en las propiedades de la maltodextrina, siendo desde soluble hasta resistente a la digestión con capacidades prebióticas [151]. Por su parte la digestión y utilización de los almidones puede verse afectada por diferentes factores y, por tanto, influir sobre la respuesta glicémica posprandial. Algunos de estos factores son los procesos tecnológicos o el cocinado [152].

Los carbohidratos no disponibles son aquellos que se resisten a la digestión en el intestino delgado o son pobremente absorbidos y/o metabolizados. El término no disponible es equivalente a resistente, no digerible o al concepto de fibra dietética [153]. Las fibras dietéticas conocidas son los fructanos, los galactooligosacáridos, el salvado y las maltodextrinas resistentes. Los fructanos incluyen a la inulina, la oligofructosa y los

fructooligosacáridos (FOS). Están compuestos por unidades de fructosa de longitud variable, unidas por enlaces β -2,1, por lo que no son digeribles por las enzimas intestinales. Las cadenas más pequeñas tienen una fermentación más rápida que las largas y les proporciona capacidad prebiótica con producción de ácidos grasos de cadena corta [154]. El almidón y las maltodextrinas resistentes tampoco se digieren en el intestino delgado y se comportan como fibras solubles debido a que las bacterias del colon lo fermentan [155, 156].

2.5.3.3 Concepto y relevancia de índice y carga glicémicas

Independientemente de la definición adoptada, la relación de digestión y absorción del carbohidrato está directamente relacionada con los picos de glucosa plasmáticos que genera, lo que puede contribuir o reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles. En el período posprandial se forma acetil-CoA como resultado del metabolismo de los carbohidratos (glucólisis) y los lípidos (β -oxidación), que se puede seguir oxidando en la mitocondria resultando en la generación de ATP y radicales libres. Ante el exceso de acetil-CoA que acompaña a los picos de glucosa, existe una mayor generación de radicales libres. El estrés oxidativo parece ser el denominador común detrás de la resistencia a la insulina, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. En la resistencia a la insulina, los tejidos responden más lentamente a la hormona, lo que provoca un aumento de su secreción por las células del páncreas para intentar paliar la hiperglicemia posprandial que causa disfunción endotelial [157].

En 1981, con el objetivo de diferenciar a los carbohidratos en función de la velocidad en la que éstos se degradan durante la digestión y de lo rápido que pasan al torrente sanguíneo, surgió el concepto de índice glicémico [158]. El protocolo experimental para la evaluación del índice glicémico de los alimentos fue definido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la OMS en 1998 y fue descrita ampliamente por numerosos expertos [159].

Hay muchos factores que determinan el índice glicémico de un alimento, incluido el tipo de carbohidrato, la cantidad y tipo de fibra, la técnica de preparación y finalmente el tamaño de la partícula y el pH. Este parámetro de un alimento se mide *in vivo* basándose en el área bajo la curva posprandial de glucosa tras la ingestión de un alimento que contiene 50 gramos del carbohidrato comparado con la misma curva tras la ingesta de 50 gramos de glucosa o de pan y se expresa como el porcentaje de esta relación. Nos proporciona información sobre cómo aumentará o durante cuánto tiempo se prolongará la glucemia tras ingerir una cantidad específica de un alimento rico en carbohidratos [160]. Considerando la glucosa como el alimento de referencia (100%), los alimentos se clasifican como de bajo (menor a 55%), medio (56-69%) y alto índice glicémico (mayor del 70%) [161].

Los carbohidratos de alto índice glicémico son rápidamente absorbidos y causan elevados incrementos de glucosa e insulina plasmática. Aquellos de bajo índice glicémico se digieren lentamente, independientemente del tamaño de la molécula, y proporcionan un incremento moderado de la glucosa e insulina plasmáticas tras las comidas, lo que podría resultar interesante [162, 163]. Un ejemplo es la palatinosa, cuyo índice glicémico es 32 debido a la baja capacidad del complejo sucrasa-isomaltasa del borde en cepillo de la membrana intestinal para atacar al enlace α 1,6 glucosídico que contiene. La absorción de la palatinosa es lenta, sin embargo, después de su hidrólisis, la fructosa y glucosa, monosacáridos resultantes son eficientemente absorbidos y sitúa a la palatinosa como un carbohidrato aunque lenta, completamente digerible [164]. Por tanto, los carbohidratos de bajo índice glicémico pueden dar lugar a un suministro de energía más ampliado en el tiempo y están asociados a un menor pico glicémico. Es importante destacar que la isomaltulosa proporciona el mismo contenido energético que la sacarosa, sin embargo, de manera más equilibrada debido a la lenta liberación de glucosa en el intestino que evita la rápida absorción de carbohidratos [165, 166].

El concepto de carga glicémica fue introducido más tarde, en 1997 [167] y tuvo como objetivo relacionar la respuesta glicémica de una dieta como un todo, no sólo referente a la

cantidad de carbohidrato ingerido. La carga glicémica se define como el producto del índice glicémico de los alimentos por la cantidad de carbohidratos disponibles presentes en la porción consumida, dividido entre 100. Los valores usados para esta clasificación de los alimentos según su carga glicémica consideran la glucosa como alimento de referencia [168].

2.5.3.4 Elección del tipo de carbohidrato

La hiperglucemia derivada de la ingestión de carbohidratos rápidamente biodisponibles conlleva un incremento de los radicales libres que están detrás de numerosas enfermedades no transmisibles. Tras la hiperinsulinemia ligada a la ingesta de carbohidratos disponibles aparece un estado de hipoglucemia reactiva que se ha asociado con hiperfagia incluso tras haber alcanzado los niveles normales de glucosa en sangre. Además, el estado de hiperinsulinemia conduce a una selección conductual preferencial de alimentos con alto índice glicémico, en el que se crea un ciclo de hipoglucemia e hiperfagia que predispone al aumento de peso y obesidad. Por otro lado, la hiperinsulinemia conduce a una mayor síntesis lipídica hepática que conlleva una hipertrigliceridemia y un aumento del almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo [169, 170].

Estudios que relacionan el índice glicémico y la diabetes tipo 2 proporcionan una evidencia sólida (según criterios de causalidad de Bradford-Hill) de que las dietas que tienen un elevado índice o carga glicémica incrementan sustancialmente el riesgo de diabetes tipo 2 entre poblaciones sanas de hombres y mujeres. En cuanto a los niños, numerosos estudios demuestran una importante relación entre la ingesta de carbohidratos disponibles y un aumento del riesgo cardiometabólico, diabetes y obesidad causado por el aumento de los lípidos séricos [171, 172].

Revisiones recientes concluyen que hay evidencia consistente de que la estrategia para reducir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 incluye reducir la respuesta posprandial glicémica e insulinémica, recomendando la incorporación de una dieta saludable, con bajo

índice y carga glicémica [173, 174]. Existen otros estudios en los que utilizan dietas con un potencial similar a los inhibidores de α -glucosidasa para disminuir la digestión y absorción de carbohidratos. Estas dietas son capaces de reducir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, ya que disminuyen en igual medida la glicemia y la insulinemia posprandial, por lo que serían incluso más efectivas disminuyendo la resistencia a la insulina y la grasa corporal [157].

El aumento aproximado de un 90% de personas diabéticas en los últimos años refleja la gran repercusión sobre la salud pública de las dietas de elevada carga glicémica [171]. Todos estos estudios ponen de manifiesto la importancia de modular la digestibilidad y la biodisponibilidad de la glucosa, ya que sus efectos tienen numerosas consecuencias, más allá de la hiperglicemia a las 2 horas posprandial. En una situación de retraso en el crecimiento y posterior recuperación que se caracteriza por ser una condición de resistencia a la insulina y almacenamiento excesivo de grasa, resulta sencillo prever que la calidad de los carbohidratos de la dieta potenciará o no las consecuencias negativas del *catch-up fat*.

2.5.3.5 Mecanismos implicados en el control glicémico de los carbohidratos de digestión lenta y de baja digestibilidad

Los mecanismos existentes tras las ventajas de la ingestión de carbohidratos de bajo índice glicémico los relacionan con su velocidad de absorción intestinal, lo que resulta en un menor aumento de los niveles de glucosa en sangre y la demanda de insulina. Además, la absorción prolongada de carbohidratos a lo largo del tiempo disminuirá la síntesis de ácidos grasos que, junto a unos niveles de insulina sostenidos, permitirá que los tejidos retiren la glucosa de la circulación a un ritmo más rápido. Como resultado, las concentraciones de glucosa en sangre regresan al valor inicial a pesar de la absorción continua de glucosa en el intestino. Por lo tanto, se observa una reducción en el aumento del pico posprandial y del área incremental bajo la curva de glucosa en sangre [175].

Tanto la cantidad como el índice glicémico de los carbohidratos ingeridos son también un importante regulador de la utilización de combustible. La capacidad del organismo para cambiar entre la utilización de grasas y carbohidratos es lo que se conoce como flexibilidad metabólica y se ha visto que la ingestión de carbohidratos de bajo índice glicémico está asociado con una mayor oxidación de grasas posprandial en sujetos sanos [176]. Esto permite un ahorro de glucógeno intramuscular e intrahepático gracias a la disminución de la relación de oxidación de carbohidratos. Por este mismo motivo, resultan útiles en las intervenciones que tienen como objetivo optimizar la oxidación de grasas ya que pueden también reducir la incidencia y prevalencia de enfermedades metabólicas como el sobrepeso, el síndrome metabólico o la diabetes tipo 2. Esta capacidad para movilizar y oxidar grasas en sujetos obesos está demostrada. Se ha observado que en sujetos obesos con resistencia a la insulina y síndrome metabólico, la sustitución parcial de carbohidratos de alto índice glicémico en comidas y bebidas por bajo índice glicémico resultan en una mayor oxidación posprandial de grasa en reposo y durante la actividad física [177]. Este efecto puede ser atribuido a que las menores concentraciones de insulina son capaces de favorecer la lipólisis periférica, incrementando los ácidos grasos plasmáticos y fomentando la β -oxidación en el músculo esquelético [178, 179].

En conclusión, los carbohidratos digeribles de bajo índice glicémico que tienen una liberación baja de glucosa inducen [142]:

1. Niveles de glucosa posprandial elevados a largo plazo sin grandes elevaciones de la concentración de glucosa e insulina posprandial.
2. Aumento de la oxidación de ácidos grasos independientemente de la cantidad de carbohidratos consumidos.
3. Obtención de energía prolongada y una mejora de la capacidad muscular.

La fibra actúa además a nivel local en el propio intestino delgado aumentando el volumen del contenido del lumen y su viscosidad, por lo que tiene una eficiencia energética baja al disminuir y ralentizar la absorción de carbohidratos y grasas. Este efecto produce una menor glucemia y lipemia posprandial y por ende una menor liberación de insulina [180, 181]. Tras la fermentación en el colon, se produce la liberación de ácidos grasos de cadena corta que también son responsables de parte de los efectos observados. Estudios con modelos animales y clínicos, tanto en pacientes sanos como con alteraciones de la homeostasis glucídica han mostrado que en los beneficios derivados del consumo de fibra se destacan el control de peso, el aumento de la sensibilidad a la insulina, la disminución de triacilglicerolos, la regulación del apetito y la mejora de la composición corporal. Además, se observan una disminución del colesterol total y el colesterol-LDL, mejora en los valores del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), hemoglobina y albúmina glicosilada [182-184]. Entre los efectos de la fibra que podrían ser interesantes para las patologías que afectan a las personas que experimentan un retraso en el crecimiento, destaca un aumento de la termogénesis y de la oxidación de lípidos en el hígado [180]. Los ácidos grasos de cadena corta también pueden mejorar la función de las células β e intervenir en la secreción de insulina estimulada por glucosa [185] y mejorar la oxidación de grasas en el músculo esquelético a través de la activación de AMPK [156, 186, 187].

2.5.3.6 Elección del tipo de carbohidrato. Potencial de los carbohidratos

Por tanto, un bajo índice glicémico y lenta digestibilidad de los carbohidratos son dos parámetros a tener en cuenta por su implicación en la regulación de los niveles de glucosa e insulina. Su inclusión en la dieta de personas con alteraciones de la homeostasis glicémica, como es el caso de los niños que están experimentando un *catch-up growth*, parece una excelente apuesta [188-190]. El objetivo es mitigar los efectos negativos de este mecanismo compensatorio por los numerosos beneficios esperados al disminuir la absorción de los ácidos grasos y carbohidratos [191]. De este modo, a grandes rasgos se podría esperar una reducción

de la respuesta glicémica [192] y una mejora del perfil lipídico [193-195], lo que en conjunto prevendría la deposición lipídica [196]. El efecto sobre la flexibilidad metabólica en el músculo esquelético [197] permitiría mejorar su capacidad glucolítica y oxidativa [198], así como una mayor oxidación de ácidos grasos permitiendo una mejora en la funcionalidad muscular asociada al mantenimiento de las reservas de glucógeno [142].

3 OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral aborda el estudio del efecto de ciertos compuestos bioactivos sobre las secuelas del *catch-up growth*. Más concretamente, nos centramos en las posibilidades de los carbohidratos de baja digestibilidad por sus efectos beneficiosos sobre la homeostasis glicémica. Los objetivos específicos que se persiguen con el presente trabajo son el estudio del efecto de los carbohidratos de baja digestibilidad sobre los siguientes parámetros causados por el *catch-up growth* en un modelo animal de retraso en el crecimiento:

1. Cambios morfométricos en los animales.
2. Bases moleculares de las alteraciones observadas en el tejido adiposo.
3. Bases moleculares de las alteraciones observadas en el hígado.
4. Bases moleculares de las alteraciones observadas en el músculo esquelético.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo con el Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (Consejo de Europa nº123, Estrasburgo 1986). Se siguieron las directrices éticas para la experimentación animal proporcionadas por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre). El protocolo animal de este estudio ha sido aceptado por el Comité de Bienestar Animal de la Junta de Andalucía, adjudicándole el número 23/05/2016/088.

4.1 Diseño del experimento

El estudio se llevó a cabo siguiendo el modelo de retraso en el crecimiento establecido por Friedman et al. [199]. Los animales fueron sometidos a una reducción de la disponibilidad de alimento con respecto a la cantidad ingerida por sus homólogos controles. De esta forma se intentó mimetizar las características de los individuos que sufren un retraso en el crecimiento por desnutrición.

Para el estudio se utilizaron 30 ratas macho *Sprague-Dawley* (Oncins France Strain A (OFA)) de entre 21-25 días de edad y 70 gramos de peso. Estos animales se encontraban en el período de destete y fueron proporcionados por Charles River (Orleans Cedex, Francia).

A su recepción, las ratas, se alojaron en grupos de 5 animales debido a su corta edad. Transcurrido un período de 5 días de aclimatación, se alojaron individualmente en sus respectivas jaulas para dar comienzo al experimento. En todo momento se controló la temperatura ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) y la humedad relativa de $55\%\pm5$. El ciclo de luz-oscuridad fue de 12h-12h (ZT0=7am). Durante todo el experimento se les administró agua desionizada (MilliQ) *ad libitum*.

En este experimento se diferenciaron claramente dos etapas (Figura 4): una etapa de restricción proteico-energética de los animales y una segunda etapa de restitución del aporte energético diario. En este segundo período se realizó una intervención nutricional con las diferentes dietas experimentales.

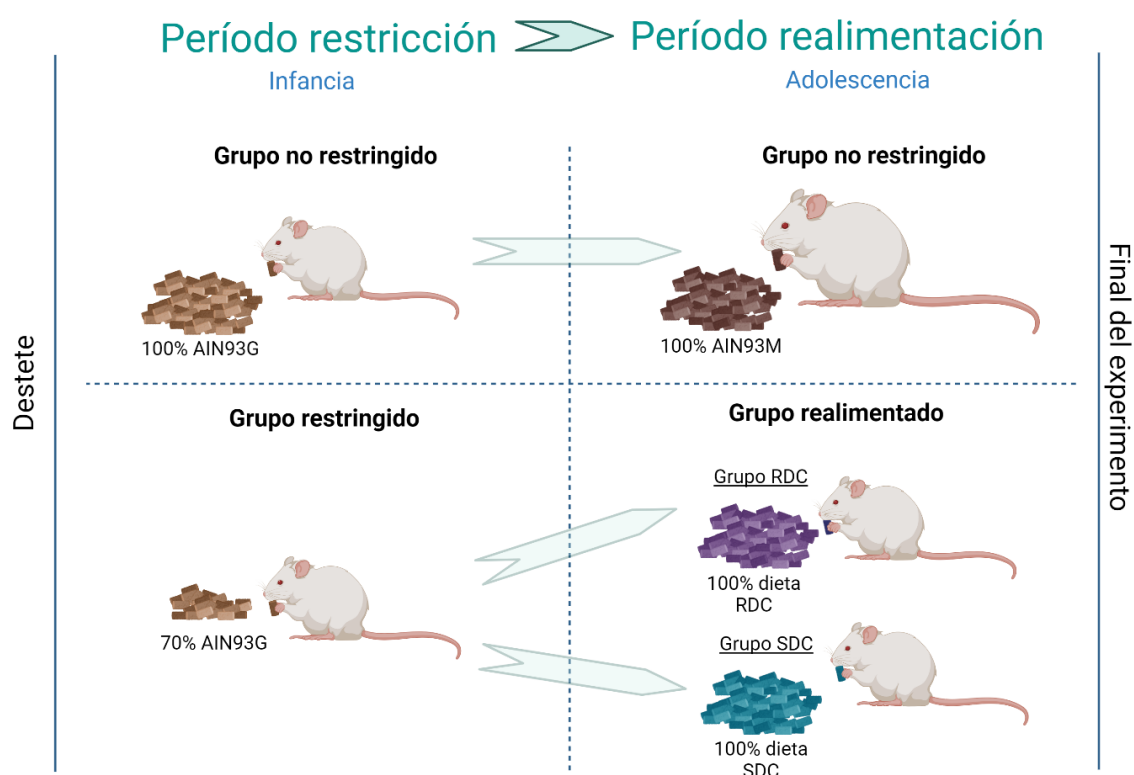


Figura 4. Esquema del diseño experimental. Creado con Biorender.com.

4.1.1 Período de restricción

Al inicio del experimento los animales fueron pesados y distribuidos en dos grupos, cuidando que no hubiera diferencias significativas en sus pesos:

- **Grupo no restringido (NR):** 10 ratas a las que durante 4 semanas se les proporcionó dieta AIN93-G y agua *ad libitum*.

- Grupo restringido (RR): 20 ratas a las que durante 4 semanas se les alimentó con el 70% de la cantidad de AIN93-G que ingerían el día anterior las ratas del grupo no restringido corregido por su peso (g de dieta ingeridos/100g de peso corporal por día) y agua *ad libitum*.

Diariamente se realizó un control de peso e ingesta a todos los animales del estudio. A las 4 semanas de la restricción proteico-energética, se les midió la composición corporal con un equipo de resonancia magnética nuclear cuantitativa (EchoMRI 700 system; Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA). Además, se analizó el efecto de la restricción sobre la funcionalidad muscular de las ratas realizando una prueba en un equipo que mide la fuerza de agarre BIOSEB (Vitrolles, Francia).

4.1.2 Período de realimentación

En este período, los animales restringidos recibieron el 100% de sus requerimientos energéticos y nutricionales. Esta transición se realizó paulatinamente: durante los primeros tres días los animales tuvieron acceso al 80, 90 y 100% de la ingesta diaria del grupo no restringido. A partir del cuarto día los animales fueron alimentados *ad libitum* hasta el final del experimento.

En este período se les proporcionó a los animales que sufrieron una restricción alimentaria las diferentes dietas experimentales. Para ello, el grupo RR del período de restricción se dividió en dos grupos sin diferencia en sus pesos:

- Grupo RDC: los animales (n=10 ratas) fueron realimentados a lo largo de este período con la dieta RDC y con libre acceso al agua.
- Grupo SDC: los animales (n=10 ratas) fueron realimentados a lo largo de este período con la dieta SDC y con libre acceso al agua.

Paralelamente el grupo no restringido (NR) que durante el anterior período se alimentaron *ad libitum* con dieta AIN93-G, continuaron haciéndolo hasta el final del experimento con una dieta estandarizada de mantenimiento para roedores, dieta AIN93-M, y con libre acceso al agua.

Diariamente se registró el peso corporal y la ingesta de los animales. A las 4 semanas del tratamiento nutricional, se les midió la composición corporal en un equipo de resonancia magnética. Además, se analizó una prueba de funcionalidad muscular con un equipo que mide la fuerza de agarre. Posteriormente, los animales fueron introducidos en jaulas especiales con el objetivo de realizar un análisis de calorimetría indirecta (Phenomaster TSE System, Bad Homburg, Germany). Llegados al final del experimento, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de diferentes tejidos.

4.2 Dietas experimentales

Todas las dietas fueron formuladas y elaboradas en las instalaciones del Departamento de Investigación y Desarrollo de los Laboratorios Abbott (Granada, España) (Tabla 1).

En el período de restricción calórica, los animales fueron alimentados con la dieta AIN93G. Es una dieta estándar para roedores formulada específicamente para aportar los nutrientes necesarios durante la gestación, lactancia y en la etapa de crecimiento posterior al destete (infancia). En el período de realimentación, los animales fueron alimentados con la dieta AIN93M, una dieta estándar de roedor formulada para aportar los nutrientes necesarios desde el final del período de infancia hasta la vejez. Ambas dietas están basadas en las establecidas por Reeves, Nielsen & Fahey (1993) [200].

Macronutrientes (g/100g dieta)	Dieta			
	AIN93G	AIN93M	RDC	SDC
Carbohidratos (g/100g macronutriente)	67,4	78,5	67	67
Sacarosa	15,3	13,5	32	
Isomaltulosa				26,4
Sucromalt				22,1
Harina de maíz	57,9	60,8		
MD29			64	23
MD 9-16	19,2	20,3		
IMOs				11,5
MD resistente Fibersol				10
Fibra soluble FOS			4	
Fibra soluble Synergy-1				7
Fibra insoluble celulosa	4,8	5,4		
Carga glicémica	1063,7	1269	851	468
Proteínas (g/100g macronutriente)	17,8	14,4	15	15
Caseinato cálcico	100	100	53	53
MCP80			29	29
Aislado de proteína de soja			18	18
Grasas (g/100g macronutriente)	7	4	9,8	9,8
Aceite de girasol alto oleico			46	46
Aceite de soja	89	88	30	30
Aceite de canola			13	13
Aceite de triglicéridos de cadena media			7	7
Lecitina líquida			3	3
DHA			1	1

Tabla 1. Dietas empleadas. AIN93G y AIN93M corresponden a dietas estándares para roedores según edad. La dieta RDC (Rapid Digestible Carbohydrate) contiene carbohidratos de digestión rápida. La dieta SDC (Slowly Digestible Carbohydrate) contiene carbohidratos de digestión lenta.

4.2.1 Dietas humanizadas

Las dietas experimentales se formularon considerando el concepto de suplementación. En la intervención nutricional sobre los niños malnutridos, además de su comida diaria se recomienda un aporte adicional nutricional que le proporcione tanto la energía como los nutrientes requeridos [201]. Teniendo en cuenta esta premisa se formulan las dietas RDC y SDC de forma que, el 50% de la energía ingerida diariamente por el animal procedía de la dieta estándar de roedor (AIN93M), y el otro 50% de un hipotético producto nutricional. Este producto aportaría un perfil de proteínas y grasas diferentes al utilizado en las dietas estándar de roedores. Ambas dietas experimentales (RDC y SDC) tienen las mismas cantidades de macronutrientes: 9,8g de grasa/100g de dieta, 15g de proteínas/100g de dieta y 67g de carbohidratos/100g de dieta. La diferencia entre ambas se encuentra en el perfil de carbohidratos.

La dieta RDC, con una carga glicémica total de 851, contiene en su composición carbohidratos de digestión rápida con elevado índice glicémico (sacarosa, maltodextrinas, almidón y fructooligosacáridos en un pequeño porcentaje).

La dieta SDC, con una carga glicémica total de 468, contiene en su composición carbohidratos de digestión lenta que presentan un bajo índice glicémico, incluyendo:

- Isomaltulosa (Palatinosa™), disacárido que se obtiene por fermentación bacteriana de la sacarosa, que es prebiótico y de bajo índice glicémico, desarrollado por Beneo-Palatininit (Obrigheim, Alemania) [202].
- Sucromalt®, es un producto desarrollado por Cargill Inc. (Xtend, Wayzata, Minnesota, EEUU). Se trata de una mezcla modificada enzimáticamente de sacarosa y maltosa en una proporción 8:1. Está compuesto por fructosa, leucrosa y oligosacáridos de glucosa y es de bajo índice glicémico [203]. Es totalmente digerible.

- Isomaltooligosacáridos (IMOs) una mezcla de carbohidratos de cadena corta (isomaltosa, pentosa e isomaltotriosa) unidos entre sí por enlaces resistentes a la digestión que se obtienen por hidrólisis enzimática del almidón con características prebióticas [204].
- Fibersol®, producto desarrollado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., (Itami, Japan). Es una maltodextrina no viscosa y resistente a la digestión con efectos prebióticos [205].
- Inulina enriquecida con fructooligosacáridos (Synergy-1), proporcionada por Beneo-Palatinit (Obrigheim, Alemania). Se trata de una mezcla en una relación 1:1 de oligofructosa e inulina de alto rendimiento [206] también prebiótica.

4.3 Composición corporal

En este estudio se empleó un equipo de resonancia magnética nuclear cuantitativa (EchoMRI 700 system; Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA). Esta técnica emplea campos magnéticos para obtener directamente la cantidad de masa grasa y magra de los animales [207]. El método se optimizó para causar la mínima perturbación al animal, no fue necesaria la sedación y la prueba duró en torno a 30 segundos por cada rata (Figura 5).



Figura 5. Equipo de resonancia magnética nuclear. Imagen obtenida de la web de EchoMRI [3].

4.4 Test de agarre

El rendimiento muscular se midió haciendo un test agarre en un equipo que mide la fuerza de agarre de BIOSEB (Vitrolles, Francia). Este equipo mide la tensión máxima (en Newton) que ejerce una rata al hacer resistencia con sus dos patas delanteras antes de soltarse cuando se tira de ella desde la base de la cola. Se realizaron un máximo de 6 medidas y la media de todas ellas se utilizó en los análisis (Figura 6).



Figura 6. Test de agarre. Imagen obtenida de [2]

4.5 Calorimetría indirecta

Es un método no invasivo que permite medir el metabolismo de los animales sin alterar su comportamiento normal. Las ratas se introducen en unas cubetas asociadas al Sistema de Calorimetría Indirecta Phenomaster (TSE System, Bad Homburg, Alemania) que permiten medir el consumo de oxígeno (VO_2) y de producción de dióxido de carbono (VCO_2) con el software del proveedor (Figura 7). De esta manera se calculó el cociente respiratorio (RQ), definido como la relación entre el volumen de CO_2 producido y el volumen de O_2 consumido [208].



Figura 7. Equipo de calorimetría indirecta. Imagen obtenida de [1].

$$RQ = \frac{VCO_2}{VO_2}$$

El RQ se aplica para conocer qué tipo de combustible está empleando un organismo para la obtención de energía. Los principales sustratos de producción de energía son los carbohidratos y los lípidos y hemos utilizado la tabla modificada de Lusk para analizar nuestros resultados. Esta tabla está basada en el experimento llevado a cabo por los autores [209] donde se analizaron los valores de RQ en perros alimentados con diferentes combinaciones de grasa y carbohidratos. Se concluyó en el estudio que una dieta basada al 100% en carbohidratos reflejaba un valor de 1 de RQ, mientras una dieta basada en grasas reflejaba un valor de 0.70. Esto es debido a que para la oxidación de glucosa se libera más energía que para los lípidos, aunque hace falta menos oxígeno para oxidarla. Entre ambos valores, diferentes proporciones de carbohidratos y grasas fueron relacionadas con diferentes valores de RQ. Así, hemos determinado el valor de RQ para calcular la fuente de energía que se estaba empleando en cada uno de los grupos experimentales con el objetivo de conocer la afectación del modelo y el efecto posterior de cada una de las dietas sobre la flexibilidad metabólica [210, 211].

Además, a partir de los datos obtenidos por el equipo, se calculó el gasto energético basal (GEB) con la ecuación de Weir [212, 213].:

$$GEB = [(VO_2 \times 3,941) + (VCO_2 \times 1,11)] \times 1,44$$

4.6 Toma de muestras

Al final del período de realimentación las ratas fueron sometidas a un ayuno de 12-14 horas. En condiciones de ayuno, se les extrajo sangre de la cola a los diferentes animales. Posteriormente los animales fueron sometidos a un sondaje orogástrico con una solución de su dieta experimental (10kcal de dieta/kg de peso corporal), diluida con agua MilliQ. Transcurrida una hora posprandial las ratas se anestesiaron intraperitonealmente y colocaron en posición supina. Se les realizó una incisión ventral a lo largo del cuerpo y se sacrificaron por desangramiento.

Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca tras el sacrificio. Ambas muestras de sangre (la obtenida en condición de ayuno y la posprandial) se centrifugaron inmediatamente durante 10 minutos a 4°C y 900xg en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 17R (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) para la obtención de suero.

Los tejidos como músculos (*gastrocnemius*, *soleus* y *tibialis*), hígado y tejidos grasos (grasa visceral y subcutánea) fueron identificados, extraídos, pesados y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C para su posterior análisis. El ciego se identificó, aisló, se extrajo su contenido y se limpió, y ambas partes fueron pesadas. El yeyuno y el íleon fueron identificados, aislados, medidos, limpiados, pesados y se raspó la mucosa para su posterior pesaje.

4.7 Parámetros bioquímicos

El suero se aisló para el análisis de los parámetros bioquímicos de los animales utilizando el analizador de química clínica Pentra 400 (Horiba ABX, Montpellier, Francia). Se midieron con este equipo en suero: glucosa, triglicéridos y colesterol. Las concentraciones séricas de insulina, leptina y grelina se midieron en suero mediante el sistema Bioplex 200 (BIO-RAD, California) utilizando el kit Milliplex Map Rat Metabolic Magnetic Bead Panel Kit (Millipore, Billerica, MA, USA). La IL-6 y el TNF- α en suero se midieron usando también el sistema Bioplex 200 (BIO-RAD, California), con el panel de Milliplex Map Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore, Billerica, MA, USA). Estos kits se basan en la tecnología Luminex® xMAP®, en la que se incluyen unas perlas magnéticas codificadas fluorescentes y emplea la tecnología de inmunoensayo, ya que están recubiertas de un anticuerpo específico. Posteriormente se incubó la muestra con un conjugado de estreptavidina, que es la molécula informadora, para completar la reacción en la superficie de la microesfera. Al final del análisis se introduce la placa en el equipo y el software nos proporciona los resultados. Los análisis se realizaron en placas de 96 pocillos siguiendo las

instrucciones del fabricante y los datos se obtuvieron por interpolación utilizando los estándares del kit.

4.8 Análisis de *Western blot*

La extracción de tejidos se hizo utilizando el siguiente tampón de lisis: 50mMHepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM NaF, 20 mM NaPPi, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM β-glicerolfosfato, 2 mM de ortovanadato de sodio, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 4 μg/L leupeptina.

Los tejidos fueron homogeneizados durante 15 segundos en un homogeneizador Polytron en la opción #4. Posteriormente fueron centrifugados a 16.000xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf (1,5 mL) y sonificado durante 15 segundos (ciclo 0,5, amplitud 70%). Las muestras del músculo *gastrocnemius* de la rata fueron primero pulverizadas usando un mortero y nitrógeno líquido y después sometidas al protocolo de homogeneización previamente descrito.

La concentración proteica de las muestras fue medida usando el método del ácido bicinonínico [214].

Se usaron anticuerpos específicos frente:

- GLUT4 (Biogenesis Ltd., Poole, Reino Unido)
- Total y fosfo (Ser473)-PKB/Akt y factor potenciador específico de miocitos 2D (MEF2D) (Cell Signalling, Beverly, MA, EE. UU.)
- Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), ácido graso sintasa (AGS), GLUT1 y GLUT2, proteínas de unión al elemento regulador de esteroides SREBP1 y SREBP2, piruvato quinasa (PKM $\frac{1}{2}$), piruvato quinasa deshidrogenasa (PDK4),

ATPasa5B, proteínas desacoplantes UCP1 y UCP2 (Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE. UU.))

- El anticuerpo frente a la piruvato carboxilasa (PC) se desarrolló en el laboratorio del Dr. Salto.
- El anticuerpo frente a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) se utilizó como control de carga.

Los datos se normalizaron utilizando los valores de los animales control como 100%.

4.9 PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total fue aislado del tejido adiposo, músculo e hígado usando el reactivo TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). La cantidad de ARN total fue medido usando un espectrofotómetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Madrid, España) y la calidad fue verificada en un gel de electroforesis de agarosa al 1%, 1µg de ARN total de cada muestra fue retrotranscrito usando un kit de síntesis de ADNc para RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). La qPCR se llevó a cabo usando cebadores específicos en un equipo de PCR en tiempo real MiniOpticon (Bio-Rad, Madrid, Spain) con el software de Bio-Rad CFX Manager 3.1 y una sonda fluorescente de detección (SYBR Green) tras cada ampliación del ciclo. Las secuencias de los cebadores fueron:

- Cpt1b F- 5'-TATTAAGAACACGAGCCAAC-3' y R-5'-GTAGCAAGTCTGTCTCTTTG-3'
- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), F-5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3' y R-5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
- PDK4 F-5'-CTATTCAAGAATGCCATGAGG-3' y R-5'-GTATGTGTAATAAGAGGCG-3'
- Receptores activados por proliferadores peroxisomales δ (PPAR δ), F-5'-CATAACGCACCCTTCATC-3' y R-5'-GATGTTCTTGGCGAACTC-3'
- Receptores activados por proliferadores peroxisomales γ (PPAR γ), F-5'-AAGACAACAGACAAATCACC-3' y R-5'-CAGGGATATTTTGGCATACTC-3'

El ADNc se utilizó como molde en 10 μ L de reacción incluyendo 5 μ L de 2x iTaq Universal SYBR Green supermix y 500 nM de cada cebador. En cada ensayo se incluyeron controles negativos (sin molde de ADN) de cada set de cebadores. El programa del qPCR fue realizado a 95°C (2 min), seguido de 40 ciclos a 95°C (15 segundos), 5°C (30 segundos) y, finalmente, un programa de curva de fusión (60°C–95°C con una tasa de calentamiento de 0.1°C/s y una medición de fluorescencia continua). Las medidas de expresión génica relativas a cada extracción de ARN se obtuvieron por triplicado. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia interno.

4.10 Cuantificación de glucógeno

El glucógeno hepático y muscular fue aislado como está descrito en Chan, T. M., & Exton, J. H. (1976) [215]. Los homogenizados de tejido (al 10%) se hicieron con HCl al 0,03N y se distribuyeron uniformemente en papeles de filtro (papel de cromatografía Whatman 3 MM, 2.0x2.0 cm) por duplicado. Los papeles se introdujeron inmediatamente en un vaso de precipitado con una solución al 66% de EtOH y se pusieron en agitación con un imán giratorio protegido de los papeles por una malla de alambre. Los papeles de filtro se lavaron posteriormente 3 veces durante 40 minutos en EtOH al 66%. Luego se enjuagaron con acetona y se secaron bajo una corriente de aire caliente. Una vez secos, se cortaron en cuatro trozos y se colocaron en un tubo con 0,4 mL de una solución 0,2M de tampón acetato, pH 4,8 conteniendo 0,2mg de amilo- α -1,4-a-1,6-glucosidasa y agua hasta un volumen final de 2mL. Los viales se incubaron durante 90 minutos a 37°C en agitación suave. Los controles se prepararon incubando las alícuotas de homogeneizado en tampón acetato sin la aminoglucosidasa. El contenido en glucosa de las muestras incubadas fue determinado por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa.

4.11 Determinación cuantitativa de Creatina Quinasa (CK)

La actividad creatina quinasa fue determinada usando el kit de CK-NAC (Spinreact, Gerona, España). La CK cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP. Esta reacción está acoplada a aquellas catalizadas por la hexoquinasa y la glucosa-6-fosfato. La relación de formación de NADPH, medida espectrofotométricamente, es proporcional a la actividad de la CK presente en la muestra.

4.12 Análisis estadístico

Los resultados se expresan con valores $\pm$ error estándar de la media (SEM). La normalidad de las variables continuas se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para la comparación de los grupos se realizó usando el método estadístico paramétrico t test o el test no paramétrico de Mann-Whitney dependiendo del test de homocedasticidad (test de Bartlett). Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de $p < 0.05$, mientras que diferencias significativas con valores de p entre el 0.05 y el 0.10 son definidas como tendencias. El tratamiento y análisis de datos se realizaron con el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

5 RESULTADOS

5.1 Período de restricción

5.1.1 Datos de ingesta, morfométricos, de composición corporal y fuerza

En la Tabla 2 se muestran los datos morfométricos medidos al final del periodo de restricción. La diferencia en la ingesta, medida como gramos de dieta totales ingeridos por el grupo restringido y no restringidos asciende a un 38% (Figura 8 A). Como consecuencia, los animales que no estuvieron sometidos a la restricción proteico-calórica pesaron un 56% más (Figura 8 B) que los del grupo restringido; ya desde el 4º día de experimento podemos apreciar diferencias significativas ($p<0.05$) entre los valores de ambos grupos (Tabla 2 y Figura 8 B). Al final del período de restricción el incremento de peso corporal reflejaba una diferencia del 75% en el peso total ganado entre grupos, poniendo de manifiesto que el retraso en el crecimiento sufrido por los animales sometidos a la restricción calórica les impidió ganar peso con respecto al grupo control que estuvo alimentado *ad libitum* (Tabla 2).

Medida al final del período de restricción	NR	RR
Gramos totales de dieta ingeridos/grupo	1357,7	938,5
Kcal totales de dieta ingeridos/grupo	4887,6	3378,4
Peso (g)	346,5 ± 5,6	152 ± 3,3*
Ganancia de peso durante el período (g)	255,2 ± 4,3	63,8 ± 3*
Longitud (mm)	214,2 ± 1,8	174,2 ± 1*
Índice de masa corporal (g/cm ²)	0,8 ± 0,01	0,5 ± 0,006*
Composición corporal (g grasa/g masa magra)	0,1 ± 0,01	0,02 ± 0,004*
Gramos de grasa corporal (g)	33,3 ± 3,4	2,46 ± 0,6*
Gramos de masa magra corporal (g)	302 ± 5,6	144 ± 3,2*
Test de agarre (Newton)	8,6 ± 0,3	6,5 ± 0,3*

Tabla 2. Datos morfométricos medidos al final del período de restricción. Los resultados se muestran como la media ± el error estándar de la media (SEM) (n=10). RR= Grupo restringido. NR= Grupo no restringido. * p<0.05 con respecto al grupo no restringido.

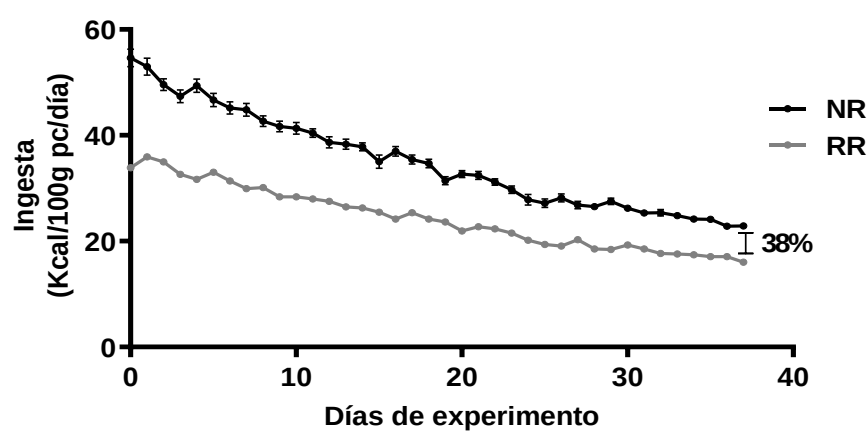
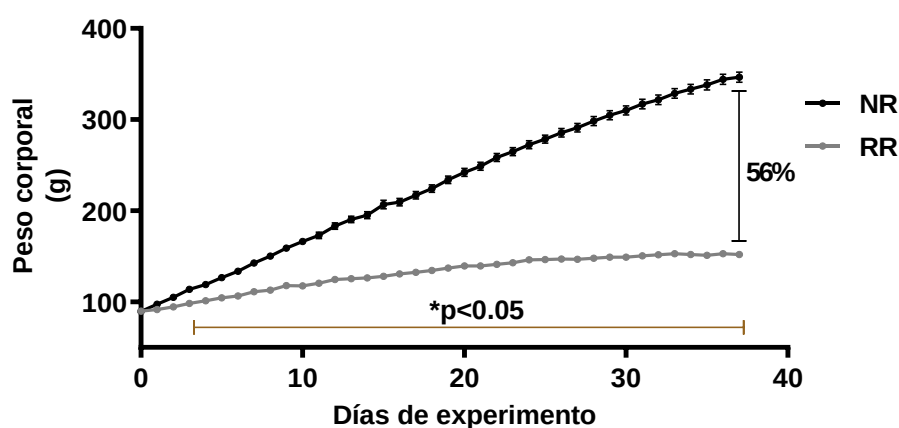
A**B**

Figura 8 . A. Ingesta durante el período de restricción. Los datos se representan en Kcal por 100 gramos de peso corporal y por día. B. Peso corporal (gramos) durante el período de restricción. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). RR= Grupo restringido. NR= Grupo no restringido. * $p<0.05$ con respecto al grupo no restringido.

En los datos de longitud de los animales, medida como la distancia desde la punta de la nariz hasta la base de la cola, se alcanza una diferencia significativa ($p<0.05$) entre el grupo no restringido y restringido del 19% al finalizar el período de restricción (Tabla 2).

En el análisis de los datos del índice de masa corporal, medido como los gramos de peso corporal entre la longitud del animal en cm^2 , se obtuvo una diferencia significativa de un

67% entre ambos grupos al final de este período ($p<0.05$) (Tabla 2). La medida de la composición corporal refleja una mayor proporción de grasa respecto a la masa magra para los animales que no estuvieron restringidos, diferente significativamente ($p<0.05$) (Tabla 2). El desglose de los datos permite observar una mayor cantidad de grasa para los animales no restringidos (Tabla 2), así como mayor cantidad de masa magra corporal para este mismo grupo, en ambos casos significativamente diferente ($p<0.05$) (Tabla 2).

Cuando se analizó la fuerza de agarre se observó que la restricción nutricional produjo una reducción de hasta un 24% comparado con el grupo sin restricción calórica ($p<0.05$) (Tabla 2).

5.2 Período de realimentación

5.2.1 Efecto de las dietas experimentales sobre la morfometría de los animales

Durante el período de realimentación, en ambos grupos (SDC y RDC) la intervención nutricional dio lugar a un aumento significativo ($p<0.05$) en la ganancia de peso de más del 80% sin diferencias entre ambos grupos experimentales. La diferencia de peso del 56% alcanzada al final del período de restricción entre los animales restringidos y no restringidos se convirtió en un 26% al finalizar el estudio (Figura 9).

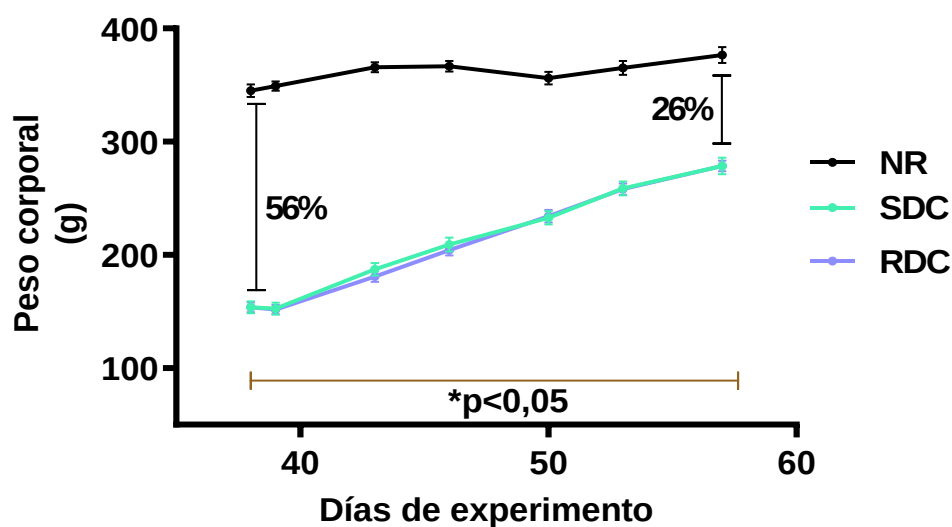


Figura 9. Peso corporal (gramos) durante el período de realimentación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo no restringido.

En el análisis de la longitud de los animales, no encontramos diferencias ni en el valor alcanzado al final del experimento ni en el incremento/peso entre los grupos experimentales (Figura 10 A y B). El índice de masa corporal tampoco mostró diferencias entre grupos (Figura 10 C).

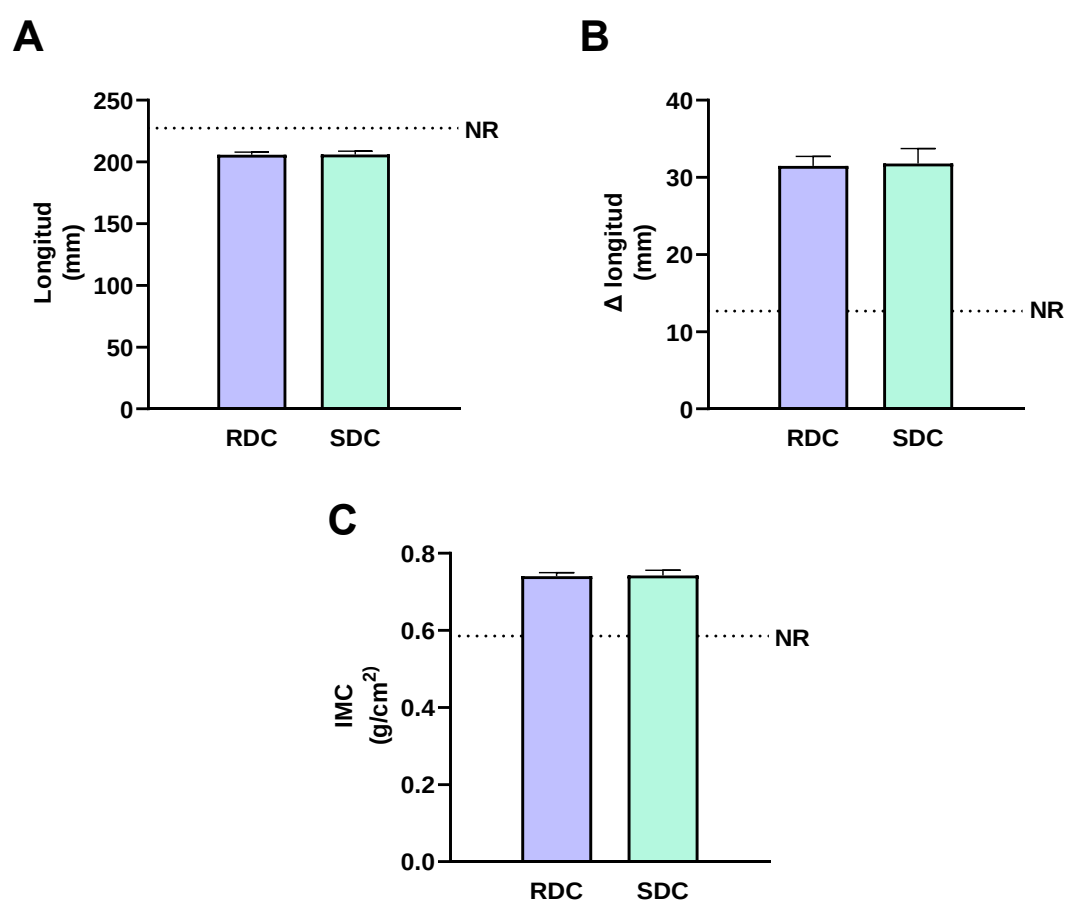


Figura 10. A. Longitud (mm) al final del período de realimentación. B. Incremento de la longitud (mm) durante el período de realimentación. C. Índice de masa corporal al final del período de realimentación. Los datos se representan como gramos de peso corporal entre longitud del animal al cuadrado. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico.

5.2.2 Ingesta de dietas experimentales

El comienzo de la alimentación *ad libitum* trajo consigo una hiperfagia en ambos grupos (SDC y RDC) hasta el final del experimento, como cabría esperar tras la fase de restricción alimentaria. El grupo RDC ingirió una cantidad de dieta significativamente mayor ($p<0.05$) que el grupo SDC (Figura 11).

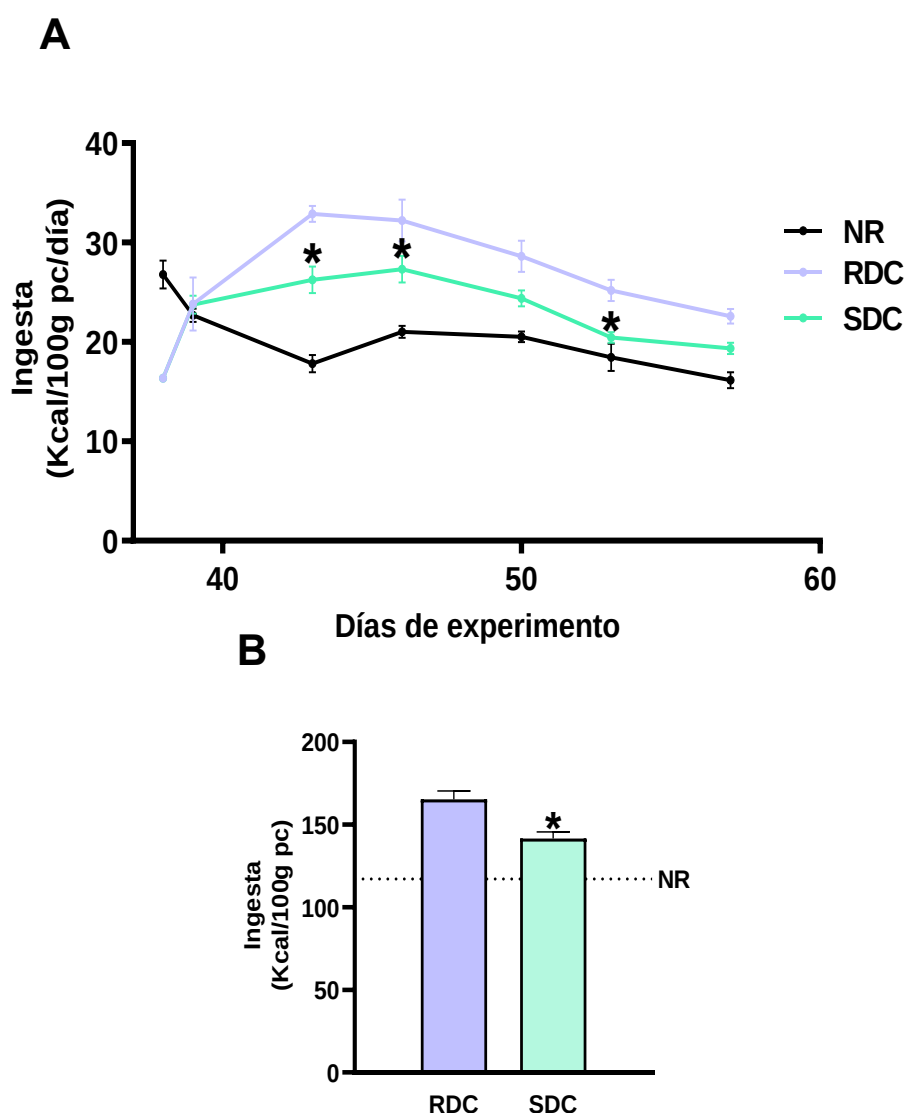


Figura 11. A. Ingesta durante el período de realimentación. Los datos se representan como las Kcal ingeridas entre 100 gramos de peso del animal y por día. B. Ingesta total durante el período de realimentación. Los datos se representan como las Kcal ingeridas entre 100 gramos de peso corporal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

Teniendo en cuenta la ingesta total y la ganancia de peso al final del período de restricción se calcula la eficiencia alimenticia de ambas dietas experimentales. Los resultados indican que no existen diferencias entre las dietas en este parámetro (Figura 12).

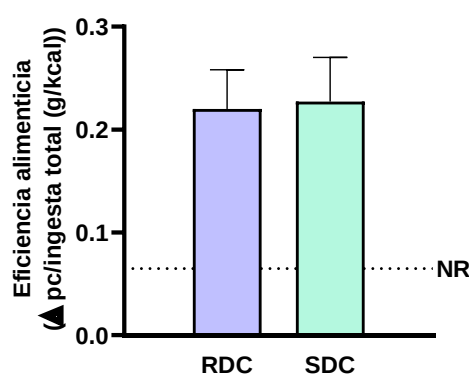


Figura 12. Eficiencia alimenticia. Los datos se muestran como el incremento de peso corporal en gramos entre la ingesta total en Kcal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico.

5.2.3 Efecto de las dietas experimentales sobre la composición corporal y la fuerza

En la comparación de la composición corporal encontramos diferencias significativas ($p<0.05$) en la cantidad de grasa corporal entre ambos grupos experimentales, tanto en el peso total como en la normalización por el peso del animal. En ambos casos fue más elevada para el grupo RDC, con un 33% de diferencia respecto al grupo SDC (Figura 13 A y B). La masa magra no reflejó diferencias entre los grupos, independientemente de la dieta ingerida (Figura 13 B y D).

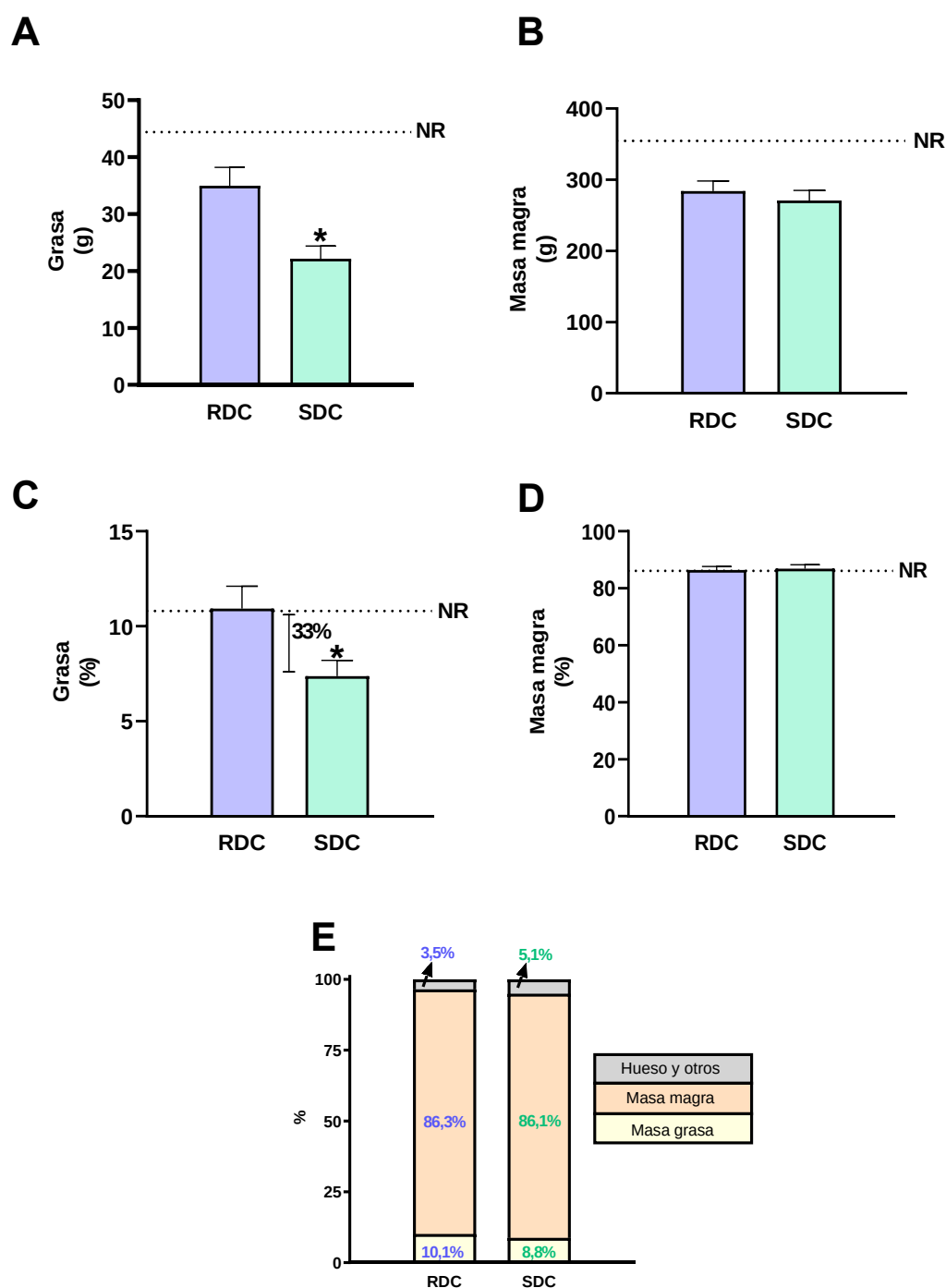


Figura 13. A. Grasa corporal (gramos). B. Masa magra corporal (Gramos). C. Porcentaje de grasa corporal (gramos) con respecto al peso del animal (gramos). D. Porcentaje de masa magra corporal (gramos) con respecto al peso del animal (gramos). E. Datos de proporción (%) de masa grasa, masa magra y hueso y otros. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

En los datos obtenidos del pesaje de los depósitos grasos al final del experimento hallamos diferencias significativas ($p<0.05$) entre grupos experimentales en la grasa subcutánea, así como en la grasa visceral, que engloba la grasa perirenal y la grasa epididimal. Todos estos tejidos siguen el mismo patrón de respuesta con una cantidad de grasa significativamente mayor ($p<0.05$) para el grupo RDC en comparación al grupo SDC (Figura 14).

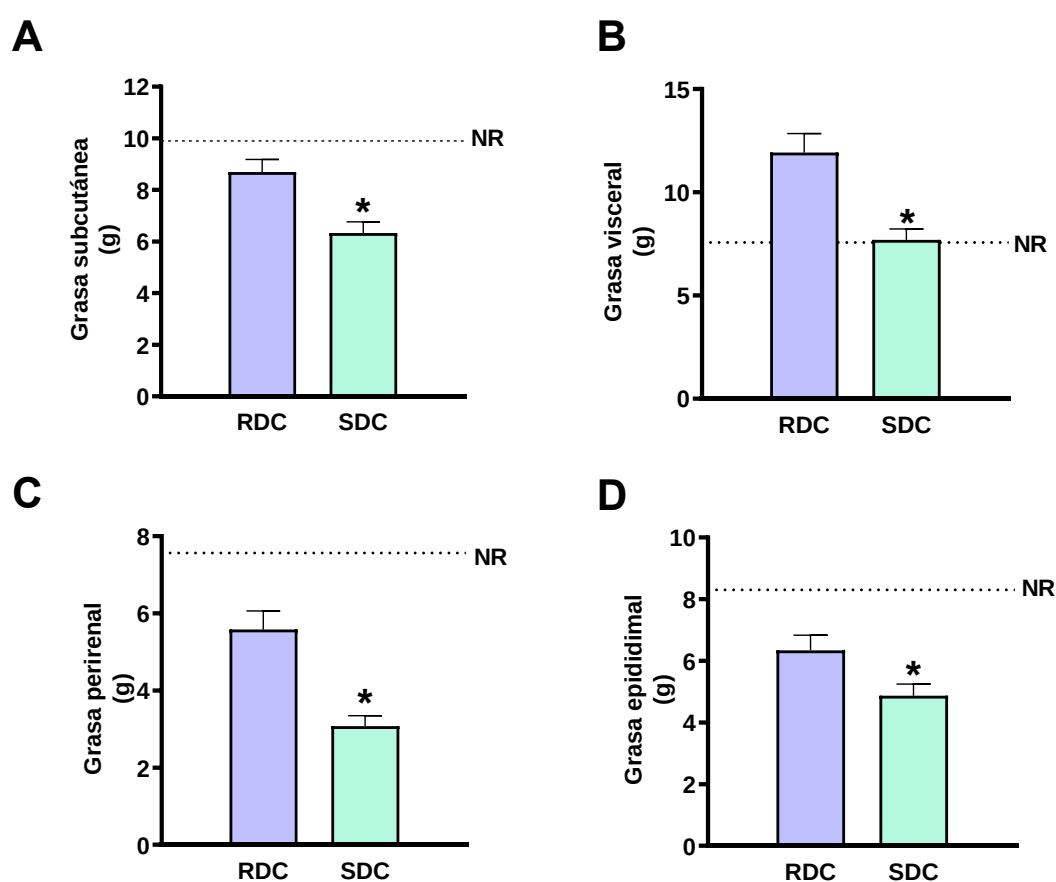


Figura 14. Pesos de diferentes depósitos grasos. Los datos se representan en gramos. A. Peso de grasa subcutánea. B. Peso de grasa visceral. C. Peso de grasa perirenal. D. Peso de grasa epididimal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

Al analizar los datos obtenidos del pesaje de los músculos *soleus*, *tibialis* y *gastrocnemius* de la pata izquierda de las ratas no hallamos diferencias entre los grupos (Figura 15).

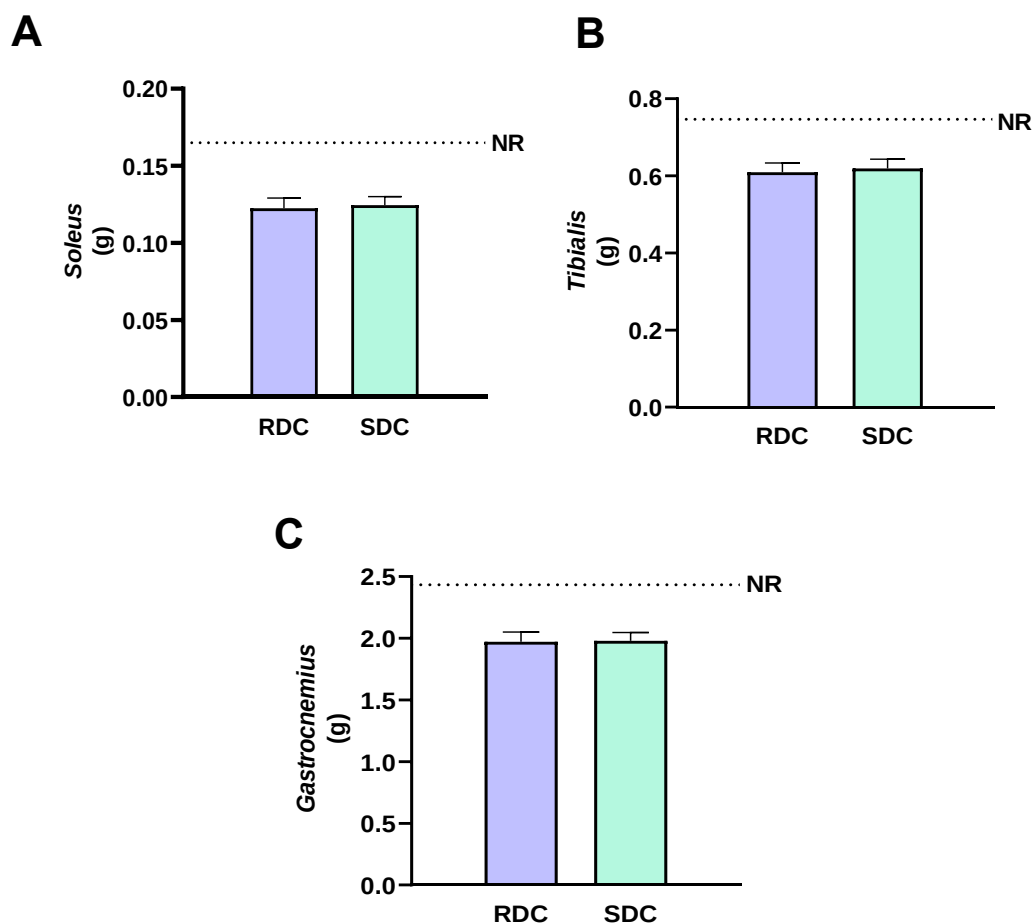


Figura 15. Pesos de diferentes músculos. los datos se representan en gramos. A. Peso del músculo *soleus*. B. Peso del músculo *tibialis*. C. Peso del músculo *gastrocnemius*. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico.

En la prueba de fuerza muscular, el grupo alimentado con la dieta SDC mostró niveles de fuerza significativamente mayores ($p<0.05$) (Figura 16) que el grupo RDC.

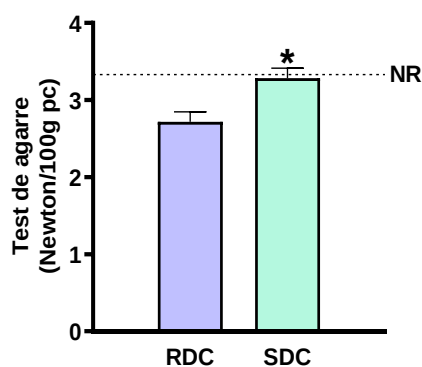


Figura 16. Datos del test de fuerza. Los datos se representan como Newton por 100 g de peso corporal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.4 Efecto de las dietas experimentales sobre la liberación de adipocinas

Los valores de leptina en suero fueron significativamente menores en el grupo SDC ($p<0.05$) que en el grupo RDC (Figura 17), lo cual estaría acorde con los resultados de los depósitos grasos descritos previamente (Figura 17).

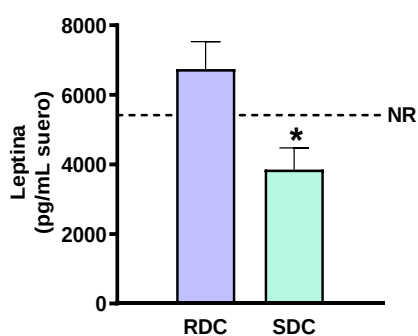


Figura 17. Valores séricos de leptina. Los datos se representan como pg de leptina por mL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.5 Efecto de las dietas experimentales sobre marcadores inflamatorios séricos

A la vista de las diferencias halladas en las cantidades del tejido adiposo, se analizaron en suero los niveles de citoquinas inflamatorias: TNF- α e IL-6 [216]. Estos biomarcadores de inflamación fueron significativamente ($p < 0.05$) más elevados en el grupo RDC en comparación con el grupo SDC (Figura 18). Los datos de los niveles de citoquinas en el grupo NR se encontraban por debajo del nivel de detección.

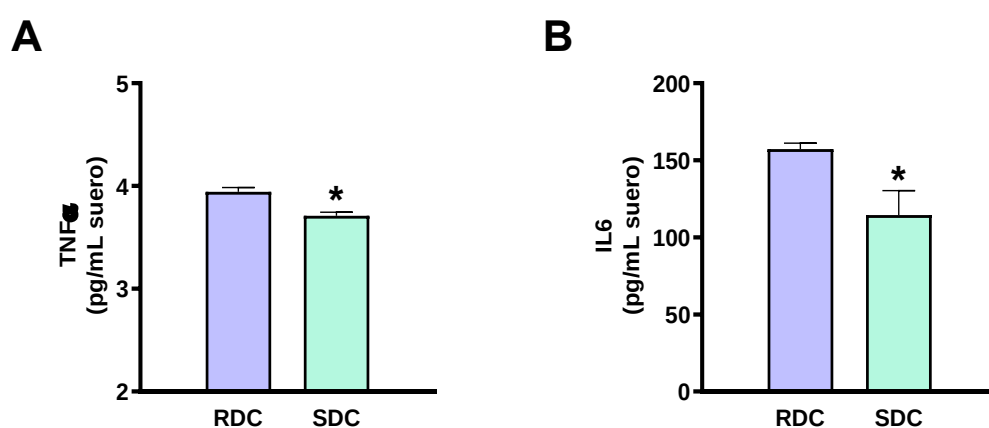


Figura 18. A. Valores séricos de TNF α . Los datos se representan como pg de TNF α por mL de suero. B. Valores séricos de IL6. Los datos se representan como pg de IL6 por mL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.6 Efecto de las dietas experimentales sobre el intestino

Los individuos desnutridos suelen mostrar una marcada atrofia de la mucosa que se puede observar al hacer la relación entre el peso de la mucosa y la longitud del intestino [217]. Al representar este parámetro no se hallaron diferencias entre grupos experimentales. El peso total del intestino tampoco arrojó diferencias, pero el peso de la mucosa intestinal sí fue significativamente diferente y más alto en las ratas del grupo SDC ($p < 0.05$) (Figura 19).

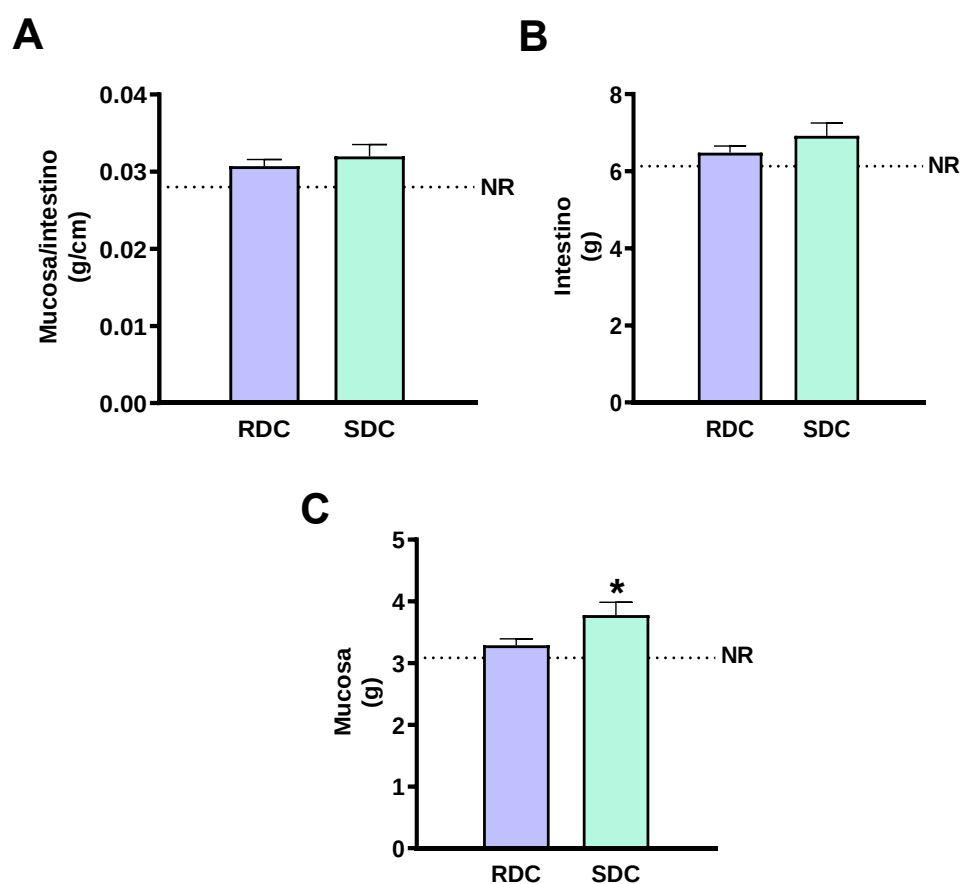


Figura 19. A. Relación entre el peso de la mucosa y la longitud del intestino. Los datos se representan como gramos de mucosa por centímetros de intestino. B. Peso total del intestino (gramos). C. Peso total de la mucosa (gramos). Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

En el análisis tanto del peso total del ciego, como del peso del ciego vacío, así como del peso del contenido cecal, se observaron valores significativamente mayores ($p<0.05$) en el grupo SDC (Figura 20).

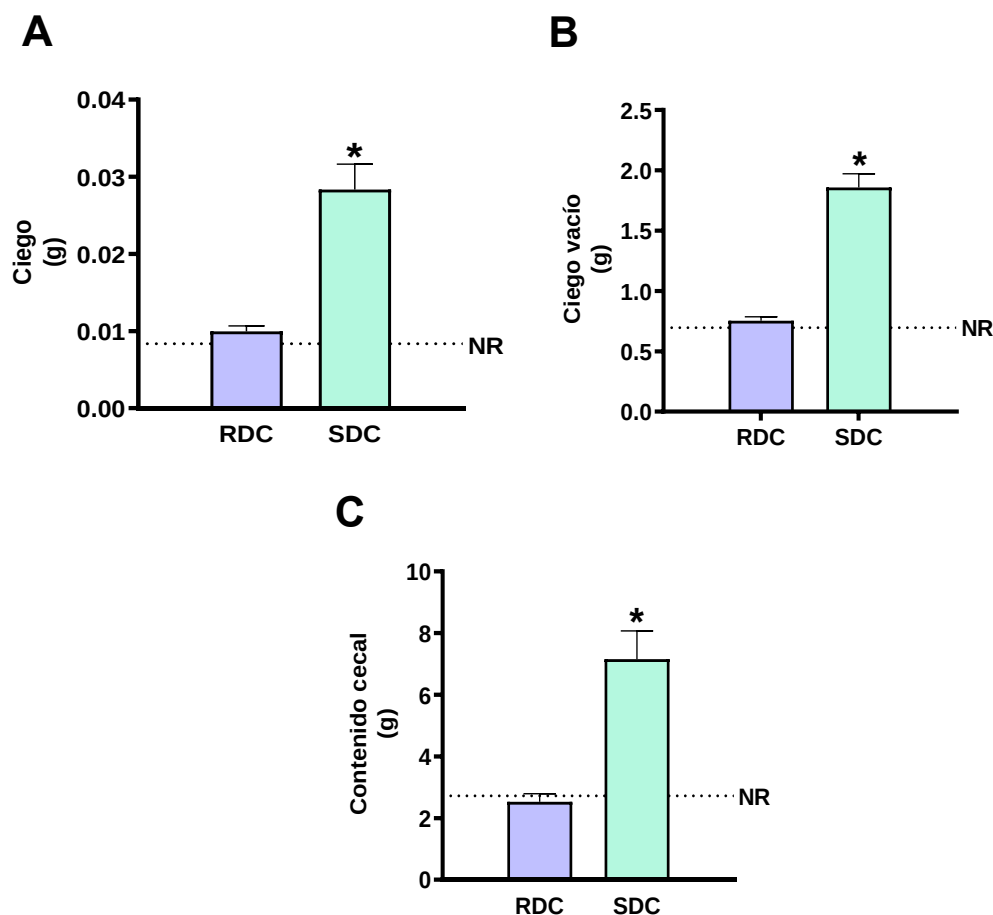


Figura 20. A. Peso total del ciego. B. Peso del ciego vacío. C. Peso del contenido cecal. Todos los datos se representan en gramos. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.7 Efecto de las dietas experimentales sobre la liberación de diferentes hormonas

En el suero extraído tras el sondaje de los animales con sus respectivas dietas (10kcal de dieta/kg de peso corporal), se midieron los niveles de dos hormonas liberadas por el tracto gastrointestinal: la grelina y el GLP-1. Las incretinas son hormonas peptídicas de secreción intestinal que se liberan en respuesta a la ingesta de alimentos y que tienen numerosos efectos en el metabolismo de la glucosa [218]. No encontramos diferencias en los niveles de grelina en sangre en los animales del estudio (Figura 21 A). Los niveles de GLP-1 fueron significativamente superiores ($p<0.05$) en los animales alimentados con la dieta SDC que los que recibieron la dieta RDC (Figura 21 B). Los valores séricos de GLP-1 del grupo NR no fueron medidos.

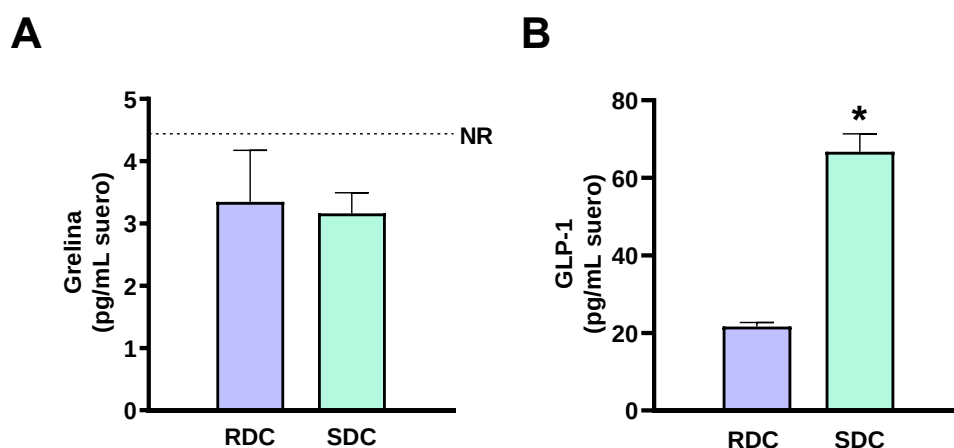


Figura 21. A. Valores séricos de grelina. Los datos se representan como pg de grelina por mL de suero. B. Valores séricos de GLP-1. Los datos se representan como pg de GLP-1 por mL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.8 Efecto de las dietas experimentales sobre el metabolismo energético

El gasto energético basal es la energía que necesita el organismo para realizar los procesos esenciales. La realimentación con las diferentes dietas experimentales no mostró ningún efecto sobre el gasto energético basal (Figura 22 A). Sin embargo, cuando se analizó el cociente respiratorio, el valor de RQ del grupo RDC fue significativamente mayor ($p<0.05$) con respecto al grupo SDC (Figura 22 B). Al representar como porcentaje estos datos basándonos en la tabla modificada de Lusk [209], observamos cómo el grupo RDC está utilizando un 76% de los carbohidratos para la obtención de energía frente al 59% de uso de esta fuente de energía por parte del grupo SDC. En el grupo no sometido a restricción observamos una mayor oxidación de grasas (62%) frente al uso de carbohidratos (38%) para la obtención de energía (Figura 22 C).

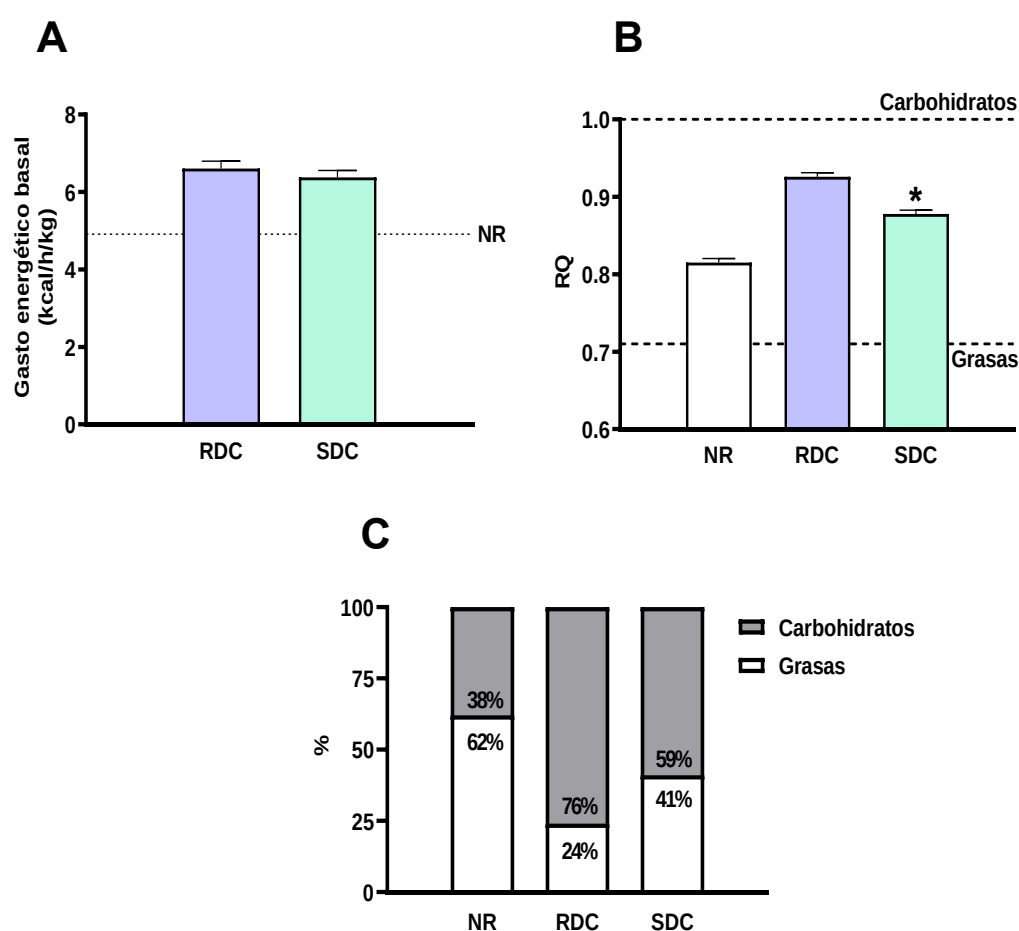


Figura 22. A. Gasto energético basal. Los datos se representan como kcal por hora y kg de peso. B. Cociente respiratorio (RQ). Los datos se representan como valores medios. C. Porcentaje de grasas y carbohidratos utilizados como combustible. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error

estándar de la media (SEM) (n=10) NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.9 Efecto de las dietas experimentales sobre el perfil lipídico sérico

Al final del estudio se obtuvo suero tanto en ayunas como 1 hora posprandial con las respectivas dietas (10kcal de dieta/kg de peso corporal). A pesar de que el colesterol no mostró diferencias entre grupos en ninguno de los tiempos, sí hallamos diferencias en los valores de triglicéridos tanto en ayunas como en posprandial (Figura 23), presentando el grupo SDC niveles de triglicéridos significativamente inferiores ($p<0.05$) respecto al grupo RDC.

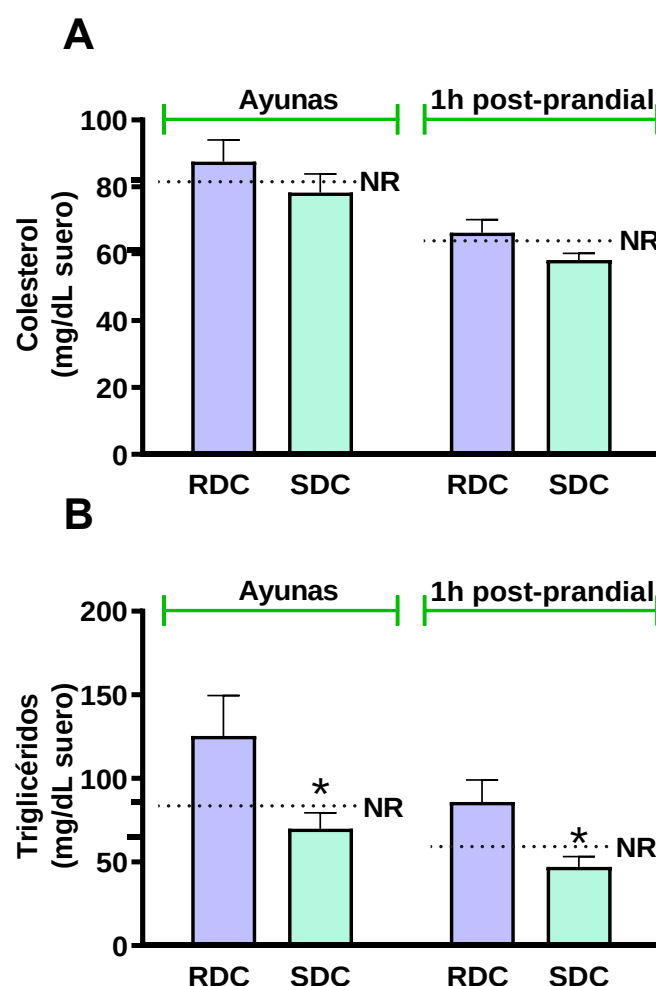


Figura 23. A. Valores séricos de colesterol, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en mg de colesterol por dL de suero. B. Valores séricos de triglicéridos, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en mg de triglicéridos por dL de suero. Los resultados se muestran como

la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.10 Efecto de las dietas experimentales sobre parámetros séricos del metabolismo de la glucosa

Analizamos los parámetros lipídicos del suero en ayunas y tras 1 hora post sondaje con las respectivas dietas (10kcal de dieta/kg de peso corporal). Los niveles de glucosa en suero fueron ligeramente superiores en los animales del grupo RDC con respecto al grupo SDC, aunque no se detectan diferencias entre los dos grupos (Figura 24 A). Tampoco hubo diferencias entre los niveles de insulina en suero (Figura 24 B). Sin embargo, al realizar la relación del incremento de insulina en sangre respecto al incremento de glucosa en sangre tomando el tiempo en ayunas y el de 1 hora posprandial, encontramos que el grupo SDC requirió menores cantidades de insulina para mantener el mismo valor de glucosa que el grupo RDC ($p<0.05$) (Figura 24 C).

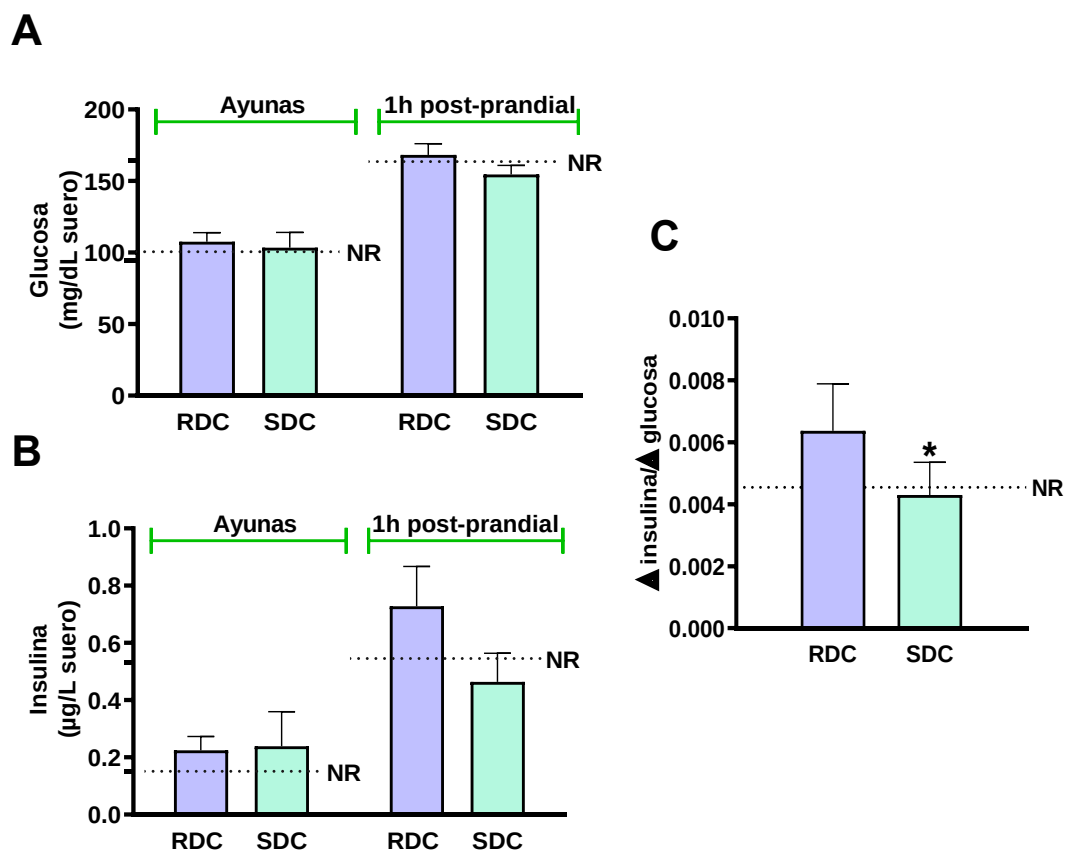


Figura 24. A. Valores séricos de glucosa, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en mg de glucosa por dL de suero. B. Valores séricos insulina, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en µg de insulina por litro de suero. C. Incremental de valores séricos de insulina desde el ayuno hasta 1 hora posprandial frente al mismo dato de glucosa. Los datos se representan como el cociente entre los valores incrementales de insulina y de glucosa tomando el tiempo en ayunas y 1 hora posprandial. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.11 Efectos de la dieta en la expresión génica, señalización y rutas metabólicas en tejido adiposo

Tal y como se describe en la introducción, el *catch-up growth* está caracterizada por un estado de resistencia a la insulina en el que el tejido adiposo responde de forma exacerbada, teniendo como consecuencia un aumento de la lipogénesis de *ново* [68]. Lo primero que se midió fue la capacidad de transportar glucosa midiendo la expresión del transportador basal, GLUT1 y de GLUT4, un transportador que se transloca a la membrana plasmática desde su localización intracelular en respuesta a la insulina. Mientras que los niveles de GLUT1 fueron similares entre grupos, la expresión de GLUT4 aumentó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo SDC respecto al RDC y a los animales que no sufrieron restricción en su alimentación (Figura 25).

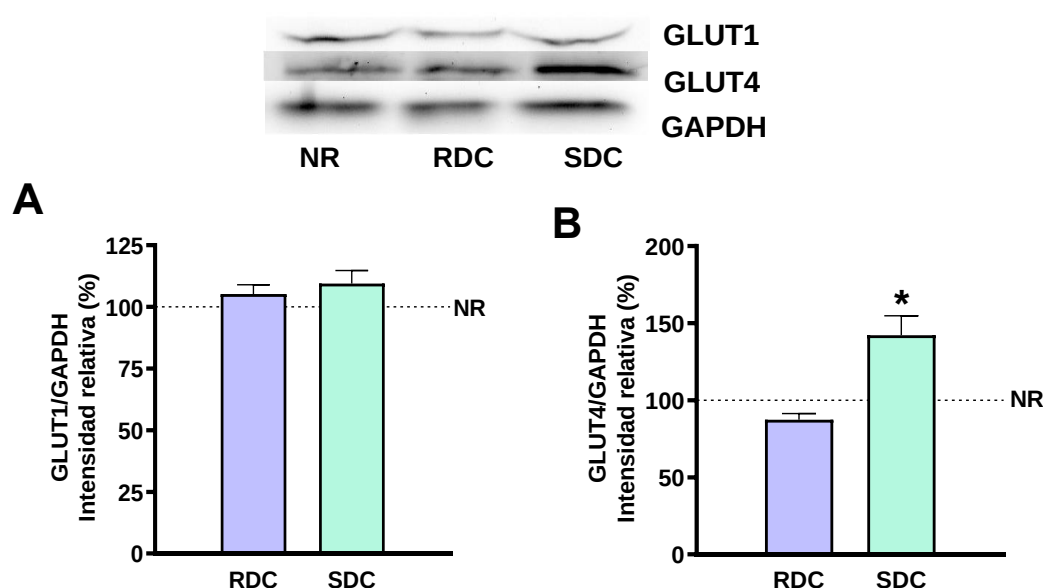


Figura 25. Expresión de transportadores de glucosa, GLUT 1 (A) y GLUT4 (B) en lisados de tejido adiposo determinados mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

A pesar de los elevados valores de GLUT4 en el grupo SDC, estos animales mostraron una menor oxidación basal ($p < 0.05$) de glucosa comparado con el grupo RDC, medido como

la expresión de la isoenzima M de la piruvato quinasa ($PKM\frac{1}{2}$) que cataliza la última etapa de la glucólisis, lo que indicaría un menor flujo glucolítico en los animales alimentados con la dieta SDC (Figura 26 A).

A continuación, se midió la expresión de marcadores relacionados con la bioenergética de la célula, como los implicados en la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones, entre ellos la ATP sintasa y las proteínas desacoplantes (UCP). La expresión de la ATP sintasa fue significativamente mayor ($p<0.05$) en el grupo SDC que en el RDC (Figura 26 B) y los niveles de las proteínas desacoplantes mitocondriales fueron significativamente menores ($p<0.05$) en el grupo SDC comparado con el grupo RDC (Figura 26 C y D).

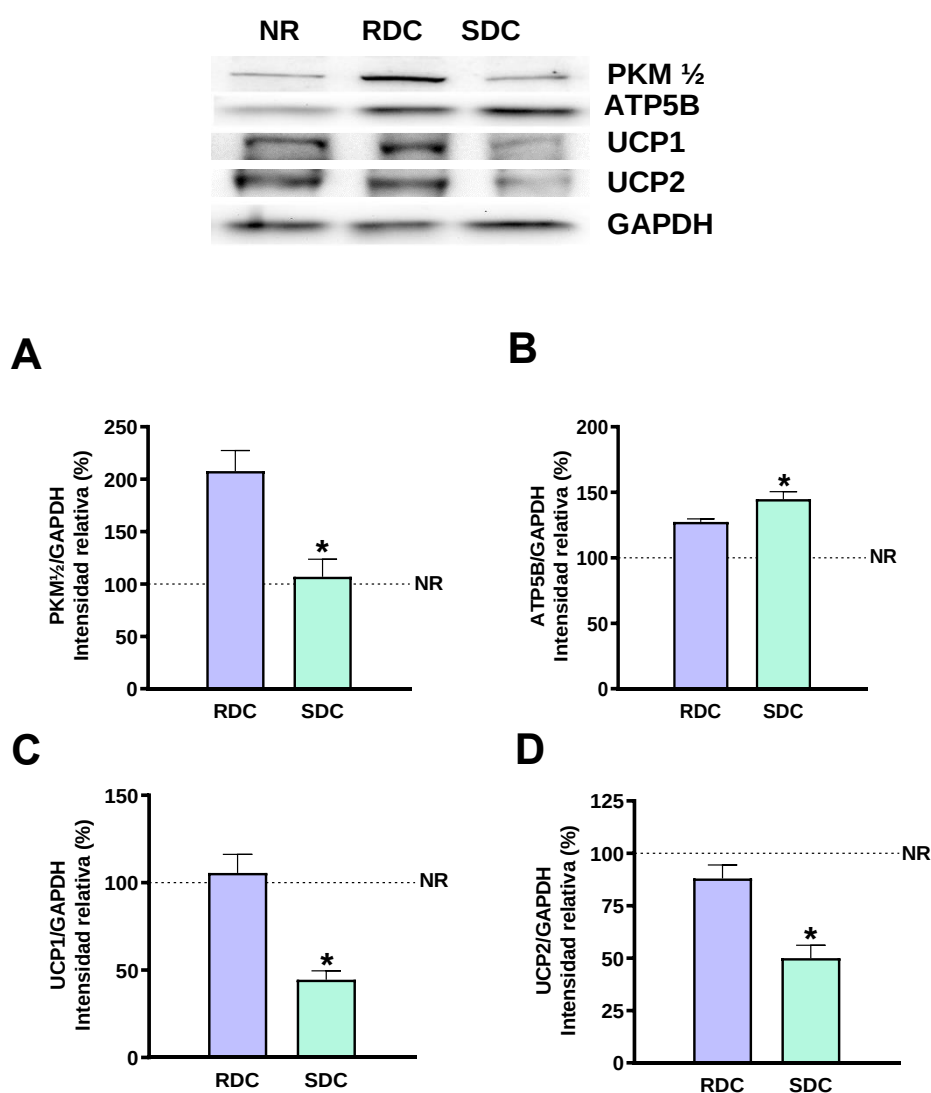


Figura 26. Expresión de proteínas relacionadas con el uso energético de glucosa (y otros combustibles) en tejido adiposo. Expresión de PKM^{1/2} (A), ATP5B (B), UCP1 (C) y UCP2 (D) en lisados de tejido adiposo determinadas mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

También se analizaron enzimas clave relacionadas con la lipogénesis, como son la piruvato carboxilasa (PC) y la ácido graso sintasa (AGS). La expresión de AGS en el grupo SDC fue significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con RDC (Figura 27 A), datos que están en concordancia con la mayor expresión de PKM^{1/2} (Figura 26 A) en el grupo alimentado con carbohidratos de rápida digestibilidad en un tejido lipogénico como es el tejido adiposo. La PC, que es una enzima anaplerótica, muy relacionada con el cambio de oxidación entre glucosa

y triglicéridos tuvo el mismo comportamiento que AGS en los grupos experimentales (Figura 27 B).

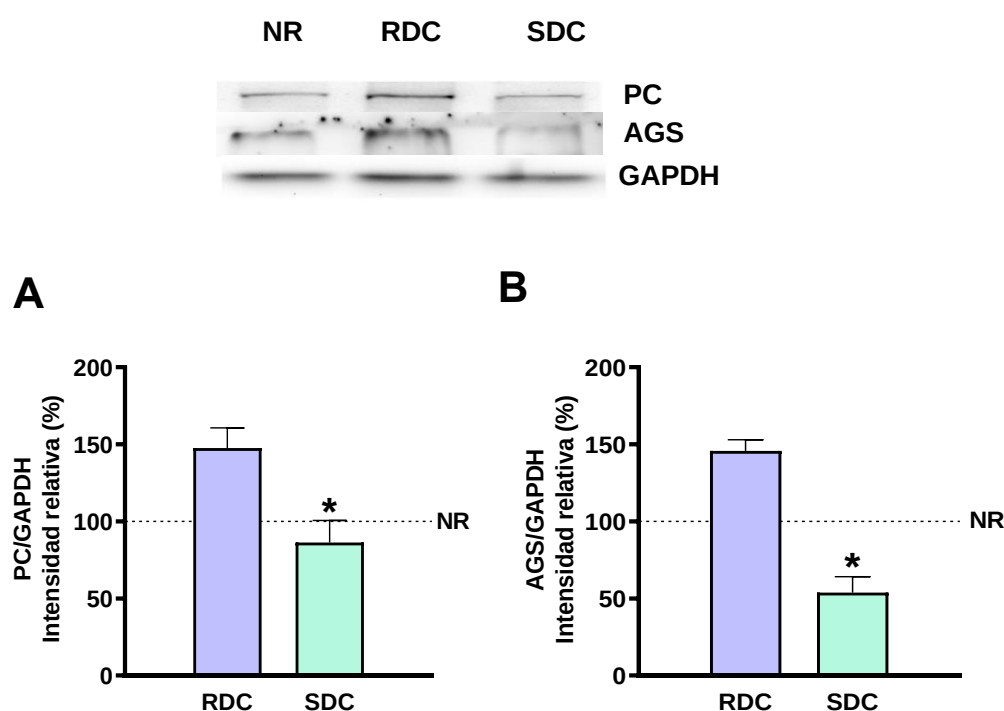


Figura 27. Expresión de piruvato carboxilasa (PC) (A) y ácido graso sintasa (AGS) (B) en lisados de tejido adiposo determinadas mediante Western blot. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

En el tejido adiposo la adipogénesis está regulada por diferentes factores de transcripción, uno de ellos es el factor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR γ). Su función es especialmente relevante en la regulación de ciertos genes muy relacionados con la síntesis de ácidos grasos [219]. Nuestros resultados muestran que el ARNm de PPAR γ está sobreexpresado significativamente en el grupo RDC en comparación con el grupo SDC, que muestra una reducción significativa ($p<0.05$) de la expresión y, por tanto, una menor predisposición lipogénica (Figura 28).

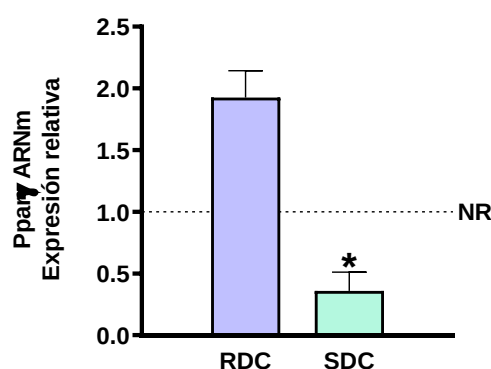


Figura 28. Expresión relativa de PPAR γ en lisados de tejido hepático determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.12 Efectos de la dieta en la expresión génica, señalización y rutas metabólicas en hígado

Tras analizar algunas proteínas clave en el metabolismo del tejido adiposo, estudiamos los efectos a nivel molecular de las diferentes dietas sobre el hígado. En primer lugar, se determinó la entrada de glucosa mediante un transportador específico del hígado, GLUT2, pero no encontramos diferencias entre grupos experimentales (Figura 29 A). Sin embargo, los animales del grupo SDC mostraron una cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) de glucógeno almacenado (Figura 29 B).

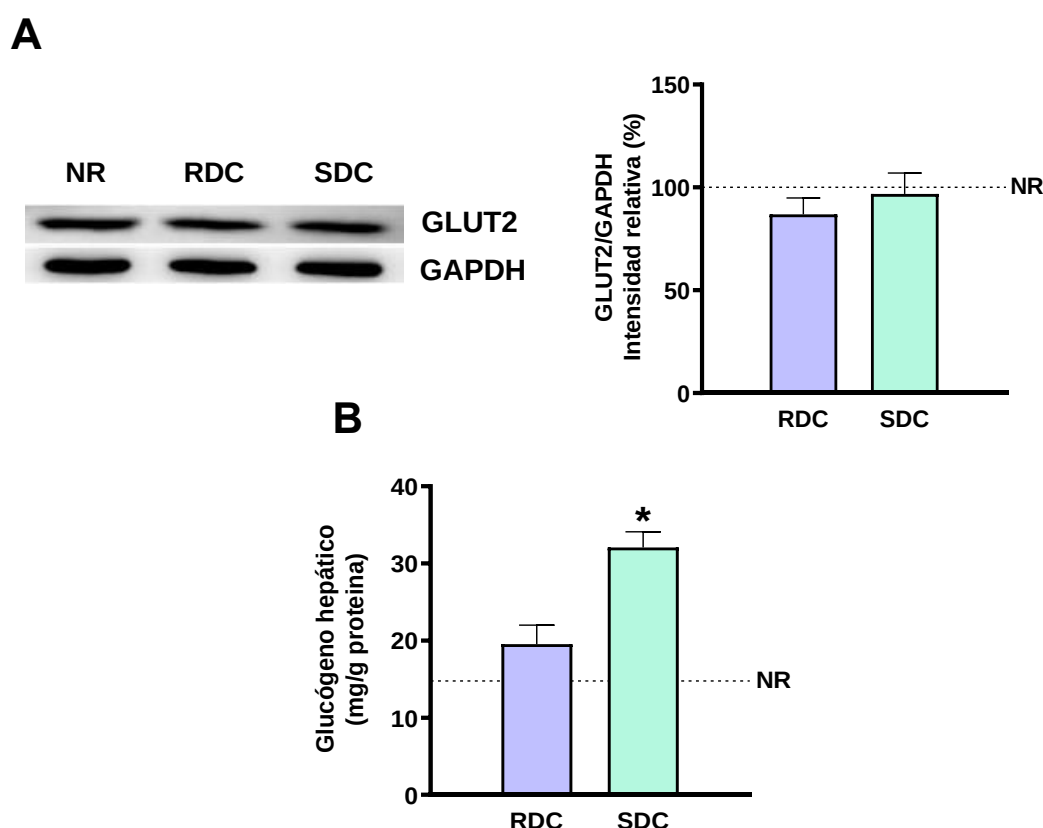


Figura 29. A. Expresión de GLUT2 en lisados de tejido hepático determinado mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. B. Concentración de glucógeno en tejido hepático. Los datos se representan como mg de glucógeno por gramo de proteína. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

Por otro lado, se observa una disminución significativa ($p<0.05$) de la expresión de la PKM en el grupo alimentado con la dieta SDC (Figura 30 A) mientras que no se observan diferencias en la expresión de la ATP sintasa (Figura 30 B). Sin embargo, la expresión de la proteína PDK4 es significativamente superior en el grupo SDC frente al RDC (Figura 30 C y D). Estos resultados indicarían un cambio de la utilización de los carbohidratos en el hígado de estos animales, que se estarían dirigiendo hacia la síntesis de glucógeno en lugar de ser utilizados vía glucólisis y posteriormente para síntesis de lípidos.

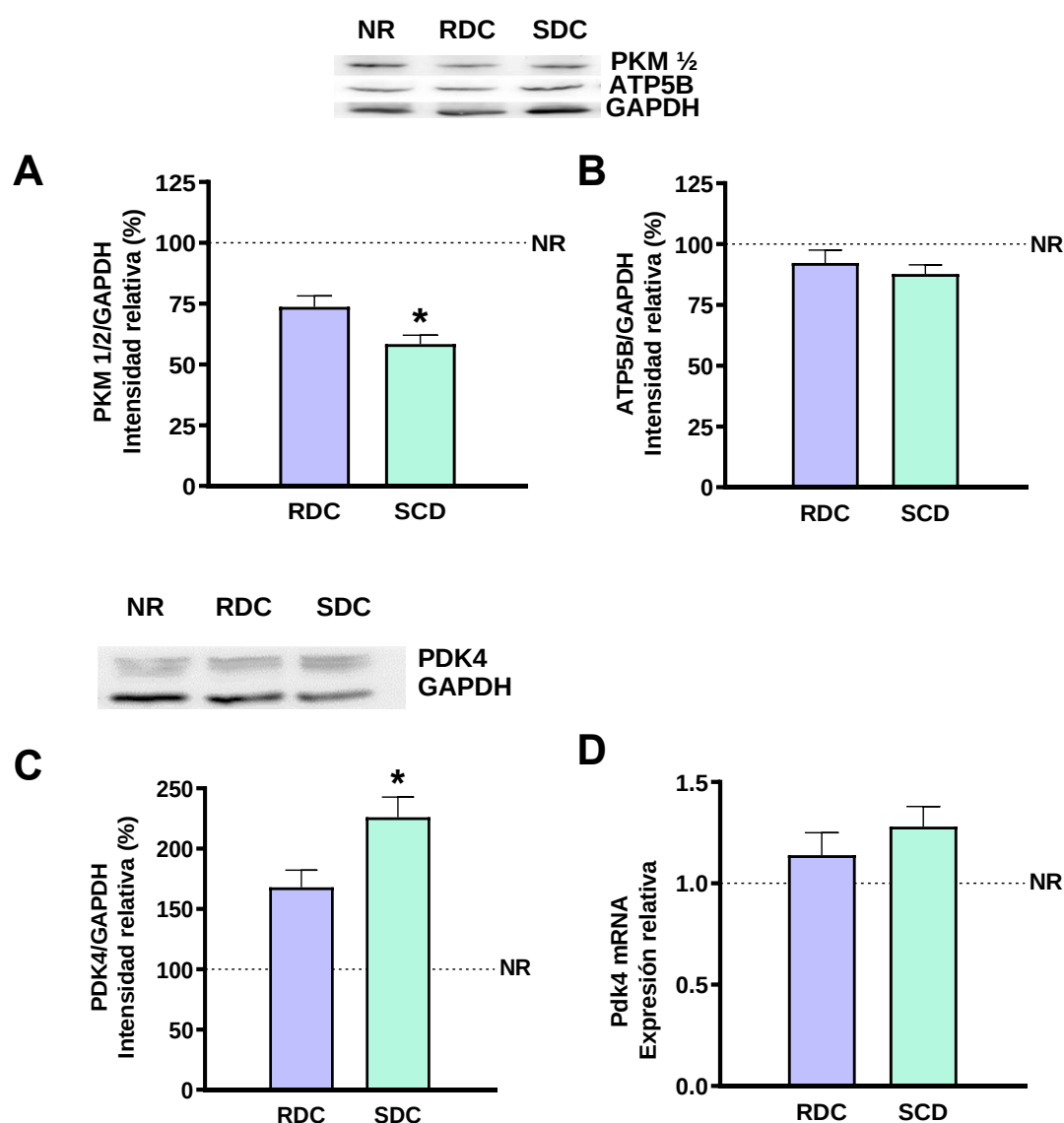


Figura 30. A y B. Expresión de PKM $\frac{1}{2}$ (A) y ATP5B (B) en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. C. Expresión de PDK4 en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. D. Expresión relativa de PDK4 en lisados de tejido hepático determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

Para confirmar la reducción del uso de glucosa en el hígado para sintetizar triglicéridos, se midieron la PC y AGS como las principales enzimas lipogénicas. Nuestros resultados indicaron que, aunque no hay diferencias significativas en la expresión de PC entre grupos (Figura 31 A), la expresión de AGS es significativamente menor ($p<0.05$) en el grupo SDC en comparación con el grupo RDC (Figura 31 B).

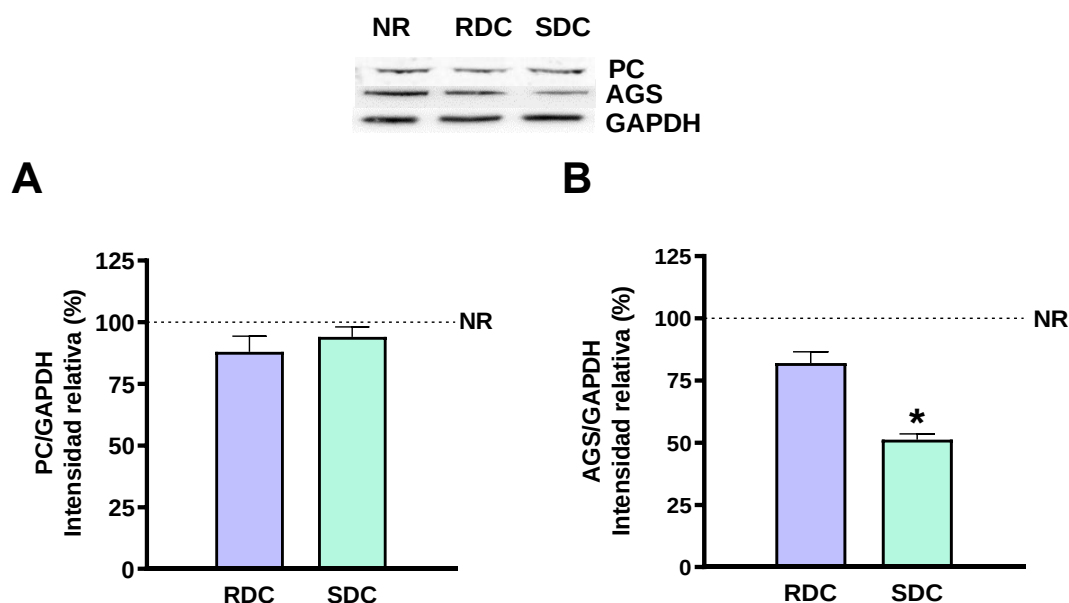


Figura 31. Expresión de PC (A) y AGS (B) en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

También se midió en hígado la capacidad de las dietas para actuar sobre proteínas responsables de la señalización dependiente de insulina y dirigida hacia la síntesis de lípidos. El estado fosforilativo de la Akt/PKB kinasa fue significativamente mayor ($p<0.05$) en los animales del grupo SDC comparado con los que recibieron la dieta RDC (Figura 32 A). Además, los niveles de ChREBP, que se relacionan con la regulación de la lipogénesis [220] presentaron una reducción significativa ($p<0.05$) en los niveles de esta proteína en el grupo SDC (Figura 32 B). La expresión de la proteína SREBP1, relacionada con el metabolismo lipídico junto con ChREBP [221], mostró diferencias significativas ($p<0.05$) en el grupo SDC frente a RDC en

concordancia con los resultados descritos previamente (Figura 32 C), mientras que no se observan diferencias entre grupos en SREBP2 (Figura 32 D).

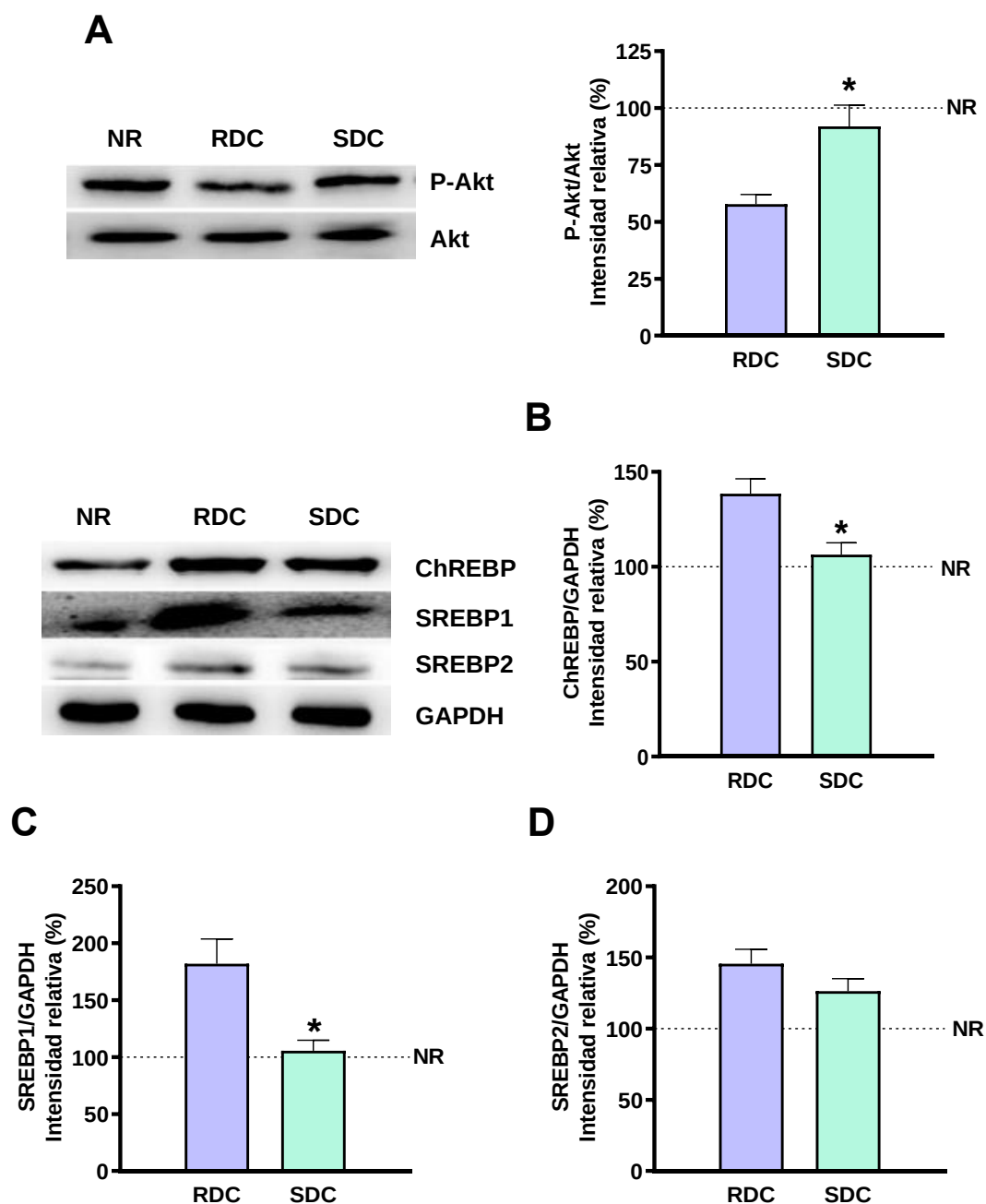


Figura 32. A. Activación de Akt en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína Akt. Expresión de ChREBP (B), SRBP1 (C) y SREBP2 (D) en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

5.2.13 Efectos de la dieta en la expresión génica, señalización y rutas metabólicas en músculo esquelético

Al igual que en el tejido adiposo, se midió la expresión de los transportadores de glucosa en músculo como el principal tejido encargado de la retirada de glucosa circulante tras el período posprandial. Los niveles de GLUT4 son significativamente superiores ($p < 0.05$) en el grupo SDC en comparación con el RDC (Figura 33 A). Por su parte, la expresión de GLUT1 es similar entre los grupos experimentales (Figura 33 B).

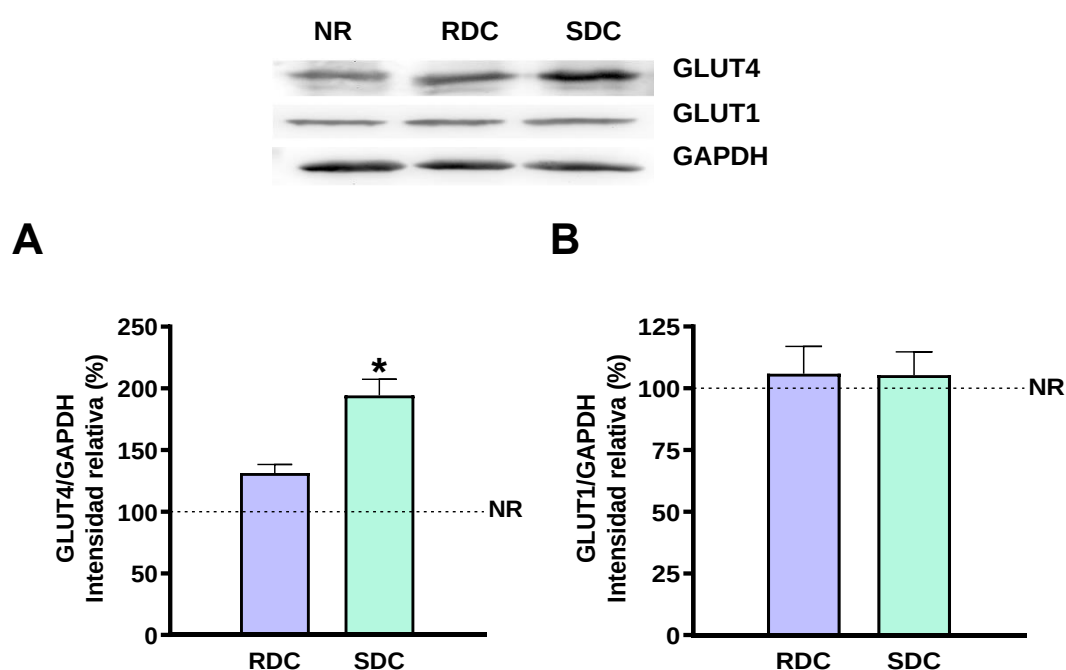


Figura 33. Expresión de GLUT4 (A) y GLUT1 (B) en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

Para determinar si la mayor expresión de GLUT4 se debía a una mayor señalización dependiente de insulina en los animales que habían recibido la dieta con carbohidratos de digestión lenta, se midió el estado fosforilativo de la quinasa Akt/PKB encontrándose una

fosforilación significativamente mayor ($p<0.05$) en este grupo con respecto al RDC (Figura 34 A).

Los animales alimentados con carbohidratos de baja digestibilidad presentan un contenido significativamente mayor de glucógeno respecto al grupo RDC (Figura 34 B).

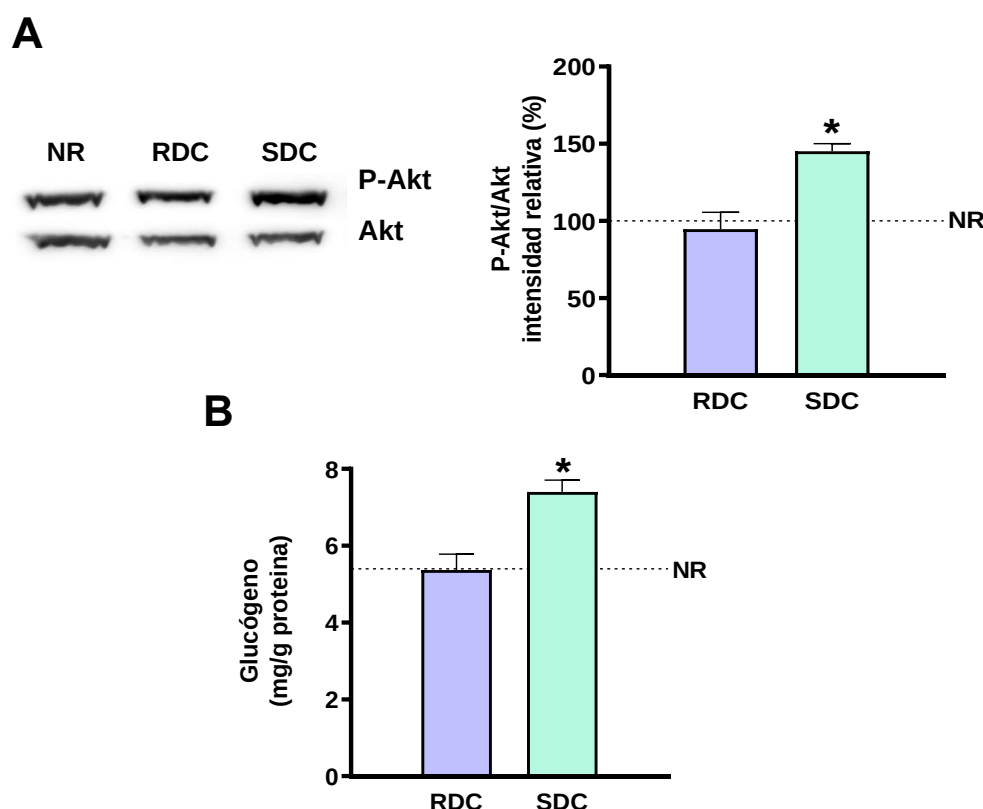


Figura 34. A. Activación de Akt en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína Akt. B. Concentración de glucógeno en músculo esquelético. Los datos se representan como mg de glucógeno por gramo de proteína. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

También en músculo se midieron los niveles de la isoenzima M de la piruvato kinasa (PKM $\frac{1}{2}$) como medida del flujo glucolítico, mientras que la ATP sintasa y las proteínas desacoplantes (UCP2) se determinaron como prueba de actividad mitocondrial, pero ninguno de estos parámetros presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 35).

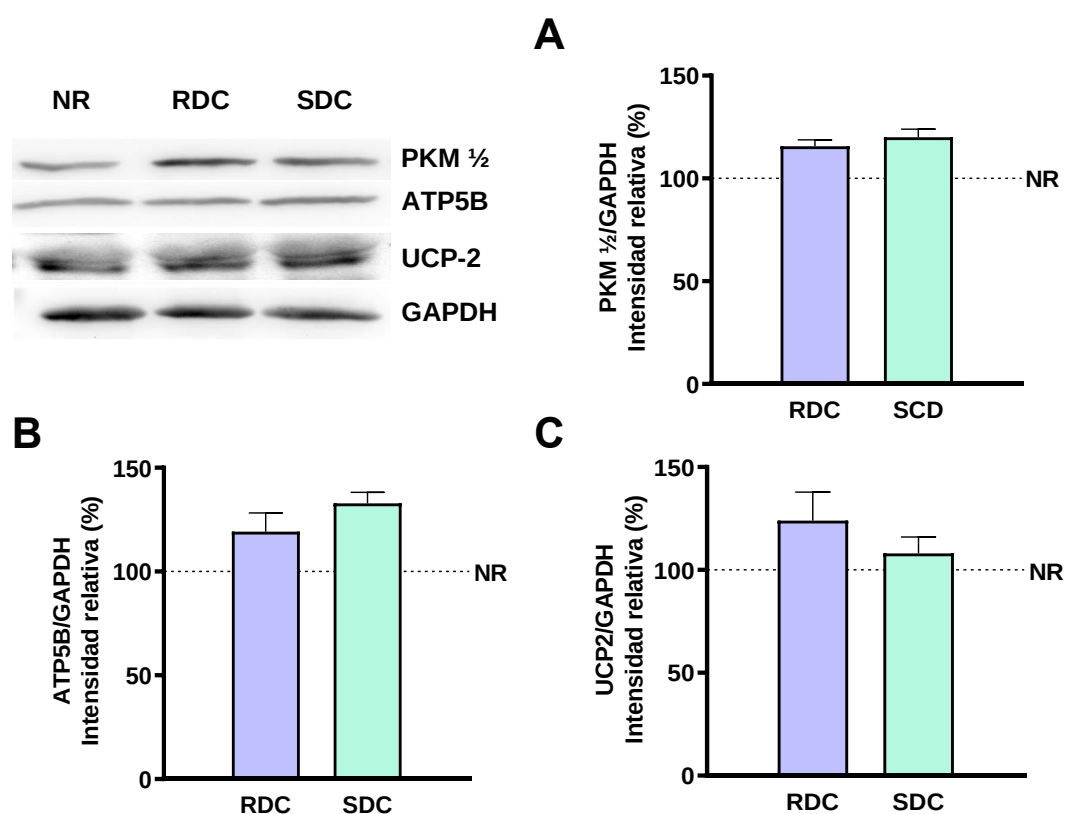


Figura 35. Expresión de PKM $\frac{1}{2}$ (A), ATP5B (B) y UCP2 (C) en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC.

También se analizaron diferentes marcadores de funcionalidad muscular. Se midió la expresión de MEF2D, un marcador de diferenciación muscular [222] y encontramos valores significativamente más elevados ($p<0.05$) en el grupo SDC que RDC (Figura 36, A). Por otro lado, la creatina quinasa (CK) es una enzima que refleja la cantidad de energía rápidamente disponible en el músculo [223]. La actividad CK es significativamente ($p<0.05$) más elevada en el grupo SDC que en el RDC (Figura 36 B).

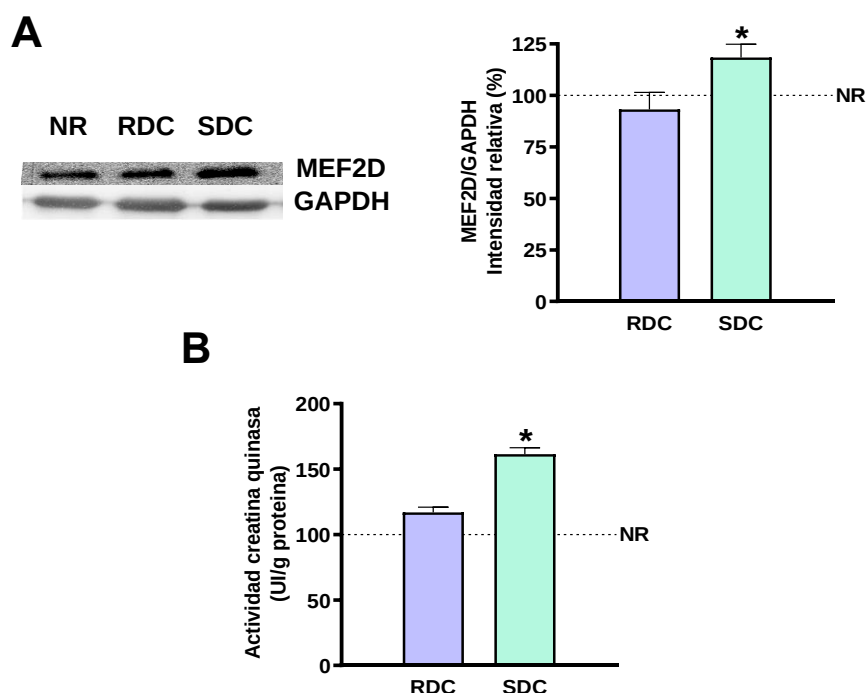


Figura 36. A. Expresión de MEF2D en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. B. Actividad creatina quinasa. Los datos se representan como UI por gramo de proteína. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

Asimismo, se midieron los niveles de ARNm del receptor activado por proliferadores peroxisomales δ (PPAR δ). Nuestros resultados muestran un incremento significativo ($p < 0.05$) de la expresión de este receptor nuclear en el grupo SDC respecto al RDC (Figura 37).

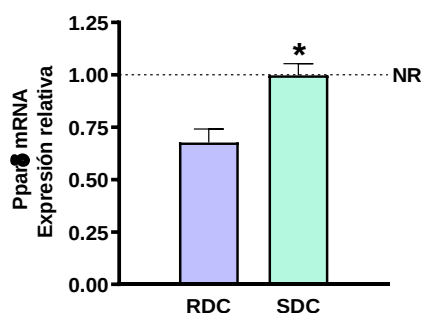


Figura 37. A. Expresión relativa de PPAR δ en lisados de músculo esquelético determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

La mejor capacidad muscular del grupo SDC junto a una mejor sensibilidad a la insulina, además de las diferencias halladas en los análisis calorimétricos, nos llevó a determinar las bases moleculares de la oxidación de ácidos grasos en estos animales. Para ello, se midió la expresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (PDK4) como proteína responsable del control del uso de combustible además de la expresión de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (Cpt1b). Aunque en el caso del ARNm de PDK4 no hubo diferencias entre los grupos, los niveles de proteína presentaban un aumento significativo ($p < 0.05$) en el grupo SDC en comparación con el grupo RDC (Figura 38 A y B). Por su parte, para Cpt1b, sus niveles de ARNm fueron mayores significativamente ($p < 0.05$) en el grupo SDC que en el RDC (Figura 38 C). Estos

resultados son un reflejo de una preferencia del grupo SDC en el uso de ácidos grasos como combustible metabólico.

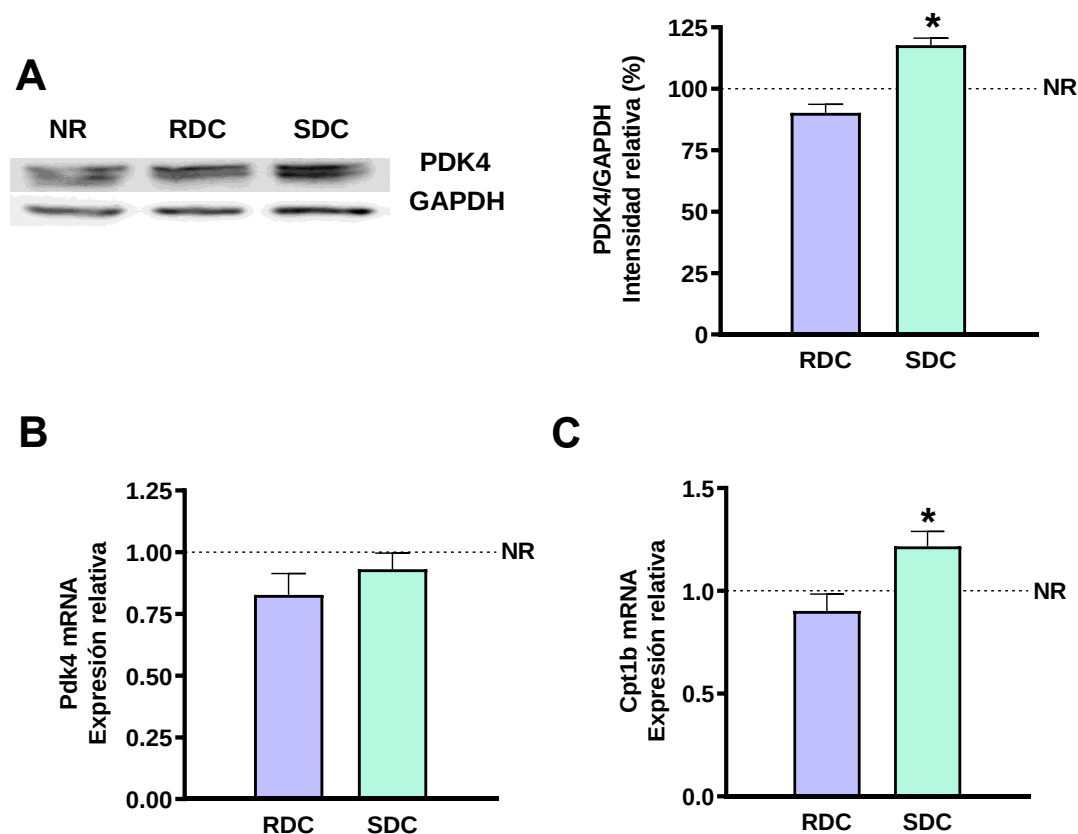


Figura 38. A. Expresión de PDK4 en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. B y C. Expresión relativa de PDK4 (B) y Cpt1b (C) en lisados de músculo esquelético determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

En el músculo, la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) se ha asociado con alteraciones en las enzimas glucolíticas/oxidativas y encontramos una disminución significativa ($p<0.05$) en el grupo SDC respecto al grupo RDC (Figura 39 A). Además, se determinaron los niveles de las proteínas de unión al elemento regulador del colesterol (SREBP1/2) como proteínas implicadas en el metabolismo de los lípidos, observándose resultados similares a los ya descritos (Figura 39 B y C).

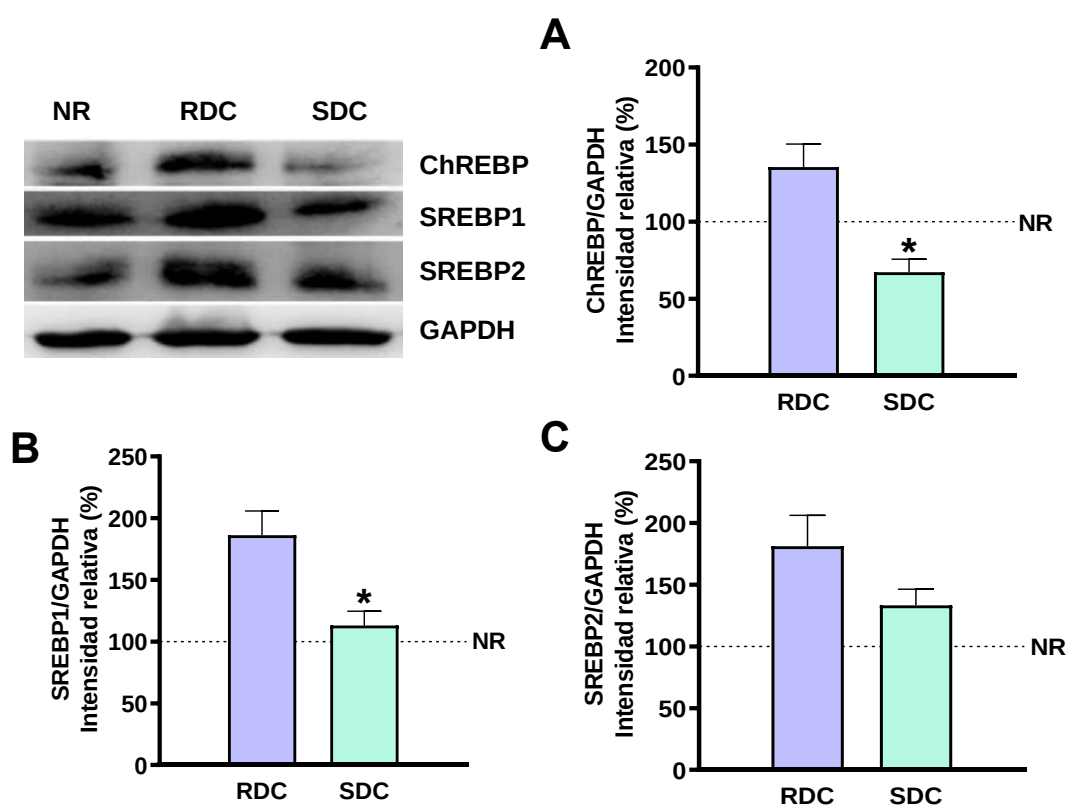


Figura 39. Expresión de ChREBP (A), SREBP1 (B) y SREBP2 (C) en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC.

6 DISCUSIÓN

El crecimiento es el proceso fisiológico fundamental característico de la infancia y es uno de los mejores indicadores del estado de salud del niño [50]. A pesar de tener un marcado condicionamiento genético, se ve influenciado por el estado de salud del individuo, las condiciones psicosociales y de manera muy destacada, por el estado nutricional de la persona [9, 42]. La compleja interacción entre los factores descritos anteriormente tiene como objetivo preparar al organismo para la supervivencia y la reproducción [5]. Sin embargo, este proceso de crecimiento puede verse negativamente influenciado por factores externos, como la desnutrición. En este caso, sería necesaria una rápida intervención para poder restablecer un adecuado crecimiento. Consecuentemente, el organismo entra en un proceso de aceleración del metabolismo conocido como *catch-up growth*. Desafortunadamente este proceso, en principio necesario en la mayoría de los casos, puede implicar efectos negativos a medio y largo plazo, favoreciendo la acumulación de grasa y arrastrando consigo la aparición de numerosas comorbilidades [92, 94]. La utilización de dietas no adecuadas en el tratamiento de una reducción en el crecimiento programa al individuo a un fenotipo ahorrador que puede derivar en enfermedades, como la obesidad y la diabetes. De ahí la gran importancia que supone una adecuada intervención nutricional de este periodo de crecimiento.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar el efecto de los carbohidratos de baja y de alta digestibilidad sobre el *catch-up growth* tras un período de restricción calórica. Considerándose este período vital crítico en cuanto al desarrollo de diferentes alteraciones coordinadas en la homeostasis glucídica [86, 88, 224] y, basándonos en los efectos positivos descritos para los carbohidratos de baja digestibilidad sobre estos cambios metabólicos observados en patologías similares [142, 181], el presente trabajo se focaliza en el análisis del efecto de una mezcla de carbohidratos de digestión lenta en

la dieta para prevenir un proceso de *catch-up fat* en un modelo animal de retraso en el crecimiento por desnutrición.

6.1 Efecto de la desnutrición sobre el crecimiento del animal

La reducción en el aporte nutricional de un 30% durante cuatro semanas provocó un retraso en el crecimiento en los animales restringidos en comparación a los animales que tuvieron una alimentación adecuada. Los animales desnutridos presentaron un 75% menos de ganancia de peso con respecto a los animales control, así como una diferencia aproximada de un 20% en longitud. Esta diferencia en peso fue debida tanto a una significativa reducción de la masa grasa como de la masa magra. El efecto de la desnutrición también fue observado cuando se calculó el índice de masa corporal siendo un 67% superior en los animales que no estuvieron restringidos. Además de este impacto de la desnutrición sobre el peso y la composición corporal, también se observó un efecto perjudicial sobre la funcionalidad muscular. De esta forma, tras el análisis de la fuerza de agarre, los animales desnutridos mostraron un 24% menos de fuerza con respecto al grupo control. Las alteraciones en estos parámetros han sido descritas en numerosos modelos de restricción del crecimiento. Tanto en aquellos en que emplean una restricción uterina como postnatal. En ellos se describe la menor ganancia de peso y de longitud, así como de menor ganancia de masa grasa y masa magra en aquellos animales sometidos a la restricción nutricional [199, 225, 226]. Por tanto, podemos concluir que el modelo animal de retraso en el crecimiento era adecuado para los estudios nutricionales posteriores que se llevaron a cabo.

6.2 Efecto de la realimentación sobre el crecimiento del animal

6.2.1 Efecto de la realimentación sobre el peso corporal, la longitud y la ingesta

En nuestro modelo, los animales que fueron sometidos a una restricción de dieta durante 4 semanas y posteriormente fueron alimentados sin ningún tipo de restricción por el mismo periodo de tiempo, presentaron una ganancia de peso mayor que los animales de la misma edad que no habían sufrido ningún periodo de desnutrición. Este comportamiento estaría acorde con el denominado crecimiento de recuperación o *catch-up growth*. Como se ha explicado en la introducción, este proceso aparece cuando se restablecen las condiciones óptimas de crecimiento tras un periodo de restricción, como un intento del organismo de alcanzar el tamaño programado genéticamente para su edad [54, 86].

Los animales restringidos fueron alimentados en el periodo de realimentación con dietas que se diferenciaban en su composición de carbohidratos: una dieta estaba basada en carbohidratos de digestión rápida y la otra en carbohidratos de digestión lenta. Una de las principales diferencias entre ambas formulaciones es que la dieta que contenía carbohidratos de digestión lenta presentaba una cantidad de fibra soluble mayor a la dieta formulada con carbohidratos de digestión rápida. Una de las implicaciones que tiene esta diferencia es el efecto sobre el control del peso corporal. En este sentido, se ha descrito que el consumo de fructanos tipo inulina puede reducir el peso corporal al promover la saciedad y disminuir la ingesta espontánea de combustibles [227, 228]. De igual forma, se ha observado, tanto en niños como en adultos obesos, que la ingesta de este tipo de fibra como suplemento producía una pérdida de peso [229, 230]. Sin embargo, en nuestro estudio, aunque la dieta SDC contenía una mayor cantidad de fibra, no se observaron diferencias entre ambos grupos cuando se analizó el peso final o la ganancia del mismo en el periodo de realimentación. Tampoco se observaron diferencias

en la longitud de los animales entre los dos grupos. En cambio, sí se apreció una diferencia en la ingesta de cada una de las dietas durante esta segunda parte del estudio, siendo mayor para el grupo alimentado con carbohidratos de absorción rápida. Existen datos en la literatura científica en la que se asocia una alimentación basada en carbohidratos de rápida digestibilidad con una mayor ingesta [170]. No obstante, a pesar de esta diferencia, el cálculo de la eficiencia alimenticia entre grupos reflejó valores semejantes, aunque en ambos grupos los valores fueron superiores a los del grupo no restringido.

6.2.2 Efecto de la realimentación sobre la composición corporal

Como hemos comentado anteriormente, uno de los principales problemas que se pueden encontrar en un proceso de *catch-up growth* es la acumulación de masa grasa que se asocia con una predisposición al desarrollo de obesidad o diabetes a lo largo de su vida [106, 231]. Nuestros resultados muestran que los animales que fueron restringidos, al final del periodo de realimentación no alcanzaron los valores de masa grasa o magra de los animales que no sufrieron la restricción, en consonancia con los valores de peso corporal. Sin embargo, cuando comparamos ambos grupos alimentados con dietas experimentales observamos que los animales alimentados con la dieta RDC presentaban una cantidad de grasa significativamente mayor que el grupo SDC y que estas diferencias se mantenían incluso cuando se realizaba una normalización por peso. Al final del estudio, el grupo RDC presentó un 33% más masa grasa que el grupo SDC. A diferencia del tejido graso, en el análisis de la masa magra no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. En la evaluación de la masa muscular, no obtuvimos tampoco diferencias entre los pesos de los diferentes músculos de la pata analizados (*tibialis*, *gastrocnemius* y *soleus*).

Este acúmulo superior de masa grasa en el grupo RDC estaría en consonancia con la definición de *catch-up fat*, es decir, una recuperación acelerada del tejido adiposo en el proceso de *catch-up growth*, y superior a la recuperación de la masa magra [103]. Por

el contrario, la alimentación con la dieta SDC podría tener un papel preventivo hacia un fenotipo obeso promoviendo un acúmulo de grasa a un nivel saludable. Este resultado apoyaría lo indicado en la introducción sobre la importancia de la calidad del carbohidrato a la hora de evitar una adipogénesis en el individuo. En este sentido, en preadipocitos se ha demostrado que la adipogénesis estaba influenciada por la calidad del carbohidrato usado, indicando cómo de crucial puede llegar a ser el factor de la nutrición. El mecanismo de respuesta del organismo a la variación en calidad y cantidad de los nutrientes durante las fases clave del desarrollo del organismo, conocida como la programación nutricional, puede además provocar secuelas permanentes [232]. Estudios en niños con bajo peso al nacer indicaron que el exceso del acumulo de grasa de una forma temprana a lo largo de un *catch-up growth* podría contribuir a la aparición de complicaciones a largo plazo como obesidad, problemas cardiovasculares, resistencia a la insulina y diabetes [233]. En adultos con sobrepeso u obesos, se ha encontrado que el cambio de dieta basada en una mejora de la calidad de los carbohidratos está asociada a cambios favorables en los depósitos grasos [234]. Esta asociación fue impulsada principalmente por la presencia de fibra en la dieta, uno de los ingredientes fundamentales en la dieta SDC.

6.2.2.1 Efecto de la realimentación sobre la función endocrina del tejido adiposo

El aumento de masa grasa que se observó en los animales del grupo RDC de nuestro estudio afectó tanto a los depósitos de grasa subcutánea como a los de grasa visceral, incluyendo renal y epididimal. Esto estaría acorde con lo descrito por Demerath et al. [235], que describieron que adultos que habían tenido un rápido crecimiento en su infancia presentaban una mayor cantidad de tejido adiposo que aquellos que habían tenido un crecimiento normal, y que se correspondía tanto con el incremento de grasa subcutánea como visceral. Sin embargo, la localización de los depósitos grasos implica un efecto metabólico diferente. En este sentido, la grasa subcutánea está relacionada principalmente con una función de almacenamiento de energía y estructural, no

ejerciendo un efecto notable sobre el metabolismo del organismo, pero sí está asociada a una obesidad generalizada y con los niveles circulantes de leptina [11, 236, 237].

La leptina es una de las hormonas que secreta el tejido adiposo en su papel como órgano endocrino. La relación proporcional entre los valores de leptina séricos y el tejido adiposo está bien descrito en la literatura científica, ya que es una hormona con una función principalmente adipostática [11]. En nuestro estudio se observó que los niveles de leptina fueron más elevados en el grupo RDC que en el grupo SDC, en correlación a la cantidad de grasa que se presentaba en cada uno de los grupos. La leptina es una hormona que se ha relacionado con la saciedad, por la unión en receptores específicos de las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo, la región del cerebro que regula el comportamiento alimenticio. Actúa a través de la vía de señalización JAK-STAT y entre sus efectos, además de la inhibición del apetito, se incluye la estimulación de la termogénesis, el incremento de la oxidación de ácidos grasos y la disminución de la oxidación de glucosa [238, 239].

A pesar del efecto de la leptina en el control del peso, los resultados obtenidos en el grupo RDC no estarían acorde con esta función. En este caso estaríamos en una situación de resistencia a la acción de la leptina, lo cual impide a esta hormona ejercer sus funciones [92]. Este efecto, se ha descrito en personas con sobrepeso u obesas [239] lo que de nuevo sería un resultado que indicaría la predisposición al desarrollo de obesidad debido a la realimentación con una dieta rica en carbohidratos de digestión rápida. En estudios de niños prematuros que han experimentado un *catch-up growth*, se ha observado valores elevados de leptina en comparación a niños de la misma edad sanos o que han sufrido un crecimiento más lento [240, 241]. Se ha hipotetizado que en el periodo de *catch-up growth* podría existir una resistencia “fisiológica” a la leptina que favorecería el crecimiento del individuo reduciendo el dominio de la leptina sobre el control del peso y la adipogénesis [241]. Una hipótesis alternativa sería que en el proceso de *catch-up growth* se produciría una disfunción hacia el efecto de la leptina, lo cual

podría derivar en un *catch-up fat* [240]. Independientemente de la hipótesis, nuestros resultados indicarían que el estatus nutricional ejerce un efecto sobre este proceso y que, una dieta que contiene carbohidratos de digestión lenta prevendría la generación de una resistencia a la leptina sin afectar el crecimiento del individuo.

6.2.2.2 Efecto de la realimentación sobre el estado de inflamación crónica de bajo grado

Como hemos comentado anteriormente, la ingesta de la dieta RDC también incrementó la cantidad de tejido adiposo visceral. Este tipo de tejido graso cubre los diferentes órganos y se ha relacionado con el aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y diabetes [242, 243]. El tejido adiposo visceral también participa en la inflamación y producción de citoquinas proinflamatorias, siendo uno de los principales generadores del estado de inflamación crónica de bajo grado observada en personas con sobrepeso u obesas. En esta condición existe una respuesta inflamatoria prolongada en el tiempo con un incremento moderado pero persistente de indicadores de inflamación sistémica. Así, el mayor acumulo de adipocitos hipertróficos produce una migración de monocitos al tejido adiposo y un posterior aumento en la infiltración de macrófagos M2. Estos macrófagos se ven activados por diferentes señales provenientes del incremento de la adiposidad y producen citoquinas proinflamatorias, preferentemente interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis nuclear α (TNF- α) [216, 244]. Ambas citoquinas actúan de manera autocrina y paracrina y afectan al metabolismo de los lípidos y los carbohidratos [237, 245]. La IL-6 está relacionada con una elevada presencia de ácidos grasos libres en plasma y aparece en concentraciones altas en pacientes diabéticos tipo 2 [245, 246]. Por su parte, el TNF- α fue la primera citoquina que reveló un vínculo entre obesidad, inflamación y diabetes [247, 248].

En nuestro estudio, cuando se evaluaron los niveles en sangre de ambas citoquinas en los diferentes grupos experimentales, se observó que el grupo alimentado con una

dieta basada en carbohidratos de baja digestibilidad, presentaba concentraciones significativamente menores en sangre de IL-6 y TNF- α con respecto al grupo alimentado con carbohidratos de digestión rápida. Este resultado estaría acorde con estudios clínicos que relacionan carbohidratos con un índice glicémico elevado, similares a los presentes en la dieta RDC, con el incremento de marcadores de inflamación [156, 183, 186]. Además, estudios realizados en personas obesas o con sobrepeso, mostraron un descenso de estos marcadores cuando la dieta incluía carbohidratos de índice glicémico bajo [185]. En particular, se ha observado una relación inversa entre la ingesta de fibra prebiótica y la grasa corporal y se han descrito diferentes mecanismos de acción, incluyendo un cambio en la microbiota, una mayor saciedad y una menor ingesta de alimentos; un tránsito gastrointestinal acelerado junto con una mayor absorción de energía; así como un cambio en el contenido de ácidos grasos de cadena corta, que influyen en el gasto energético, el apetito y el peso a través de vías neuronales y humorales [202, 249, 250]. En nuestro estudio pudimos observar que los animales alimentados con la dieta SDC presentaban una cantidad de contenido cecal significativamente superior a la encontrada en los animales del grupo RDC, lo cual podría estar relacionado con los mecanismos descritos anteriormente.

6.3 Efecto de la realimentación sobre la funcionalidad intestinal

Las posibles discrepancias que nos encontramos entre la relación del peso corporal y la ingesta en los diferentes grupos podrían estar relacionadas con el efecto de la desnutrición sobre la funcionalidad intestinal y el mantenimiento de esta disfuncionalidad durante el proceso de realimentación. En este sentido se ha descrito, tanto en estudios en animales como en humanos, una correlación entre la inanición y la atrofia de la mucosa intestinal [217]. En un estudio que utilizaban ratas con retraso en el crecimiento, se indicaba una atrofia de la mucosa del intestino delgado [251]. En otro estudio en el que se utilizaron cerdos desnutridos, también se observó una atrofia intestinal junto con una reducción en la altura de las vellosidades intestinales [252].

Acorde con estos estudios, se ha observado en niños que han experimentado un retraso en el crecimiento, una alteración de la funcionalidad gastrointestinal asociada a cambios morfológicos en el intestino como la disminución de la altura de las vellosidades, de la profundidad de las criptas y del área de superficie, así como del número de células epiteliales. Todas estas modificaciones en la mucosa intestinal generan una reducción de la superficie de absorción asociada a una disminución de la funcionalidad intestinal [217]. Otras investigaciones han relacionado la atrofia intestinal causada por la desnutrición con la disminución de la capacidad de absorción del duodeno y yeyuno, además de alterar la actividad de enzimas intestinales tales como disacaridasas, aminopeptidasas y fosfatasas alcalinas [253, 254].

En nuestro modelo, no observamos que estos efectos negativos sobre el intestino se prolonguen después de la realimentación, de tal forma que no existen diferencias, al final del estudio, entre grupos en la relación entre la cantidad de mucosa y la longitud del intestino. Sin embargo, se puede destacar que, de forma aislada, sí observamos diferencias significativas entre la cantidad de mucosa entre los dos grupos, siendo mayor en el grupo alimentado con la dieta basada en carbohidratos de digestión lenta. Existen evidencias de que la malnutrición reduce el espesor de la mucosa y que esta se normaliza al recuperar el estado nutricional, por lo que la alimentación con la dieta SDC permitiría una recuperación más rápida de la composición de la mucosa intestinal [255].

6.3.1 Efecto de la realimentación sobre hormonas intestinales

El tracto gastrointestinal no solo es un sistema donde se almacenan y se procesan los alimentos, sino que también es determinante en su propia regulación, en el control de la ingesta y en el balance energético. Existen numerosos péptidos que son liberados desde el estómago o el intestino y participan en las sensaciones de saciedad o hambre, que por vía neuronal o humoral van a originar la activación de diferentes regiones

cerebrales, induciendo (hormonas orexigénicas) o inhibiendo (hormonas anorexigénicas) la ingesta [218, 256].

La secreción de grelina se relaciona con el inicio de la ingesta y se le considera una de las principales señales orexigénicas, tanto en modelos animales como en humanos. Esta hormona es secretada durante el ayuno por las células P/D1 del estómago y ejerce su acción al unirse a sus receptores localizados en el hipotálamo y la hipófisis. La regulación de la secreción de grelina depende en gran medida del aporte de nutrientes. Durante el ayuno, los valores plasmáticos de grelina duplican los basales, para descender rápidamente tras la ingestión de alimentos y aumentar progresivamente antes de la siguiente comida. Pero la grelina también es importante en la regulación de la homeostasis energética a largo plazo y se ha correlacionado con la adiposidad [257].

Por lo tanto, teniendo en cuenta la relación de la grelina con el incremento del peso corporal analizamos en los diferentes grupos experimentales los niveles plasmáticos de esta hormona en un estado posprandial tras una hora de ingesta. Observamos que los grupos RDC y SDC presentaron unos niveles inferiores al grupo no restringido, pero no existían diferencias entre ellos. Por lo tanto, la diferencia en el perfil de carbohidratos de las dos dietas no influyó sobre la regulación del apetito en el animal por esta hormona.

En contraste, la mayoría de las hormonas gastrointestinales que intervienen en el control de la ingestión de alimentos son anorexigénicas. El papel de algunas de ellas como moléculas saciantes se conoce desde hace tiempo, pero destacarían las incretinas por su relevancia fisiológica. Y entre estas hormonas, el péptido GLP-1 ha sido uno de los más estudiados por su implicación holística en diferentes funciones del organismo [258, 259]. GLP-1 es secretado por las células L del intestino, principalmente en la región del yeyuno y del colon. Se libera desde el intestino tras la ingestión de nutrientes, fundamentalmente hidratos de carbono y ácidos grasos y en proporción con el contenido calórico. En roedores se ha observado que la administración de GLP-1 inhibe la ingesta de alimentos

[252] y un tratamiento prolongado causa pérdida de peso [260]. Esta hormona también produce una reducción del apetito y de la ingestión de alimentos en humanos sanos, obesos o con diabetes mellitus [257]. Por ejemplo, se ha demostrado que la infusión intravenosa de GLP-1 reduce en un 12 % la ingesta de alimentos en humanos sanos no obesos [261].

En nuestro estudio observamos que la ingesta de la dieta con la mezcla de carbohidratos de digestión lenta, incrementa significativamente el nivel de GLP-1 en plasma posprandial de animales al final del periodo de realimentación, en comparación al grupo que fue alimentado con la dieta con carbohidratos de digestión rápida. Teniendo en cuenta el papel de esta incretina en la ingesta de alimentos descrito anteriormente, la reducción de la ingesta observada en los animales alimentados con la dieta SDC podría estar relacionada con este incremento en los niveles de GLP-1.

Este resultado parece estar directamente relacionado con el perfil de carbohidratos presentes en la dieta SDC. En este sentido, en ratas sanas se ha evaluado la capacidad de la sacarosa e isomaltulosa para inducir la secreción de GLP-1. En comparación con la sacarosa, la isomaltulosa aumentó el nivel plasmático de GLP-1 por encima del efecto de la sacarosa, lo cual se relacionó con respuestas glicémicas más altas en las ratas tratadas con sacarosa [262]. De igual forma, se ha descrito en sujetos sanos que el consumo de una maltodextrina resistente incrementó significativamente la concentración de GLP-1 en plasma y esto fue relacionado con un retraso en la sensación de hambre y un incremento de la saciedad a lo largo de 1.5-2 horas después de la ingesta [263]. Sin embargo, en otro estudio en personas sanas se describió que la ingesta diaria de oligofructosa, la fuente de fibra presente en el grupo RDC, no incrementó los niveles de GLP-1 [264].

6.4 Efecto de la realimentación sobre el metabolismo

6.4.1 Efecto de la realimentación sobre el metabolismo energético

Estudios de restricción calórica, en animales y humanos, han podido justificar que existe una adaptación a la escasez de alimentos aumentando la eficiencia de utilización de energía. También existen evidencias de que esta capacidad persiste, al menos en parte, durante la recuperación del peso tras la realimentación y que esa energía se deriva específicamente a la recuperación del tejido adiposo del organismo [265, 266]. En definitiva, estos estudios estarían definiendo el proceso de *catch-up fat*, considerándolo como un bucle de retroalimentación entre el tejido adiposo y la termogénesis que lleva a una mayor ganancia de grasa corporal [103]. El estudio del balance energético en modelos similares al utilizado en esta Tesis Doctoral, ha demostrado que la alta eficiencia de recuperación de grasa en animales realimentados, en comparación con los controles sanos, está relacionada con una reducción del gasto energético cercano al 15%, lo que los autores han atribuido a la supresión adaptativa de la termogénesis [267]. Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron diferencias en el nivel del gasto energético basal entre los grupos experimentales.

Como se describía en la introducción, el organismo tiene la capacidad de cambiar entre la utilización de grasas o carbohidratos según se requiera. En ayunas, la fuente principal de energía son las grasas y, tras la ingesta de alimentos, el organismo emplea los carbohidratos para los procesos energéticos que lo necesiten. Es lo que se denomina flexibilidad metabólica y es el proceso que ocurre en sujetos sanos. Sin embargo, en individuos obesos o resistentes a la insulina, el organismo deja de tener esta capacidad para cambiar el uso de combustibles, de modo que hay una menor oxidación de grasas, así como un exceso de utilización de la glucosa [268]. Se ha demostrado que niños en edades cercanas a la pubertad que han tenido un retraso en el crecimiento, presentan una menor oxidación de grasas y una mayor oxidación de carbohidratos que los niños

controles que han tenido un crecimiento normal, tanto en ayunas como 30 minutos posprandial. Los autores relacionan este resultado con el incremento de la prevalencia de sobrepeso en personas que han sufrido una malnutrición debido a que la grasa que no se oxida pasa a ser almacenada [269]. Nuestros resultados estarían en consonancia con lo mostrado en este estudio. Aunque no existieron diferencias en el gasto energético, los valores del cociente respiratorio (RQ) mostraron un aumento del catabolismo de los carbohidratos en el grupo RDC que se normaliza en los animales del grupo SDC.

Paralelamente a estos cambios en la utilización de carbohidratos, el grupo SDC mostró un mayor uso de lípidos como fuente de energía en comparación con el grupo RDC. Estos cambios en el uso de combustible están estrechamente relacionados con la deposición de grasa en los grupos experimentales y con el papel preventivo de la presencia de los carbohidratos de digestión lenta. Este efecto regulador de la oxidación de los sustratos energéticos por medio de este tipo de carbohidratos, se ha observado también en niños sanos durante la transición desde un estado de ayuno a uno posprandial con ejercicio y su posterior recuperación. Los niños que tomaron los carbohidratos de digestión lenta presentaron, previamente al ejercicio, una menor oxidación de carbohidratos que los niños que tomaron carbohidratos de digestión rápida. Esta tendencia se mantuvo durante el ejercicio y en la etapa posterior de descanso no hubo diferencias entre las diferentes fuentes de carbohidratos. En la conclusión del estudio se indicó que el consumo de carbohidratos de digestión lenta puede alterar la oxidación de carbohidratos en niños manteniendo un equilibrio energético en unos niveles saludables [270].

6.4.2 Efecto de la realimentación sobre el metabolismo lipídico

El estado de sobrepeso u obesidad está relacionado con una situación de dislipemia, con niveles de triglicéridos circulantes altos. Los triglicéridos son compuestos químicos estables y ricos en energía, que son almacenados en el tejido adiposo. Sin

embargo, este sistema tiene un límite de saturación y el exceso de calorías durante un período prolongado puede provocar el depósito de triglicéridos y otros lípidos más tóxicos en los tejidos no adiposos (grasa ectópica), lo que provoca lipotoxicidad y una pérdida de funcionalidad en el tejido (como ocurre con la pérdida de fuerza en el músculo) [271, 272]. En nuestro estudio y en concordancia con los datos hasta ahora mostrados, los niveles de triglicéridos en ayunas están significativamente incrementados en el grupo RDC en comparación al grupo SDC. Esta diferencia se mantiene una hora después de administrarles su correspondiente dieta, aunque en ambos grupos los valores posprandiales son menores a los del ayuno.

En cambio, nuestro estudio no muestra diferencias significativas en los niveles de colesterol total sérico entre ambos grupos. A diferencia de los triglicéridos, el colesterol es una molécula esencial para la formación y funcionalidad de las membranas celulares y necesario como precursor de moléculas de señalización, como las hormonas [273].

6.4.3 Efecto de la realimentación sobre el metabolismo de la glucosa

Diversos estudios sugieren que el *catch-up growth* puede estar asociado con alteraciones en la sensibilidad a la insulina y funciones metabólicas. Más concretamente, se ha hipotetizado que sería la resistencia a la insulina la responsable de la relación que existe entre el *catch-up growth* y las enfermedades metabólicas asociadas que aparecen en edades posteriores [267, 274]. La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de incrementar la utilización de glucosa por los tejidos periféricos (músculo, hígado, tejido adiposo, etc.) con una cantidad de insulina en niveles normales. Los mecanismos fisiopatológicos involucrados en esta relación no están totalmente dilucidados, pero se ha descrito que la acumulación de grasa visceral en el proceso de *catch-up fat* puede contribuir no sólo a una condición de inflamación sino también a un estado de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia asociada. No obstante, el fenotipo ahorrador de *catch-up fat*, término utilizado para describir el patrón de crecimiento acelerado observado en

individuos que experimentaron restricción del crecimiento seguidos por una recuperación rápida de crecimiento posterior, se ha asociado tanto con una acumulación de grasa como con una hiperinsulinemia y alteraciones en la homeostasis de la glucosa. Este patrón de crecimiento se cree que es impulsado por mecanismos de conservación de energía que resultan en la acumulación de grasa y cambios metabólicos que pueden tener consecuencias a largo plazo en la salud [68, 86, 92, 106].

En nuestro estudio, los animales alimentados con la dieta RDC presentaron niveles de glucosa similares al grupo sano y al grupo SDC. Los niveles de insulina en ayunas fueron también similares al grupo SDC y mayores que el grupo sano. En cambio, en condiciones posprandiales los niveles de insulina del grupo RDC fueron superiores a los otros dos grupos. Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron valores significativos. Pero, por otro lado, cuando se analiza la cantidad de insulina necesaria por unidad de glucosa observamos que los valores para el grupo RDC fueron significativamente más altos que en el grupo alimentado con la dieta SDC. Además, el grupo SDC presentaba valores similares a los del grupo sano, que también fueron inferiores al grupo RDC.

6.5 Rutas de señalización molecular implicadas en el efecto de las dietas sobre el metabolismo

Hasta este punto hemos descrito los cambios observados en los diferentes grupos de animales, diferenciando un grupo que muestra un fenotipo similar al observado en un proceso de *catch-up fat* (grupo RDC) y otro grupo que tiene la capacidad de prevenir esta situación adversa mostrando una disminución del depósito de grasa, del índice de masa corporal y un uso de las fuentes de energía más equilibrado (grupo SDC). Este equilibrio podría deberse a un uso preferencial de las grasas en lugar de los carbohidratos como combustible energético celular. Para probar esta hipótesis se realizó un análisis de metabolitos y enzimas reguladoras claves, así como de las diferentes rutas de señalización implicadas en el proceso a nivel del tejido adiposo, el hígado y el músculo.

6.5.1 Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido adiposo

El tejido adiposo se caracteriza por ser el almacén de triglicéridos y, junto al músculo, captar la glucosa en un proceso mediado por sus transportadores dependientes de insulina. La glucosa en el tejido adiposo, tras haber sido usada para los requerimientos energéticos del tejido, se deriva hacia la síntesis *de novo* de ácidos grasos que se almacenan en forma de triglicéridos, los cuales se utilizarán en una situación de déficit energético. En humanos y roedores con resistencia a la insulina u obesidad, la alteración en el flujo de sustratos por la resistencia insulínica favorece la lipólisis y consiguiente liberación de ácidos grasos y glicerol. El glicerol será utilizado en el hígado para gluconeogénesis [275, 276]. En nuestro estudio los animales del grupo RDC, aunque no expresaron diferentes niveles del transportador de glucosa independiente de insulina GLUT1, mostraron una significativa menor expresión de GLUT4 que el grupo SDC, el transportador de glucosa que es traslocado a la superficie celular tras la interacción de la insulina con sus receptores. La mayor expresión de GLUT4 en el grupo alimentado con la dieta SDC respaldaría el efecto positivo descrito anteriormente evitando la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos.

Sin embargo, en los animales alimentados con la dieta que contenía carbohidratos de alto índice glicémico, la menor presencia de transportadores GLUT4 en la superficie de los adipocitos refleja una resistencia a la insulina en el tejido que podría traducirse en un mayor uso glucolítico de la glucosa. Esto se pudo confirmar al observar una mayor expresión de PKM $\frac{1}{2}$ para este grupo con respecto al grupo SDC. PKM $\frac{1}{2}$ es una proteína tetramérica con subunidades idénticas ubicada en el citosol. Es una enzima clave en el control del flujo glucolítico al estar involucrada en los pasos críticos del proceso de oxidación de la glucosa [277, 278].

Como ha sido descrito, el incremento del proceso glucolítico está asociado a un incremento en la lipogénesis. La piruvato carboxilasa es una enzima implicada en la

lipogénesis de *novo*. Es característica de tejidos gluconeogénicos como el hígado, pero también existe una elevada expresión en el tejido adiposo, proporcionando suficientes cantidades de grupo acetil y NADPH necesarios para la síntesis de ácidos grasos de *novo*. El acetil-CoA generado en la mitocondria por la descarboxilación oxidativa del piruvato, posteriormente se condensa con el oxalacetato y los grupos acetilo son transportados al citoplasma como citrato, a través de la lanzadera malato-citrato. Más tarde, éste sufre una escisión dependiente de ATP para producir acetil-CoA y oxalacetato. Esta vía requiere de un suministro continuo de oxalacetato, que es proporcionado por la actividad del piruvato carboxilasa. El acetil-CoA, que es un componente básico de los ácidos grasos de cadena larga, se convierte luego en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa [279, 280]. Acorde a los valores obtenidos para la PKM $\frac{1}{2}$, los animales alimentados con la dieta RDC presentaron valores más elevados de PC que los animales alimentados con la dieta SDC.

Esta sobreexpresión de las enzimas PKM $\frac{1}{2}$ y PC en el tejido adiposo de los animales alimentados con carbohidratos de rápida digestión genera un aporte continuo de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH. El malonil-CoA generado actúa como inhibidor de la actividad carnitina aciltransferasa I, enzima responsable del paso de los ácidos grasos al interior mitocondrial para su β -oxidación, por lo que el exceso de glucosa intracelular bloquea la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, favoreciendo la utilización de esta glucosa para la obtención de energía a través de la glucólisis y para la formación de nuevas moléculas de ácidos grasos [281].

Por otro lado, el acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH generados son además los principales sustratos de la ácido graso sintasa (AGS), un complejo multienzimático responsable del último paso de la síntesis de ácidos grasos de *novo*. Este complejo se encuentra en el citosol de numerosos tejidos, como son el hígado, el tejido adiposo y los pulmones; y en menor proporción, en otros como el riñón y cerebro [282, 283]. Cuando se analizó la expresión de la AGS en los diferentes grupos experimentales, el grupo RDC mostró una mayor expresión de esta enzima que el grupo SDC. Se ha descrito que la

alimentación con carbohidratos simples incrementa sustancialmente la actividad de este complejo multienzimático [111, 284]. Además, se conoce que el aumento en la actividad y la expresión de la AGS son reflejo de la adipogénesis de *ново* y está relacionada con la dislipemia y la alteración del perfil sérico de la IL-6 o la leptina [285, 286]. De igual forma, se ha observado en el tejido adiposo de sujetos obesos que el incremento de la expresión de AGS está relacionado con un descenso de la sensibilidad de los receptores de la insulina [287]. Y esta relación es recíproca pues se ha hallado en ratones con una delección específica del receptor de insulina del tejido adiposo una mayor expresión de AGS en los adipocitos en comparación con los animales sanos [288].

Por lo tanto, la disminución de la sensibilidad a la insulina del grupo alimentado con la dieta RDC se relaciona con un mayor uso glucolítico de la glucosa y con una mayor lipogénesis de *ново*, medida como la expresión del ácido graso sintasa, posiblemente interconectado a su vez con unos mayores niveles de citoquinas y adipoquinas, con una mayor adiposidad y con una expresión incrementada de las vías mediadas por la PKM $\frac{1}{2}$ y PC. La ingesta de la dieta que contiene carbohidratos de digestión rápida está propiciando el metabolismo del tejido adiposo típico del *catch-up fat*, que se caracteriza por tener como objetivo rellenar cuanto antes las reservas de grasa tras una restricción alimentaria.

Sin embargo, la utilización de dietas con carbohidratos de digestión lenta, podría estar ejerciendo un efecto protector en este tejido evitando la evolución de este metabolismo ahorrativo. Más a favor de esta teoría está el incremento de la expresión de ATP sintasa en el tejido adiposo de este grupo en comparación al grupo RDC, implicando una mayor producción de ATP para soportar una amplia variedad de rutas metabólicas, incluyendo la síntesis de triglicéridos, la gluconeogénesis, o la esterificación de los ácidos grasos. Además, en relación con el incremento de la actividad de esta enzima, los niveles de las proteínas desacoplantes UCP1 y UCP2 en el grupo SDC son inferiores a los observados en el grupo RDC. Estas proteínas pertenecen a una familia de proteínas transportadoras de protones ubicadas en la membrana interna mitocondrial [289]. Su

función es devolver los protones a la matriz mitocondrial, evitando su paso por la ATPasa y con ello la producción de ATP. Esto provoca la disipación de la energía en forma de calor y activa el consumo de energía al desacoplar la oxidación y fosforilación mitocondrial, lo que tiene una gran importancia en el balance energético [290, 291].

La proteína desacoplante UCP1 se descubrió en el tejido adiposo marrón y su papel principal está relacionado con la termogénesis adaptativa y el control del peso corporal. Se ha descrito que la baja temperatura o la sobrealimentación conducen a la regulación positiva de la expresión del ARNm de la proteína desacoplante UCP1. Por otro lado, se ha encontrado una relación directa entre la expresión de la proteína desacoplante UCP2 y la resistencia a la insulina [291]. Ambas proteínas de desacoplamiento se expresan significativamente menos en el grupo SDC, lo que proporciona una vía mitocondrial más funcional para la oxidación aeróbica de los sustratos. En conjunto, un aumento de la expresión de ATP sintasa y una disminución de la expresión de proteínas de desacoplamiento en el grupo alimentado con la dieta SDC podrían indicar un uso más eficiente de la glucosa para obtener energía en forma de ATP, para compensar la reducción del flujo glucolítico.

La expresión de las proteínas desacoplantes está regulada por la presencia de ácidos grasos y de ciertos factores de transcripción como PPAR γ [291, 292]. Los factores de transcripción son una serie de secuencias reguladoras y proteínas que son capaces de intervenir en la expresión de los genes [293]. La sensibilidad a la insulina y la adipogénesis están reguladas por factores de transcripción [293]. Estas proteínas nucleares, al activarse, se unen a regiones específicas del ADN conocidos como elementos de respuesta, que se encuentran cerca del promotor de un gen, que es su punto de inicio de la transcripción y funcionan estimulando o reprimiendo la tasa transcripcional de los genes sobre los que ejerzan su efecto uniéndose a los elementos cis o regiones promotoras específicas. Esto da lugar a una activación o desactivación de cascadas de señalización de genes [124]. Los receptores activados por proliferadores peroxisómicos

(PPAR) responden a cambios en los lípidos de la dieta, por lo que intervienen en el metabolismo de grasas y glúcidos siendo sus ligandos los ácidos grasos y sus derivados. Son una superfamilia de receptores nucleares entre los que destacan PPAR α , PPAR δ y PPAR γ que actúan en el núcleo formando heterodímeros con otros receptores nucleares [292].

PPAR γ se expresa principalmente en el hígado y el tejido adiposo e interviene en la activación de genes necesarios para la diferenciación de fibroblastos en adipocitos y genes que codifican proteínas requeridas para la síntesis endógena de colesterol, ácidos grasos y triacilglicerol y para el almacenamiento de lípidos en estos tejidos. Además, este factor de transcripción se considera esencial para la diferenciación de los adipocitos. [292, 294]. La expresión de este factor de transcripción durante la adipogénesis no sólo facilita la diferenciación celular, sino que además resulta en la activación de una serie de genes en cascada cuyos productos están relacionados con el cambio del uso de combustible, como la piruvato carboxilasa, que describíamos anteriormente permite el mayor suministro de grupos acetilo y NADPH para la lipogénesis o las proteínas desacoplates también citadas previamente [279, 292, 294, 295].

La cantidad de tejido adiposo se ve incrementada casi proporcionalmente a la actividad de PPAR γ . En situaciones con un mayor acúmulo de grasas o con mayor cantidad de lípidos circulantes, las proteínas desacoplates UCP están sobre expresadas en el tejido adiposo con la finalidad de controlar el peso corporal, regulando la adiposidad a través de la disipación de energía [291, 296]. Nuestros resultados indican que el *catch-up growth* con la dieta RDC, indujo un aumento significativo en la expresión de PPAR γ que permite la deposición de lípidos en el tejido adiposo. Por el contrario, la dieta SDC normaliza esta señalización y, de acuerdo con las enzimas clave medidas, controla la deposición de grasa en el tejido adiposo de los animales tratados.

En conjunto, en el tejido adiposo encontramos que la dieta SDC aumentó la expresión de GLUT4, que refleja una mejor sensibilidad a la insulina pero que no se asocia con una mayor adiposidad. Esto está respaldado por los datos de una disminución en los niveles de PKM que indican que el flujo glucolítico está reducido, así como la menor expresión de PC y FAS que revelan una menor lipogénesis. Estos efectos sobre el uso de combustibles por parte del tejido adiposo en el grupo SDC probablemente estén modulados principalmente por la vía mediada por PPAR γ (Figura 40).

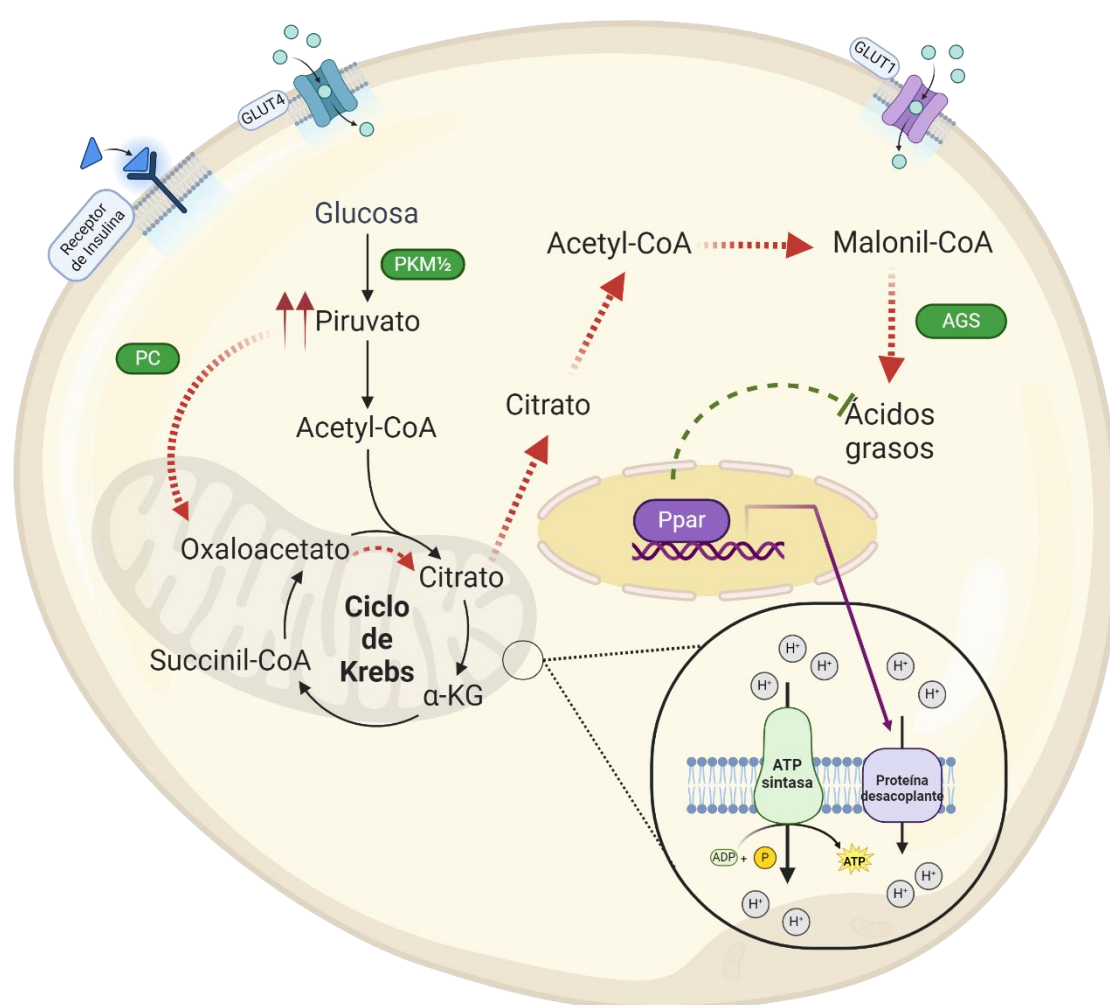


Figura 40 . Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido adiposo. Elaboración propia a partir de [224, 231, 245, 267, 294]. Creado con Biorender.com.

6.5.2 Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido hepático

El hígado es uno de los principales responsables de la homeostasis de la glucosa en el organismo. Coordina la producción y el almacenamiento de glucosa como glucógeno. La glucosa entra al interior del hígado a través del transportador GLUT2. GLUT2 transporta glucosa de manera proporcional a su presencia en el medio, actuando como un glucosensor, de tal forma que informa a los tejidos en los que se encuentra de las concentraciones circulantes de glucosa, como el hígado, riñón, neuronas, las células β del páncreas o la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. De modo que, en el caso del hígado, si hay concentraciones suficientes para superar la K_m del GLUT2, pasa a través de estos transportadores y será metabolizada para generar energía en forma de ATP o para obtener intermediarios metabólicos que serán sustratos para la síntesis de combustibles como el glucógeno o los triglicéridos. En situación de ayuno, el glucógeno convertido a glucosa es capaz de salir a través de este transportador bidireccional [297-299]. En nuestro estudio, no se observó efecto de las diferentes dietas sobre la expresión del transportador GLUT2, presentando niveles similares en ambos grupos. Sin embargo, el contenido de glucógeno del grupo SDC fue mayor que en los otros dos grupos experimentales, lo cual indicaría un papel fundamental del hígado en el control de la glucemia en respuesta a esta dieta con carbohidratos de digestión lenta.

Si bien no hemos hallado diferencias entre grupos experimentales en la expresión del transportador de glucosa GLUT2 ni de la ATPasa en el hígado de nuestros grupos experimentales, la sensibilidad a la insulina la podemos determinar por la expresión de p-Akt en este tejido. Hemos obtenido datos de una mayor fosforilación de p-Akt y por tanto una mayor sensibilidad a la insulina para el grupo alimentado con la mezcla de carbohidratos de baja digestibilidad. En estados de resistencia a la insulina, la alteración en la vía de esta hormona no inhibe la lipólisis en el tejido adiposo en situaciones de disponibilidad de nutrientes, de modo que los lípidos circulantes son captados por el hígado, que a su vez se encuentra en estado lipogénico [300, 301].

Al discutir los resultados obtenidos para el tejido adiposo, hacíamos referencia a los factores de transcripción y a su potencial induciendo adaptaciones del metabolismo tanto a corto como a largo plazo. Los carbohidratos son uno de los principales nutrientes responsables de estas adaptaciones. Lo hacen a través de una serie de genes cuya respuesta se ve incrementada bajo el estímulo de la glucosa. Tienen un elemento de respuesta a los hidratos de carbono (ChORE) en sus promotores y un factor de transcripción denominado proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), que es capaz de reconocerlo. ChREBP- α se expresa en hígado y tejido adiposo. Su actividad se regula por mecanismos de fosforilación y desfosforilación, de modo que ante la escasez de glucosa, ChREBP está fosforilado e inactivo en el citosol. Estos factores de transcripción son muy dependientes de la sensibilidad del tejido a la glucosa, ya que al aumentar la concentración de esta molécula, ChREBP se desfosforila y se transloca al núcleo, en donde se une a ChORE en los promotores de sus genes diana [220, 300] y activa la transcripción de diferentes genes que codifican enzimas glucolíticas y lipogénicas [302, 303].

En consonancia con la mejor homeostasis glicémica del hígado de los animales que fueron alimentados con carbohidratos de baja digestibilidad, hallamos una menor expresión del elemento de respuesta a carbohidratos ChREBP. Este regulador transcripcional ejerce su función a través del complejo ácido graso sintasa y de la última enzima de la glucólisis, PKM $\frac{1}{2}$ [302, 303]. La expresión de ambas enzimas se halló reducido en el hígado de estos animales. La expresión de PKM $\frac{1}{2}$ es reflejo de un menor destino glucolítico de la glucosa y el complejo AGS en el hígado produce ácidos grasos para el almacenamiento de energía en situaciones de un exceso de nutrientes. Posteriormente estas moléculas se empaquetan en partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y se transportan a diferentes tejidos extrahepáticos [220]. La disminución significativa de la AGS en el hígado del grupo SDC podría ser considerada como un efecto protector hacia las futuras reservas de grasa en el hígado de los animales que han experimentado *catch-up growth* tras un proceso de restricción calórica.

La mayoría de los genes regulados por ChREBP también muestran sitios de unión en sus promotores para la familia de reguladores transcripcionales SREBP actuando de manera coordinada [124]. Fundamentalmente, ChREBP es activado mayoritariamente por glucosa e impulsa rutas glicolíticas y lipogénicas. SREBP-1 por su parte es impulsado principalmente por insulina y propicia la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y SREBP-2 se asocia más a la acumulación de colesterol, por lo que están implicados en la síntesis lipídica en el hígado y el tejido adiposo [221, 294]. Entre otros factores, su expresión se induce por la activación de las rutas dependientes de PI3K/Akt y de MAP quinasas, dependiendo así de las vías de activación de la insulina [304, 305].

En el hígado de los animales que fueron alimentados con la dieta de mayor índice glicémico, se apreció una mayor tendencia lipogénica del tejido, medida como la expresión de ambos factores de transcripción, ChREBP y SREBP1. En un estudio en roedores se concluyó que la inducción máxima de la lipogénesis posprandial en este tejido requiere de la activación de ambos factores de transcripción simultáneamente [221]. Si bien no hemos hallado diferencias entre los grupos experimentales en cuanto a la expresión de SREBP-2 (y de acuerdo con ello, tampoco la hemos hallado en los valores de colesterol circulante) podemos entender que la alteración homeostática del metabolismo glucídico que se describe para el grupo RDC se traduce en una hiperactivación de ambos factores de transcripción, ChREBP y SREBP-1. La ingesta de la dieta que contenía carbohidratos de alto índice glicémico durante el *catch-up growth* ha generado un aumento tanto de la glucólisis como de la síntesis lipídica en el hígado, que se refleja también en la mayor concentración de triglicéridos circulantes.

Si bien el músculo, debido principalmente a su abundante presencia proporcional en el organismo, puede considerarse el tejido con mayor repercusión global en cuanto al uso de combustibles, el hígado también tiene un importante papel en la flexibilidad metabólica. Esta se define como la capacidad de regular el flujo de nutrientes a través de diversas vías en respuesta a cambios agudos en la disponibilidad de nutrientes y la

demanda de energía [268, 306]. La posibilidad de cambiar el catabolismo del sustrato en función del estado nutricional depende de la estabilidad entre las capacidades de oxidación y almacenamiento. Una de las funciones principales del hígado consiste en regular el suministro de glucosa y otros combustibles para proporcionar energía a otros tejidos. El complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) desempeña un papel clave en la competencia entre los ácidos grasos y la glucosa por la oxidación. Este complejo suele estar activo en los tejidos en estado posprandial, pero la supresión de su actividad por la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) es fundamental para mantener la homeostasis energética en condiciones nutricionales en las que la glucosa es escasa y se necesita su síntesis [307].

Las diferentes isoenzimas de PDK fosforilan residuos específicos de serina en la piruvato deshidrogenasa. De las isoenzimas de PDK conocidas, PDK2 y PDK4 son las más abundantes y se encuentran muy expresadas en el corazón, hígado y riñón de humanos y roedores. PDK4 también es abundante en los islotes pancreáticos y en los músculos esqueléticos que tienen una alta utilización de glucosa y elevadas tasas de oxidación de ácidos grasos. El grupo alimentado con carbohidratos de digestión lenta mostró mayores cantidades de la proteína PDK4, que ejerce su función como enzima reguladora del flujo glucolítico, inhibiendo al complejo PDH para evitar el paso del piruvato a acetil-CoA. De este modo, en lugar de oxidarse en el ciclo de Krebs o servir para la biosíntesis de ácidos grasos, el piruvato se utilice en la gluconeogénesis [308, 309].

Este resultado apuntaría a que en el grupo SDC existiría una respuesta hepática adaptativa que se traduce en una disminución del flujo glucolítico (medida como PKM $\frac{1}{2}$) y, por tanto, un menor uso de glucosa como combustible metabólico para los precursores de triglicéridos que está en concordancia con la menor expresión de AGS en este grupo, a pesar de no hallar diferencias en la expresión de PC. Esto nos podría llevar a pensar que una mezcla de carbohidratos de digestión lenta genera un estado metabólico en el que la disminución de la insulina en sangre se combina con un mayor almacenamiento de

glucosa en forma de glucógeno y, al mismo tiempo, un menor uso de glucosa por la ruta de la glucólisis y en consecuencia una disminución en la síntesis de triglicéridos (Figura 41).

Además, se ha identificado que la incretina GLP-1, la cual se encuentra en niveles elevados en el plasma de los animales del grupo SDC, está relacionada con una disminución de la tendencia lipogénica del hígado [256]. En esta línea, en estudios recientes tanto en animales como en humanos se ha demostrado que la ingesta de carbohidratos presentes en la dieta SDC, como FOS, inulina o maltodextrinas resistentes, reducen la actividad de las enzimas lipogénicas hepáticas, disminuyendo la liberación de triglicéridos a la sangre [310]. Más concretamente, en hámsteres alimentados con una dieta hipercolesterolemia y una combinación de inulina y maltodextrinas resistentes (Fibersol) se ha conseguido reducir la producción de triglicéridos hepáticos y la presencia de estas moléculas circulantes [311]. Estos resultados apuntan a un cambio del metabolismo de los carbohidratos hepáticos hacia la síntesis de glucógeno en lugar de al uso de la glucosa como sustrato lipogénico, evitando el almacenamiento hepático de triglicéridos y disminuyéndolos en sangre gracias a la administración de una dieta con carbohidratos de digestión lenta.

En el grupo RDC, el aumento de la gluconeogénesis hepática y de la lipogénesis que provoca una acumulación lipídica y un incremento en la ganancia corporal está asociada con una reducción de las reservas de glucógeno.

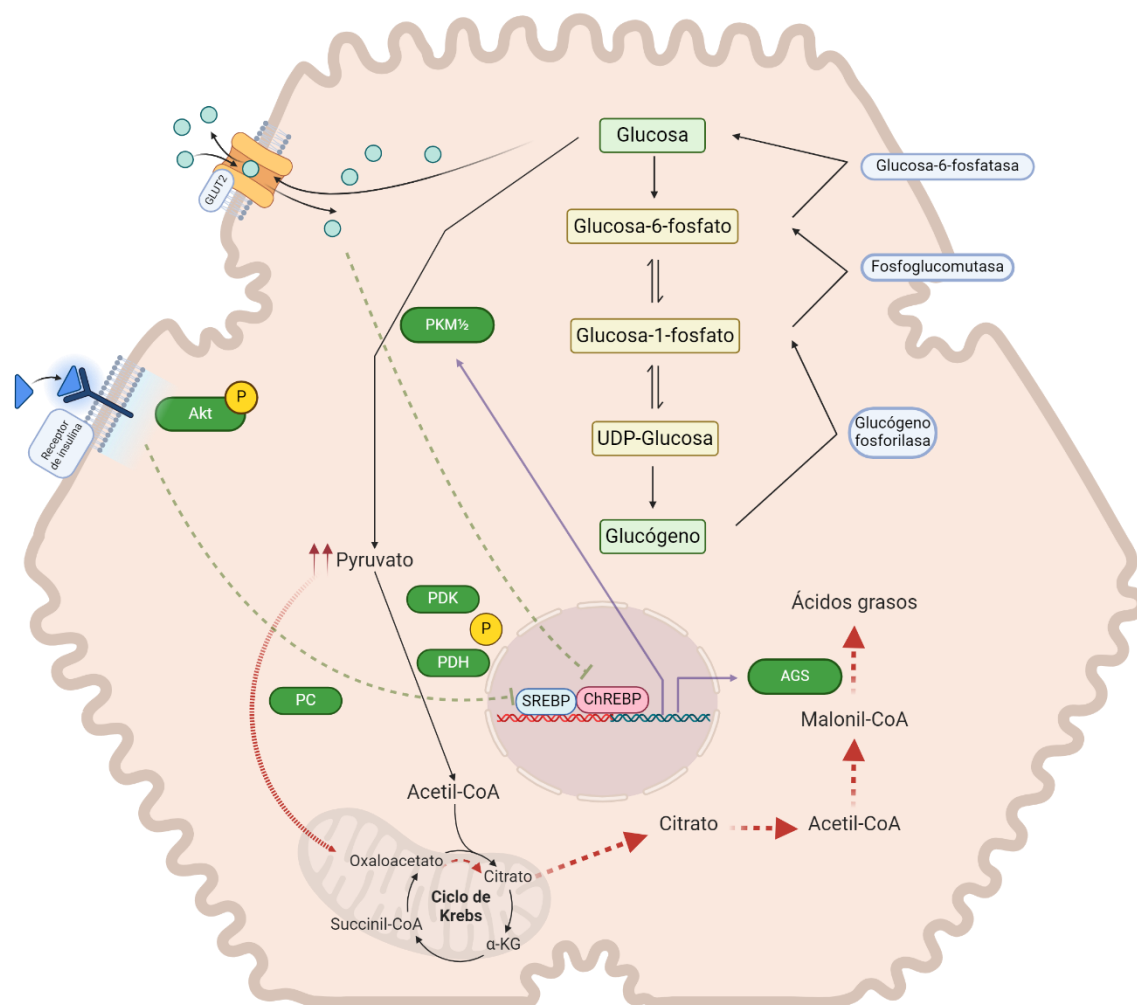


Figura 41. Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido hepático. Elaboración propia a partir de [221, 298, 299, 303, 312]. Creada con Biorender.com.

6.5.3 Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido muscular

El músculo esquelético representa aproximadamente el 40% del total de la masa corporal y para realizar su función necesita la glucosa como fuente principal de energía. La captación de glucosa aumenta bajo la estimulación de insulina, representando en sujetos sanos hasta el 80% de la eliminación de la glucosa en estado posprandial, lo que

confiere al tejido muscular una especial relevancia en la homeostasis glicémica [308, 313, 314].

Las alteraciones a nivel muscular presentan una alta correlación con la presencia de resistencia a la insulina en niños que atraviesan un período *catch-up growth*. Durante este proceso, el metabolismo muscular y la termogénesis se reducen debido a una disminución de la actividad de la PI3K, tanto en estado basal como en condiciones de estimulación por insulina [106, 315]. Esto conduce a un doble efecto: por un lado, a una disminución en funcionalidad muscular y por otro a un aumento de la adiposidad por la canalización de nutrientes hacia el tejido adiposo [86, 106].

Para determinar la sensibilidad a la insulina analizamos el estado de fosforilación de Akt, una quinasa que se fosforila tras la unión de esta hormona con su receptor y que permite o facilita la traslocación de GLUT4. La disminución de la señalización de la vía Akt/PI3K en el músculo esquelético podría ser una de las principales causas de resistencia a la acción de la insulina durante el *catch-up growth* [106]. Nuestros resultados indican que la dieta SDC podría prevenir estos efectos negativos al mostrar un incremento en la fosforilación de Akt en comparación al grupo RDC.

La consecuencia directa de esta mayor fosforilación, y por tanto una mayor actividad de Akt, es el incremento significativo de la expresión de GLUT4 muscular en el grupo SDC, ya que la traslocación hacia la membrana plasmática de este transportador está regulada por la insulina [106]. Dado que los animales del grupo SDC mostraron niveles de insulina circulante más bajos, este resultado señala que la ingesta de carbohidratos de digestión lenta puede promover una mejor respuesta a la insulina en los tejidos periféricos. Una mayor absorción de glucosa en el músculo tiene efectos beneficiosos, normaliza la glucemia (que también hemos visto regulada en el grupo SDC por el aumento del almacenamiento de glucógeno hepático) y proporciona combustible altamente metabolizable para facilitar la contracción muscular. Como era de esperar, la

expresión del transportador basal de glucosa GLUT1 no cambia en respuesta a las condiciones nutricionales.

En el músculo, la utilización de la glucosa se divide en dos principales rutas: ser almacenada como glucógeno o ser utilizada para producir energía y fuerza. Sin embargo, el músculo no es capaz de proporcionar la glucosa extraída del glucógeno a otros tejidos ya que carece de la enzima glucosa-6 fosfatasa. Esta enzima desfosforila a la glucosa-6 fosfato obtenida del glucógeno para poder liberarla al torrente sanguíneo en forma de glucosa. Debido a la ausencia de esta enzima en el músculo esquelético, el glucógeno muscular es utilizado únicamente como almacenamiento interno de energía, no interviniendo en el control de la glucemia [316]. En situaciones de resistencia a la insulina se ha descrito una reducción a nivel muscular de la síntesis de glucógeno [317]. Como hemos discutido previamente, el grupo RDC mostraba un perfil de resistencia a la insulina mientras que los animales del grupo SDC presentaban niveles cercanos al grupo NR. En relación con estos resultados, cuando se analizaron los niveles de glucógeno musculares, nuestros resultados mostraron que los animales del grupo SDC presentan un aumento en las reservas del glucógeno del músculo en comparación a los animales tanto del grupo RDC como NR, que es la primera vía no oxidativa de obtención de glucosa de este tejido [318].

Basándonos en la literatura científica, el músculo esquelético exhibe una notable flexibilidad metabólica en el uso de combustibles en respuesta a diversos desafíos, como la privación de energía o los cambios en la composición de la dieta [268, 306]. En personas delgadas y sanas, el músculo en ayunas capta ácidos grasos y oxida lípidos utilizándolos como fuente de energía. En respuesta al aumento de los niveles de insulina posprandial, las células musculares sanas suprimen este catabolismo lipídico y aumentan la captación de la glucosa, la cual oxidarán o almacenarán en forma de glucógeno en función de los requerimientos del tejido en ese momento. También en situación de reposo y durante el ejercicio de resistencia, se produce un cambio en la utilización del sustrato de la glucosa

a la grasa. Perseghin et al. [319] plantearon la hipótesis que la menor capacidad para cambiar entre la oxidación de grasas a la utilización de glucosa como fuente energética es una condición desregulada por la resistencia a la insulina, ya que la entrada de los sustratos a los tejidos es un condicionante tanto para su oxidación como para el cambio de uso entre uno y otro. De hecho, los pacientes obesos y diabéticos, los cuales presentan una resistencia a la insulina, muestran mayores tasas de oxidación de lípidos en el músculo esquelético, a pesar de disponer de glucosa posprandial [320].

En personas sanas, el músculo utiliza energía en forma de ATP para realizar el trabajo mecánico y la energía se obtiene principalmente del catabolismo de la glucosa. En el músculo, el catabolismo de glucosa preferido es el aeróbico, lo que involucra una síntesis neta mitocondrial de ATP. Para ello, es necesario una eficiente cadena respiratoria bien coordinada con la ATP sintasa. En este sentido, cuando se analizó la expresión de la ATP sintasa muscular se observó que el grupo SDC presentaban una mayor expresión en comparación al grupo RDC y al NR. Paralelamente, no se observaron diferencias entre grupos en el análisis de la expresión de la proteína desacoplante UCP2 mitocondrial, la cual se encuentra reducida en el músculo esquelético de sujetos obesos [321]. Estos datos podrían indicar que no existe disociación entre oxidación y fosforilación en el grupo SDC y que la glucosa almacenada como glucógeno en el músculo se utiliza eficientemente para obtener energía para el rendimiento muscular, lo que se favorece a su vez por el aumento del metabolismo aeróbico de la glucosa en el músculo de este grupo. De hecho, estos animales mostraron una mayor funcionalidad muscular medido como fuerza de agarre.

Para confirmar la mejora en la funcionalidad muscular de los animales alimentados con carbohidratos de digestión lenta se determinó la actividad de la creatina quinasa (CK). Esta es un enzima intracelular presente en mitocondrias y citoplasma del músculo esquelético, cerebro y músculo cardiaco, en los que se presenta en 3 isoformas diferentes. La CK cataliza la transferencia de un grupo fosfato altamente energético desde

la fosfocreatina al ADP, produciendo la molécula de ATP necesaria para realizar la contracción muscular. La fosfocreatina es el principal depósito muscular de almacenamiento de energía con una gran disponibilidad a la hora de realizar la contracción muscular, lo que permite mantener unos niveles adecuados de ATP en el músculo [124, 322]. Esto convierte a la CK en la principal enzima responsable del mantenimiento de la homeostasis energética en tejidos que la necesitan en alta demanda, siendo por lo tanto la mayor actividad de esta enzima reflejo de una mayor actividad muscular. Cuando analizamos nuestros grupos experimentales observamos un aumento significativo de CK en el grupo SDC en comparación con los grupos RDC y NR.

Desde el punto de vista de flexibilidad metabólica, la eficiencia en el cambio en la utilización de los sustratos resulta fundamental en la funcionalidad muscular. Los animales alimentados con la dieta SDC revelan una clara preferencia por la oxidación de grasas y la preservación de la glucosa, al contrario que aquellos que fueron alimentados con la dieta RDC. De hecho, en el grupo SDC, los resultados obtenidos con el equipo de calorimetría indirecta apoyan esta adaptación metabólica. Esta técnica nos permite obtener información sobre el combustible metabólico utilizado y nos puede indicar la capacidad que tiene el músculo para usar eficientemente los sustratos según las condiciones del organismo y su competencia para el cambio de oxidación de un sustrato a otro. En nuestros resultados encontramos valores inferiores del RQ en las ratas del grupo SDC respecto con las RDC, lo cual estaría indicando una mayor predisposición al uso de las grasas como fuente energética (los valores inferiores indican una mayor oxidación de grasa). Además, los porcentajes de utilización de las diferentes fuentes energéticas en el grupo SDC fueron similares a los observados en el grupo de animales no restringidos. Nuestras observaciones coinciden con las de Hoffman que investigó las características metabólicas de niños y niñas pre-púberes con y sin retraso en el crecimiento y observó que, en reposo, los individuos con retraso en el crecimiento mostraban una menor oxidación de grasas [269].

La ingesta de la mezcla de carbohidratos de baja digestibilidad durante el período de *catch-up growth* permitió a los animales mostrar una sensibilidad a la insulina mejorada y una correcta flexibilidad metabólica con un metabolismo con preferencia por la oxidación de grasas. Este efecto se había observado en un estudio clínico llevado a cabo por Malin et al. [323] con adultos obesos resistentes a la insulina a los que les proporcionaron cereales integrales. La literatura científica describe ampliamente que el consumo de isomaltulosa tiene efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico. En numerosos estudios clínicos con sujetos afectados por alteraciones del metabolismo de la glucosa, se ha descrito que este carbohidrato promueve una mayor oxidación de grasas tanto en ayunas como en situación posprandial y una menor acumulación de grasa visceral, así como de triglicéridos circulantes [165, 324-326]. Estos datos concuerdan con los nuestros, en los que observamos que la predisposición a la oxidación lipídica en función de la disponibilidad de este macronutriente reduce la presencia de triglicéridos en sangre y la menor acumulación lipídica, lo que contribuye a mejorar la sensibilidad a la insulina [327].

Por lo tanto, consideramos en nuestro entorno experimental dos vías de señalización para regular el uso de combustible. Uno mediado por insulina y las quinasas relacionadas; y un segundo regulado por la expresión de PPAR δ . Ya se ha descrito el estado de fosforilación de Akt, una quinasa clave en esta vía de señalización, que es significativamente mayor en el grupo SDC y, como hemos tratado anteriormente, este resultado se correlaciona con el aumento de la sensibilidad a la insulina muscular y la expresión del transportador de glucosa GLUT4. Como se ha descrito en el trabajo de Summermatter et al. [106], una disminución de la señalización de PI3K en el músculo esquelético podría ser una de las principales causas de resistencia a la acción de la insulina durante el *catch-up growth*. Nuestros resultados indican que la dieta de la SDC podría prevenir estos efectos negativos.

Con respecto a la segunda vía de señalización, PPAR δ es un receptor nuclear clave en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos en el músculo, ya que induce los

enzimas que actúan como encrucijadas metabólicas en la elección del sustrato de oxidación por parte de los tejidos. Su sobreexpresión ha sido relacionada negativamente con la glucólisis y el transporte de piruvato a las mitocondrias, teniendo una importante implicación a la hora de incrementar la sensibilidad a la insulina [328, 329]. Además de intervenir en la expresión de este factor de transcripción, puede aumentar la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético a través de la inducción de dos proteínas mitocondriales [294]: la carnitina palmitoiltransferasa 1b (Cpt1b), enzima limitante en la velocidad de paso de los ácidos grasos hacia la mitocondria para su β -oxidación y la PDK4, enzima implicada en la regulación negativa de la entrada de piruvato derivado de la glucosa hacia la mitocondria para su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos [328, 329]. El complejo piruvato deshidrogenasa es el encargado de catalizar la descarboxilación oxidativa del piruvato, ejerciendo de enlace entre el metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos [307, 330]. La actividad de este complejo está suprimida por la fosforilación de PDK4 que disminuye la conversión de piruvato en Acetil-CoA en el músculo esquelético. La menor concentración de Acetil-CoA provoca una menor síntesis de Malonil-CoA. Esta molécula ejerce su acción bloqueando a Cpt1b [331].

Teniendo en cuenta la implicación de esta ruta sobre el control del uso de sustratos energéticos y para ampliar la información obtenida con el equipo de calorimetría indirecta, hemos determinado la expresión de PPAR δ , PDK4 y Cpt1b. La expresión de PPAR δ es significativamente menor en el grupo RDC en comparación con los otros dos grupos. También hay un aumento en la expresión de PDK4 en el grupo SDC en comparación al grupo RDC. La sobreexpresión de PDK4 indica que existe una preferencia en el músculo de estos animales hacia el uso de ácidos grasos como combustible metabólico. Estos resultados también están respaldados por la mayor expresión de Cpt1b en el músculo esquelético de este mismo grupo. Este incremento de la oxidación de ácidos grasos está generando a su vez acetil-CoA y NADH que intercede en la fosforilación de PDK4, limitando la conversión de piruvato en acetil-CoA [330, 332]. En conjunto, el aumento de los valores de PPAR δ , la mayor fosforilación de Akt y el aumento en la

expresión de PDK4 son indicativos de una mayor sensibilidad a la insulina en músculo y un aumento de la flexibilidad metabólica del tejido de los animales que fueron alimentados con carbohidratos de bajo índice glicémico.

Para los animales alimentados con la dieta rica en carbohidratos de alto índice glicémico podemos determinar que el mayor depósito graso que apreciamos en las medidas obtenidas del equipo de resonancia magnética nuclear, es debido a la menor utilización de las grasas por parte del músculo esquelético para la obtención de energía, regulado por PPAR δ . Esta misma apreciación tuvieron en este estudio con roedores [281], en el que asociaron una disminución de la expresión de Cpt1b con un mayor depósito graso.

Al discutir los resultados del tejido adiposo y el hígado, tratábamos la competencia que tienen los factores de transcripción para inducir cambios en el metabolismo. La isoforma muscular del elemento de respuesta a carbohidratos ChREBP, MondoA, se encuentra expresada en el músculo esquelético [333]. Participa en la mejora de la lipogénesis muscular y las reservas de lípidos musculares que también conducen a la resistencia a la insulina en el tejido [334]. Anteriormente, en el análisis del efecto de las dietas a nivel hepático, identificamos las vías de señalización regulada por ChREBP y SREBPs como claves para evitar una programación lipogénica del metabolismo. De hecho, en el músculo de pacientes diabéticos, ChREBP puede asociarse con un aumento de enzimas glucolíticas/oxidativas [220].

En respuesta al aumento de los niveles de glucosa, ChREBP sufre una desfosforilación y se traslada del citoplasma al núcleo, donde se une a los elementos sensibles a los carbohidratos (ChoRE) de los genes diana ChREBP en el núcleo. Ésta activa la síntesis de enzimas implicados en el metabolismo lipídico a la vez que inhibe otros implicados en la vía de señalización de insulina. Puesto que la insulina es fundamental para la entrada de glucosa a la célula, parece que MondoA actúe como un *feedback*

negativo manteniendo la homeostasis de glucosa en el músculo esquelético. Sin embargo, se ha visto que en una situación de sobrecarga crónica de nutrientes, este sistema de regulación homeostática se colapsa y MondoA queda activado de manera persistente, lo que estaría relacionado con un aumento en la resistencia a la insulina, activando el metabolismo lipídico y provocando una interferencia en la vía de señalización de la insulina [333-335]. Varios estudios han relacionado el aumento de la expresión de ChREBP con la mayor expresión de enzimas glucolíticas en músculos de pacientes y animales diabéticos o resistentes a la insulina [198, 335, 336]. Nuestros resultados concuerdan con estos antecedentes. Mientras que la dieta RDC, con un músculo que presenta resistencia a la insulina, promueve un aumento en los niveles de ChREBP, la dieta SDC puede reducir significativamente la cantidad del regulador transcripcional, contribuyendo a disminuir el riesgo de acúmulo de grasa en el tejido muscular en este grupo experimental y con ello reduciendo el riesgo de resistencia a la insulina e inflexibilidad metabólica.

Al describir los reguladores transcripcionales en el hígado, discutíamos sobre la importante relación entre ChREBP y SREBP, que al mostrar sitios de unión al ADN comunes, sus efectos tienden ser simultáneos y actúan de manera coordinada [124]. Su expresión se induce a través de la activación de vías dependientes de insulina [304, 305]. En un tejido con baja síntesis lipídica como es el músculo esquelético, la función de SREBP está implicada en la inducción de ciertos factores regulatorios expresados durante el proceso de diferenciación miogénica, entre ellos el factor potenciador específico de miocito 2 (MEF2D). Este factor interviene en el control de la relación de síntesis y degradación de proteínas, por lo que puede modular el contenido proteico del músculo [337, 338]. Participa también en la diferenciación de miotubos y en el mantenimiento del tamaño de la fibra muscular y de su contenido proteico, en el crecimiento de la masa muscular y la regulación de la apoptosis celular [222]. Esto podría explicar parte de la patogenia de la resistencia a la insulina en el músculo, ya que a través de esta hormona se regulan numerosos procesos implicados con una correcta capacidad muscular. Y de hecho este tipo de pacientes presentan, entre otros signos, alteraciones de la funcionalidad muscular [317]. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* con células

musculares, han demostrado que la sobreexpresión de SREBP-1 está asociada con una atrofia muscular propiciada por una reducción de la expresión de factores reguladores de la miogénesis, como MEF2D [222].

En el músculo esquelético de nuestros animales alimentados con la dieta que contenía la mezcla con carbohidratos de digestión lenta, observamos una menor expresión de SREBP1, aunque no vimos este mismo efecto sobre SREBP2. La menor expresión de SREBP1 induce a su vez una mayor expresión de MEF2D en el tejido de estos animales y que junto a la mayor expresión de CK descrita previamente, reflejan una mejor funcionalidad muscular. Así, el uso que hace el organismo de los diferentes sustratos de oxidación está afectando directamente al rendimiento muscular debido a que la glucosa es el sustrato energético principal para la contracción muscular.

En conjunto, los mayores niveles de expresión de PDK4 en el músculo esquelético de los animales del grupo SDC, indican que se está produciendo una regulación negativa del desvío de piruvato hacia el ciclo de Krebs y de esta manera el catabolismo de la glucosa está reducido, preservando así la glucosa sistémica. El uso preferencial de los ácidos grasos como combustible metabólico que se observó en el equipo de calorimetría indirecta, medida como el valor RQ, se confirma por la mayor expresión de Cpt1b para este mismo grupo [308, 328]. Ambas enzimas están reguladas por el aumento de la expresión de PPAR δ que observamos para el grupo SDC que se asocia a una mejor sensibilidad a la insulina [328, 339], la prevención de la obesidad [340] y el aumento de la oxidación de los ácidos grasos [340, 341], además de una mejora en el rendimiento físico ligada a un mayor gasto energético. La relación de estos datos con la mayor fosforilación de Akt y la menor expresión de ChREBP pone de manifiesto una mayor sensibilidad a la insulina en músculo y una mejor flexibilidad metabólica. Este mejor uso de los combustibles permite además preservar las reservas de glucógeno del tejido en los animales alimentados con la dieta que contenía una mezcla de carbohidratos de baja digestibilidad [328].

Por lo tanto, observamos que el músculo esquelético de los animales del grupo alimentado con carbohidratos de alto índice glicémico durante la realimentación reúne las características del fenotipo de *catch-up fat*. Esta situación adversa se prevendría con la administración de la mezcla de carbohidratos de bajo índice glicémico, cuyos animales muestran un menor porcentaje de grasa en su composición corporal, una mayor fuerza de agarre y un uso de los sustratos más equilibrado con una tendencia al uso de grasas en lugar de carbohidratos como combustible metabólico basal. Todo ello coordinado por una mejorada sensibilidad a la insulina y una adecuada flexibilidad metabólica de los tejidos (Figura 42).

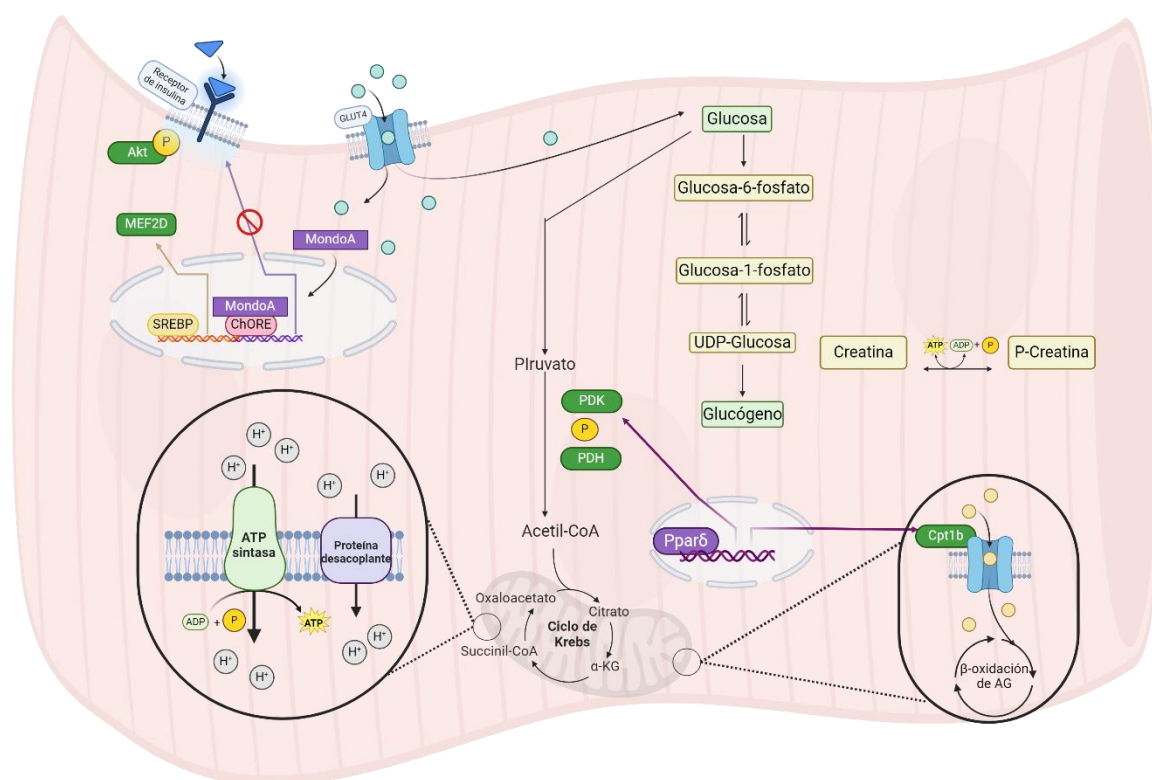


Figura 42. Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido muscular. Elaboración propia a partir de [68, 292, 296, 308, 322, 328, 331, 334]. Creado con Biorender.com.

7 Conclusiones

1. La suplementación de la dieta para animales que han sufrido una restricción calórica con carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico previene las consecuencias negativas del *catch-up growth* en términos de control de la deposición grasa y niveles séricos lipídicos y del metabolismo de la glucosa. Se relaciona además con una reducción de los marcadores inflamatorios séricos y las adipoquinas así como con una mayor liberación intestinal de incretinas.

2. Los carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico favorecen la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo de los animales que se recuperan de una restricción calórica, además de prevenir la deposición lipídica regulando enzimas como la PKM $\frac{1}{2}$, piruvato carboxilasa y ácido graso sintasa. PPAR γ es el responsable de los cambios a nivel de señalización en el tejido de estos animales.

3. El tejido hepático de los animales realimentados con una dieta con carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico, presenta una mayor sensibilidad a la insulina y una menor predisposición lipogénica del tejido, ambas reguladas por ChREBP y SREBP. La mejor flexibilidad metabólica apreciada favorece el destino glucogenogénico de la glucosa que se aprecia en la mayor concentración de glucógeno en el tejido de estos animales en comparación con los alimentados con una dieta con carbohidratos de alto índice glicémico.

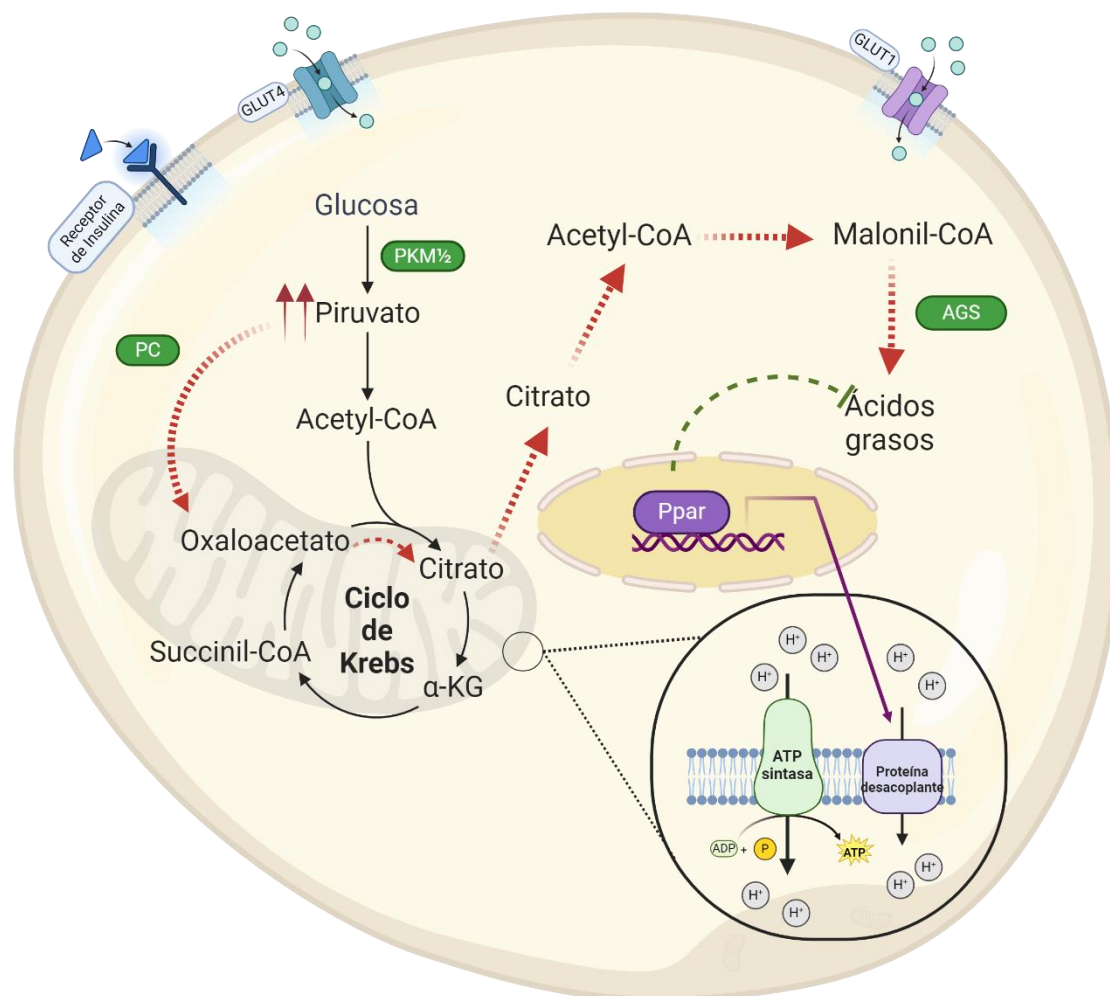
4. La incorporación de carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico a la dieta animales que han sufrido una restricción calórica activa factores de transcripción en el músculo esquelético como PPAR δ , SREBP y ChREBP, favoreciendo la oxidación de grasas y la sensibilidad a la insulina a través de vías de señalización como Cpt1b, Akt o PDK, lo que se traduce en una adecuada flexibilidad metabólica del tejido. Además, permite la conservación de los depósitos de glucógeno y una mayor actividad creatina quinasa,

favoreciendo una mejor funcionalidad muscular, al contrario que ocurre en los animales que fueron alimentados con una dieta con carbohidratos de alto índice glicémico.

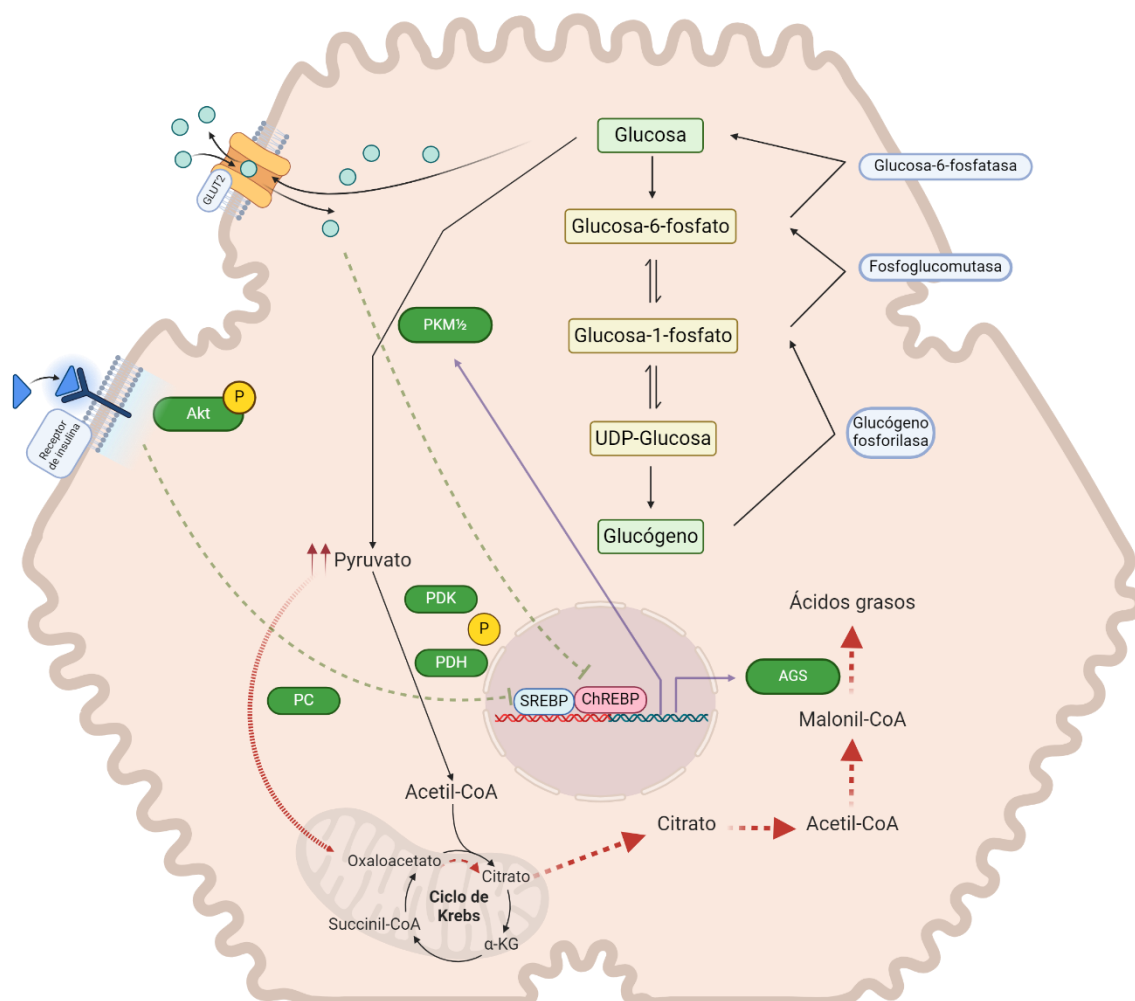
5. Tras estos resultados subyace un mecanismo de prevención del fenotipo ahorrador en el cual los carbohidratos de baja digestibilidad e índice glicémico interceden sobre el metabolismo energético, que muestra una mejor flexibilidad metabólica y una sensibilidad a la insulina mejorada, que permite prevenir los efectos negativos del *catch-up growth* conservando el potencial de crecimiento de los animales.

8 Resumen gráfico

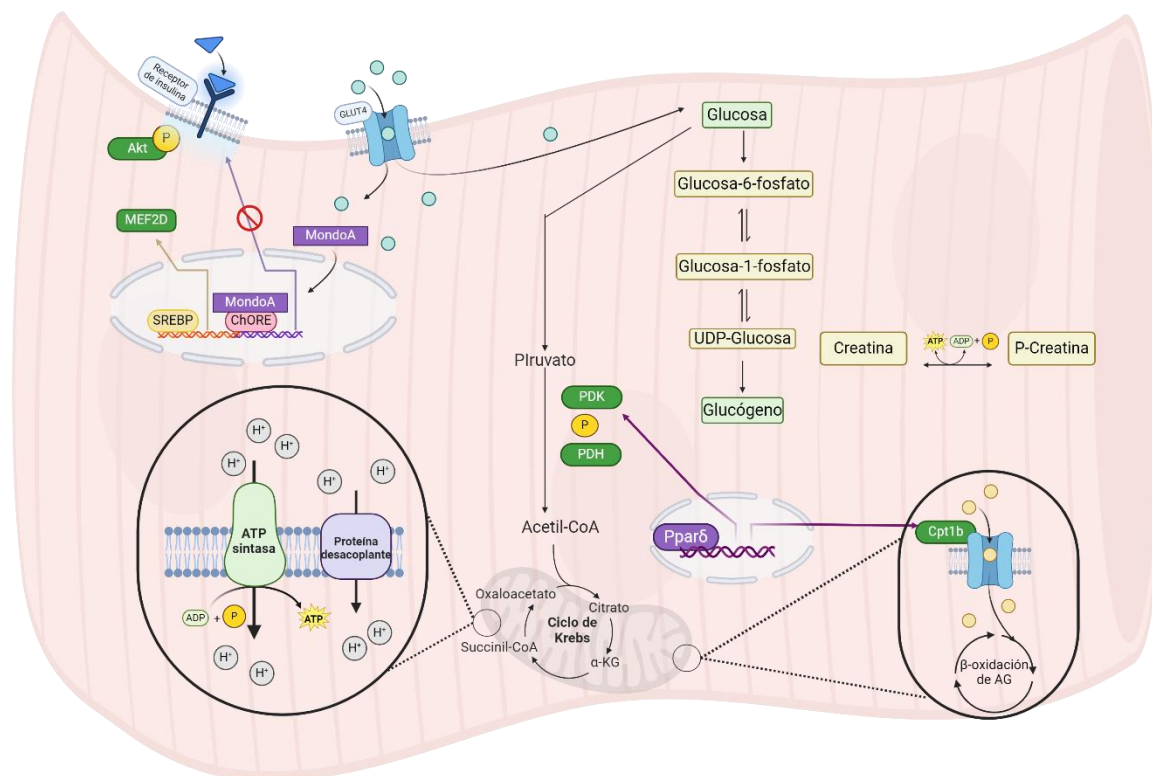
Efectos metabólicos y de señalización observados sobre el tejido adiposo:



Efectos metabólicos y de señalización observados sobre el tejido hepático:



Efectos metabólicos y de señalización observados sobre el músculo esquelético:



9 Índice de figuras

Figura 1. Sistemas implicados en el control de la homeostasis del crecimiento. Adaptado de [4]. Creada con Biorender.com.	23
Figura 2. Tablas de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud.	28
Figura 3. Esquema de los mecanismos implicados en el <i>catch-up fat</i> . Adaptado de [86] y [104]. Creado con Biorender.com.	40
Figura 4. Esquema del diseño experimental. Creado con Biorender.com.	64
Figura 5. Equipo de resonancia magnética nuclear. Imagen obtenida de la web de EchoMRI [3].	69
Figura 6. Test de agarre. Imagen obtenida de [2]	70
Figura 7. Equipo de calorimetría indirecta. Imagen obtenida de [1].	70
Figura 8 . A. Ingesta durante el período de restricción. Los datos se representan en Kcal por 100 gramos de peso corporal y por día. B. Peso corporal (gramos) durante el período de restricción. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). RR= Grupo restringido. NR= Grupo no restringido. * p<0.05 con respecto al grupo no restringido.	80
Figura 9. Peso corporal (gramos) durante el período de realimentación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo no restringido.	82
Figura 10. A. Longitud (mm) al final del período de realimentación. B. Incremento de la longitud (mm) durante el período de realimentación. C. Índice de masa corporal al final del período de realimentación. Los datos se representan como gramos de peso corporal entre longitud del animal al cuadrado. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico.	83
Figura 11. A. Ingesta durante el período de realimentación. Los datos se representan como las Kcal ingeridas entre 100 gramos de peso del animal y por día. B. Ingesta total durante el período de realimentación. Los datos se representan como las Kcal ingeridas entre 100 gramos de peso	

corporal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. . 84

Figura 12. Eficiencia alimenticia. Los datos se muestran como el incremento de peso corporal en gramos entre la ingesta total en Kcal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. 85

Figura 13. A. Grasa corporal (gramos). B. Masa magra corporal (Gramos). C. Porcentaje de grasa corporal (gramos) con respecto al peso del animal (gramos). D. Porcentaje de masa magra corporal (gramos) con respecto al peso del animal (gramos). E. Datos de proporción (%) de masa grasa, masa magra y hueso y otros. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 86

Figura 14. Pesos de diferentes depósitos grasos. Los datos se representan en gramos. A. Peso de grasa subcutánea. B. Peso de grasa visceral. C. Peso de grasa perirenal. D. Peso de grasa epididimal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 87

Figura 15. Pesos de diferentes músculos. los datos se representan en gramos. A. Peso del músculo *soleus*. B. Peso del músculo *tibialis*. C. Peso del músculo *gastrocnemius*. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. 88

Figura 16. Datos del test de fuerza. Los datos se representan como Newton por 100 g de peso corporal. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 89

Figura 17. Valores séricos de leptina. Los datos se representan como pg de leptina por mL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 89

Figura 18. A. Valores séricos de TNF α . Los datos se representan como pg de TNF α por mL de suero. B. Valores séricos de IL6. Los datos se representan como pg de IL6 por mL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC..... 90

Figura 19. A. Relación entre el peso de la mucosa y la longitud del intestino. Los datos se representan como gramos de mucosa por centímetros de intestino. B. Peso total del intestino (gramos). C. Peso total de la mucosa (gramos). Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC..... 91

Figura 20. A. Peso total del ciego. B. Peso del ciego vacío. C. Peso del contenido cecal. Todos los datos se representan en gramos. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC..... 92

Figura 21. A. Valores séricos de grelina. Los datos se representan como pg de grelina por mL de suero. B. Valores séricos de GLP-1. Los datos se representan como pg de GLP-1 por mL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC. 93

Figura 22. A. Gasto energético basal. Los datos se representan como kcal por hora y kg de peso. B. Cociente respiratorio (RQ). Los datos se representan como valores medios. C. Porcentaje de grasas y carbohidratos utilizados como combustible. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10) NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC. 94

Figura 23. A. Valores séricos de colesterol, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en mg de colesterol por dL de suero. B. Valores séricos de triglicéridos, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en mg de triglicéridos por dL de suero. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo

alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC..... 95

Figura 24. A. Valores séricos de glucosa, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en mg de glucosa por dL de suero. B. Valores séricos de insulina, en ayunas y 1 hora posprandial tras sondaje con las dietas experimentales. Los datos se representan en μg de insulina por litro de suero. C. Incremental de valores séricos de insulina desde el ayuno hasta 1 hora posprandial frente al mismo dato de glucosa. Los datos se representan como el cociente entre los valores incrementales de insulina y de glucosa tomando el tiempo en ayunas y 1 hora posprandial. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC..... 97

Figura 25. Expresión de transportadores de glucosa, GLUT 1 (A) y GLUT4 (B) en lisados de tejido adiposo determinados mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC. 98

Figura 26. Expresión de proteínas relacionadas con el uso energético de glucosa (y otros combustibles) en tejido adiposo. Expresión de PKM α (A), ATP5B (B), UCP1 (C) y UCP2 (D) en lisados de tejido adiposo determinadas mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC. 100

Figura 27. Expresión de piruvato carboxilasa (PC) (A) y ácido graso sintasa (AGS) (B) en lisados de tejido adiposo determinadas mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p<0.05$ con respecto al grupo RDC. 101

Figura 28. Expresión relativa de PPAR γ en lisados de tejido hepático determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método 2- Δ Ct usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC. 102

Figura 29. A. Expresión de GLUT2 en lisados de tejido hepático determinado mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. B. Concentración de glucógeno en tejido hepático. Los datos se representan como mg de glucógeno por gramo de proteína. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC..... 103

Figura 30. A y B. Expresión de PKM $\frac{1}{2}$ (A) y ATP5B (B) en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. C. Expresión de PDK4 en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. D. Expresión relativa de PDK4 en lisados de tejido hepático determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método 2- Δ Ct usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC. 104

Figura 31. Expresión de PC (A) y AGS (B) en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * p<0.05 con respecto al grupo RDC. 105

Figura 32. A. Activación de Akt en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína Akt. Expresión de ChREBP (B), SRBP1 (C) y SREBP2 (D) en lisados de tejido hepático determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10).

NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 106

Figura 33. Expresión de GLUT4 (A) y GLUT1 (B) en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 107

Figura 34. A. Activación de Akt en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína Akt. B. Concentración de glucógeno en músculo esquelético. Los datos se representan como mg de glucógeno por gramo de proteína. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 108

Figura 35. Expresión de PKM $\frac{1}{2}$ (A), ATP5B (B) y UCP2 (C) en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC..... 109

Figura 36. A. Expresión de MEF2D en lisados de músculo esquelético determinada mediante *Western blot*. Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. B. Actividad creatina quinasa. Los datos se representan como UI por gramo de proteína. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC. 110

Figura 37. A. Expresión relativa de PPAR δ en lisados de músculo esquelético determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) ($n=10$). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico.

SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.

.....	111
Figura 38. A. Expresión de PDK4 en lisados de músculo esquelético determinada mediante <i>Western blot</i> . Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. B y C. Expresión relativa de PDK4 (B) y Cpt1b (C) en lisados de músculo esquelético determinada por qPCR. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como gen de referencia interno. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.....	112
Figura 39. Expresión de ChREBP (A), SREBP1 (B) y SREBP2 (C) en lisados de músculo esquelético determinada mediante <i>Western blot</i> . Los datos se representan como intensidad relativa frente al control de carga de proteína GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) (n=10). NR= Grupo no restringido. RDC= Grupo alimentado con una dieta de alto índice glicémico. SDC= Grupo alimentado con una dieta de bajo índice glicémico. * $p < 0.05$ con respecto al grupo RDC.	113
Figura 40 . Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido adiposo. Elaboración propia a partir de [224, 231, 245, 267, 294]. Creado con Biorender.com.	135
Figura 41. Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido hepático. Elaboración propia a partir de [221, 298, 299, 303, 312]. Creada con Biorender.com.	141
Figura 42. Expresión génica, señalización y rutas metabólicas en el tejido muscular. Elaboración propia a partir de [68, 292, 296, 308, 322, 328, 331, 334]. Creado con Biorender.com.....	151

10 Índice de abreviaturas

AGS: Ácido graso sintasa.

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP. En inglés "AMP-activated protein kinase".

ATP: Adenosín trifosfato.

CK: Creatina quinasa.

ChREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos. En inglés "Carbohydrate-responsive element-binding protein".

DHA: Ácido docosohexaenoico.

ENT: Enfermedades no transmisibles.

FOS: Fructooligosacáridos.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GEB: Gasto energético basal.

GH: Hormona del crecimiento. En inglés "Growth hormone".

GLP-1: Péptido similar al glucagón-1. En inglés "glucagon-like peptide-1".

HOMA-IR: Evaluación del modelo de homeostasis-Resistencia a la insulina. En inglés "Homeostasis Model Assessment-Insulin resistance".

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1. En inglés “insulin-like growth factor 1”.

IL-6: Interleuquina 6.

IMC: Índice de masa corporal.

IMOs: Isomaltooligosacáridos.

MCP: Concentrado de proteína de leche. En inglés "Milk protein concentrate".

MD: Maltodextrina.

MEF2D: Factor potenciador específico de miocito 2D. En inglés “Myocyte enhancer factor 2D”.

NADPH: Nicotiamida-Adenina dinucleotido fosfato.

NR: No restringido.

OFA: Oncins France Strain A.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PC: Piruvato carboxilasa.

PDK4: Piruvato deshidrogenasa quinasa.

PEG: Pequeños para su edad gestacional.

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa.

PKM $\frac{1}{2}$: Piruvato quinasa.

PPAR: Receptores activados por proliferadores peroxisomales. En inglés "Peroxisome proliferator-activated receptor".

RDC: Carbohidratos de digestión rápida. En inglés "Rapid digestible carbohydrate".

RQ: Cociente respiratorio. En inglés "Respiration quote".

RR: Restringido.

SDC: Carbohidratos de digestión lenta. En inglés "Slowly digestible carbohydrate".

SEM: Error estándar de la media. En inglés "Standard error of the mean".

SREBP: Proteína de unión al elemento regulador del estero. En inglés "Sterol regulatory element-binding protein 1".

SS: Somatostatina.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia.

VCO $_2$: Producción de dióxido de carbono.

VO $_2$: Consumo de oxígeno.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Tse Systems. 2023 [cited 2023 09/11/2023]; Available from: <https://www.tse-systems.com/service/phenotype/>.
2. 주익, et al., *The Effect of Rat Resistance Ladder Climbing Exercise on Skeletal Muscle Hypertrophy*. 2014.
3. EchoMRI. *EchoMRI™-500 Body Composition Analyzer*. 2016 [cited 2023 04/11/2023]; Available from: http://www.echomri.com/Body_Composition_Rats_2MHz.aspx.
4. Dumbell, R., *An appetite for growth: The role of the hypothalamic–pituitary–growth hormone axis in energy balance*. *Journal of Neuroendocrinology*, 2022. **34**(6): p. e13133.
5. Singhal, A., *Long-Term Adverse Effects of Early Growth Acceleration or Catch-Up Growth*. *Ann Nutr Metab*, 2017. **70**(3): p. 236-240.
6. Balasundaram, P. and I.D. Avulakunta, *Human growth and development*. 2021.
7. Hernandez, A.G.D., *Tratado de nutricion/Nutrition Treatise: Bases Fisiologicas Y Bioquimicas De La Nutricion/Physiological and Biochemical Basis of Nutrition*. 2017: Ed. Médica Panamericana.
8. Martin, L. and J. Collin, *An introduction to growth and atypical growth in childhood and adolescence*. *Nurs Child Young People*, 2015. **27**(6): p. 29-37; quiz 38.
9. Martin, A., et al., *Health impact of catch-up growth in low-birth weight infants: systematic review, evidence appraisal, and meta-analysis*. *Matern Child Nutr*, 2017. **13**(1).
10. Inzaghi, E., et al., *The Effects of Nutrition on Linear Growth*. *Nutrients*, 2022. **14**(9): p. 1752.
11. Saxton, R.A., et al., *Structural insights into the mechanism of leptin receptor activation*. *Nature Communications*, 2023. **14**(1): p. 1797.
12. Arce, V., J. Tresguerres, and J. Devesa, *Hormona de crecimiento*. *FISIOLOGÍA HUMANA* 2000, 2000: p. 847.
13. Gat-Yablonski, G. and F. De Luca, *Effect of Nutrition on Statural Growth*. *Horm Res Paediatr*, 2017. **88**(1): p. 46-62.
14. Finkelstein, G.P., J.C. Lui, and J. Baron, *Catch-up growth: cellular and molecular mechanisms*. *Nutrition and Growth*, 2013. **106**: p. 100-104.
15. Millward, D.J., *Nutrition, infection and stunting: the roles of deficiencies of individual nutrients and foods, and of inflammation, as determinants of reduced linear growth of children*. *Nutrition research reviews*, 2017. **30**(1): p. 50-72.
16. Mameli, C., S. Mazzantini, and G.V. Zuccotti, *Nutrition in the First 1000 Days: The Origin of Childhood Obesity*. *Int J Environ Res Public Health*, 2016. **13**(9).

17. Agosti, M., et al., *Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life*. La Pediatria Medica e Chirurgica, 2017. **39**(2).
18. Rosenbloom, A.L., *Fisiología del crecimiento*. Annales Nestlé (Ed. española), 2007. **65**(3): p. 99-110.
19. Benyi, E. and L. Säwendahl, *The physiology of childhood growth: hormonal regulation*. Hormone research in paediatrics, 2017. **88**(1): p. 6-14.
20. Cameron, N. and L. Schell, *Human growth and development*. 2021: Academic Press.
21. Irwin, L.G., A. Siddiqi, and C. Hertzman, *The equalizing power of early child development: from the Commission on Social Determinants of Health to Action*. Child Health Educ, 2010. **1**(3): p. 146-161.
22. Rogol, A.D., P.A. Clark, and J.N. Roemmich, *Growth and pubertal development in children and adolescents: effects of diet and physical activity*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(2 Suppl): p. 521s-8s.
23. Rogol, A.D. and G.F. Hayden, *Etiologies and early diagnosis of short stature and growth failure in children and adolescents*. J Pediatr, 2014. **164**(5 Suppl): p. S1-14.e6.
24. *WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age*. Acta Paediatr Suppl, 2006. **450**: p. 76-85.
25. Hermanussen, M. and J.M. Wit, *How much nutrition for how much growth?* Hormone Research in Paediatrics, 2017. **88**(1): p. 38-45.
26. Manjarín, M., S. Vaccirca, and C.C. Ferrario, *Crecimiento y desarrollo*.
27. Joshi, P.K., et al., *Directional dominance on stature and cognition in diverse human populations*. Nature, 2015. **523**(7561): p. 459-462.
28. Delemarre-van de Waal, H.A., *Environmental factors influencing growth and pubertal development*. Environmental health perspectives, 1993. **101**(suppl 2): p. 39-44.
29. Gomez-Campos, R., et al., *Enfoque teórico del crecimiento físico de niños y adolescentes*. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética, 2016. **20**(3): p. 244-253.
30. Frisancho, A.R., *Developmental responses to high altitude hypoxia*. American Journal of Physical Anthropology, 1970. **32**(3): p. 401-407.
31. Cooper, D., *Evidence for and mechanisms of exercise modulation of growth--an overview*. Medicine and science in sports and exercise, 1994. **26**(6): p. 733-740.
32. Fudvoye, J. and A.-S. Parent. *Secular trends in growth*. in *Annales d'endocrinologie*. 2017. Elsevier.
33. Habicht, J.-P., et al., *Height and weight standards for preschool children: how relevant are ethnic differences in growth potential?* The Lancet, 1974. **303**(7858): p. 611-615.
34. Gomez-Campos, R., et al., *Theoretical approach of physical growth of children and adolescents*. Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica, 2016. **20**(3): p. 244-253.

35. Beluska-Turkan, K., et al., *Nutritional Gaps and Supplementation in the First 1000 Days*. Nutrients, 2019. **11**(12).
36. Tanner, J.M., *Growth as a measure of the nutritional and hygienic status of a population*. Hormone Research in Paediatrics, 1992. **38**(Suppl. 1): p. 106-115.
37. Pardo, S.B., *Fallo de medro*. PediatríaIntegral, 2015: p. 308.
38. Prendergast, A.J. and J.H. Humphrey, *The stunting syndrome in developing countries*. Paediatr Int Child Health, 2014. **34**(4): p. 250-65.
39. De Onis, M. and F. Branca, *Childhood stunting: a global perspective*. Maternal & child nutrition, 2016. **12**: p. 12-26.
40. Merino, A.B. and C.C. Romero, *Evaluación del niño con fallo de medro*. Protoc Diagn Pediatr, 2010. **9**: p. 89-97.
41. Labarta, J.I., et al., *Riesgo cardiovascular y metabólico en la infancia y adolescencia en el RN pequeño para la edad gestacional*. Rev Esp Endocrinol Pediatr, 2021. **12**(1): p. 4-12.
42. Pombo, M., L. Castro-Feijóo, and P. Cabanas Rodríguez, *El niño de talla baja*. Protoc diagn ter pediatr, 2011. **1**: p. 236-54.
43. Díez-López, I. and S.d.P.-E. Pediatría. *El niño pequeño para la edad gestacional (PEG): una entidad clínica relevante y en parte desconocida. 10 años de historia del Grupo de Trabajo PEG de la SEEP*. in CONFERENCIA PRÁCTICA. 2021.
44. Organization, W.H. *WHO recommendations for care of the preterm or low-birth-weight infant*. 2022 11/02/2023]; Available from: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/11/17/default-calendar/launch-of-the-who-recommendations-for-care-of-the-preterm-or-low-birth-weight-infant>.
45. Christian, P., et al., *Risk of childhood undernutrition related to small-for-gestational age and preterm birth in low-and middle-income countries*. International journal of epidemiology, 2013. **42**(5): p. 1340-1355.
46. Larson-Nath, C. and P. Goday, *Malnutrition in Children With Chronic Disease*. Nutr Clin Pract, 2019. **34**(3): p. 349-358.
47. Rytter, M.J., et al., *[Acute malnutrition in children]*. Ugeskr Laeger, 2017. **179**(20).
48. de la Salud, O.M., *Metas mundiales de nutrición 2025: documento normativo sobre retraso del crecimiento*. 2017.
49. King, C. and T. Davis, *Nutritional treatment of infants and children with faltering growth*. Eur J Clin Nutr, 2010. **64** Suppl 1: p. S11-3.
50. Lifshitz, F., *Nutrition and growth*. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2009. **1**(4): p. 157-63.
51. Poindexter, B., *Approaches to growth faltering*. Nutritional Care of Preterm Infants, 2014. **110**: p. 228-238.

52. Organization, W.H., *Levels and trends in child malnutrition: UNICEF*. 2021.
53. Bauer, H., [*Nephrotic syndrome and body growth*]. *Helv Paediatr Acta*, 1954. **9**(2): p. 127-34.
54. Prader, A., J.M. Tanner, and H.G. von, *Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man*. *J Pediatr*, 1963. **62**: p. 646-59.
55. de Wit, C.C., et al., *Patterns of catch-up growth*. *J Pediatr*, 2013. **162**(2): p. 415-20.
56. Tanner, J.M., *Catch-up growth in man*. *British Medical Bulletin*, 1981. **37**(3): p. 233-238.
57. Tanner, J.M. and J.M. Tanner, *Foetus into man: Physical growth from conception to maturity*. 1990: Harvard University Press.
58. Roselló-Díez, A. and A.L. Joyner, *Regulation of long bone growth in vertebrates; it is time to catch up*. *Endocrine Reviews*, 2015. **36**(6): p. 646-680.
59. Tanner, J., *Regulation of growth in size in mammals*. *Nature*, 1963. **199**(4896): p. 845-850.
60. Chang, M., et al., *Changes in cell-cycle kinetics responsible for limiting somatic growth in mice*. *Pediatr Res*, 2008. **64**(3): p. 240-5.
61. Lui, J.C., et al., *Coordinated postnatal down-regulation of multiple growth-promoting genes: evidence for a genetic program limiting organ growth*. *Faseb j*, 2010. **24**(8): p. 3083-92.
62. Forcinito, P., et al., *Growth-inhibiting conditions slow growth plate senescence*. *J Endocrinol*, 2011. **208**(1): p. 59-67.
63. Marino, R., et al., *Catch-up growth after hypothyroidism is caused by delayed growth plate senescence*. *Endocrinology*, 2008. **149**(4): p. 1820-1828.
64. Gafni, R.I., et al., *Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits*. *Pediatric research*, 2001. **50**(5): p. 618-623.
65. Finkelstein, G.P., et al., *An extensive genetic program occurring during postnatal growth in multiple tissues*. *Endocrinology*, 2009. **150**(4): p. 1791-800.
66. Pape, L., et al., *Superior long-term graft function and better growth of grafts in children receiving kidneys from paediatric compared with adult donors*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(9): p. 2596-600.
67. Crickmore, M.A. and R.S. Mann, *The control of size in animals: insights from selector genes*. *Bioessays*, 2008. **30**(9): p. 843-53.
68. Dulloo, A.G., *Regulation of fat storage via suppressed thermogenesis: a thrifty phenotype that predisposes individuals with catch-up growth to insulin resistance and obesity*. *Horm Res*, 2006. **65 Suppl 3**: p. 90-7.
69. Kay's, S. and P. Hindmarsh, *Catch-up growth: an overview*. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 2006. **3**(4): p. 365-378.

70. Durá-Travé, T., et al., *Catch-up growth and associated factors in very low birth weight infants*. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 2020. **93**(5): p. 282-288.
71. Ziegler, E.E., *Nutrient needs for catch-up growth in low-Birthweight infants*. *Low-Birthweight Baby: Born Too Soon or Too Small*, 2015. **81**: p. 135-143.
72. McCay, C.M., *Is longevity compatible with optimum growth?* *Science*, 1933. **77**(2000): p. 410-411.
73. Eid, E.E., *Follow-up study of physical growth of children who had excessive weight gain in first six months of life*. *Br Med J*, 1970. **2**(5701): p. 74-6.
74. Woo Baidal, J.A., et al., *Risk Factors for Childhood Obesity in the First 1,000 Days: A Systematic Review*. *Am J Prev Med*, 2016. **50**(6): p. 761-779.
75. Shi, H., et al., *Insights into infancy weight gain patterns for term small-for-gestational-age babies*. *Nutr J*, 2018. **17**(1): p. 97.
76. Stevens, A., et al., *Insights into the pathophysiology of catch-up compared with non-catch-up growth in children born small for gestational age: an integrated analysis of metabolic and transcriptomic data*. *Pharmacogenomics J*, 2014. **14**(4): p. 376-84.
77. Deng, H.Z., et al., *Association between height and weight catch-up growth with insulin resistance in pre-pubertal Chinese children born small for gestational age at two different ages*. *Eur J Pediatr*, 2011. **170**(1): p. 75-80.
78. Kohmura, Y.K., et al., *Association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment in utero*. *Reprod Sci*, 2013. **20**(7): p. 813-27.
79. Bol, V.V., et al., *Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **297**(2): p. R291-9.
80. Ong, K.K., et al., *Postnatal growth in preterm infants and later health outcomes: a systematic review*. *Acta paediatrica*, 2015. **104**(10): p. 974-986.
81. Durda-Masny, M., W. Stróżewska, and A. Szwed, *Catch-Up Growth as a Risk Factor for Rapid Weight Gain, Earlier Menarche and Earlier Pubertal Growth Spurt in Girls Born Small for Gestational Age (SGA)—A Longitudinal Study*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022. **19**(24): p. 16808.
82. Maeyama, K., et al., *Gestational age-dependency of height and body mass index trajectories during the first 3 years in Japanese small-for-gestational age children*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 38659.
83. Rolland-Cachera, M.F., et al., *Adiposity rebound in children: a simple indicator for predicting obesity*. *Am J Clin Nutr*, 1984. **39**(1): p. 129-35.
84. Rolland-Cachera, M.F., et al., *Early adiposity rebound: causes and consequences for obesity in children and adults*. *Int J Obes (Lond)*, 2006. **30 Suppl 4**: p. S11-7.

85. Kang, M.J., *The adiposity rebound in the 21st century children: meaning for what?* Korean J Pediatr, 2018. **61**(12): p. 375-380.
86. Dulloo, A.G., et al., *The thrifty 'catch-up fat' phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth trajectories to obesity and metabolic syndrome.* Int J Obes (Lond), 2006. **30 Suppl 4**: p. S23-35.
87. Eriksson, J.G., et al., *Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life.* Diabetologia, 2003. **46**(2): p. 190-4.
88. Arisaka, O., et al., *Childhood obesity: rapid weight gain in early childhood and subsequent cardiometabolic risk.* Clin Pediatr Endocrinol, 2020. **29**(4): p. 135-142.
89. Scheffler, C., M. Hermanussen, and A. Rogol, *Stunting: historical lessons that catch-up growth tells us for mapping growth restoration.* Arch Dis Child, 2020.
90. Chen, Y., et al., *The effects of rapid growth on body mass index and percent body fat: A meta-analysis.* Clin Nutr, 2020. **39**(11): p. 3262-3272.
91. Cutfield, W. and A. Ayyavoo, *The Auxological and Metabolic Consequences for Children Born Small for Gestational Age.* Indian J Pediatr, 2021. **88**(12): p. 1235-1240.
92. Dulloo, A.G., *Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(1): p. 155-71.
93. Dulloo, A.G., J. Jacquet, and J.P. Montani, *Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26 Suppl 2**: p. S46-57.
94. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.* Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
95. Stock, M.J., *Gluttony and thermogenesis revisited.* International journal of obesity, 1999. **23**(11): p. 1105-1117.
96. Levine, J.A., N.L. Eberhardt, and M.D. Jensen, *Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans.* Science, 1999. **283**(5399): p. 212-214.
97. Dulloo, A.G. and J. Jacquet, *Adaptive reduction in basal metabolic rate in response to food deprivation in humans: a role for feedback signals from fat stores.* The American journal of clinical nutrition, 1998. **68**(3): p. 599-606.
98. Keys, A., et al., *The biology of human starvation. (2 vols).* The biology of human starvation. (2 vols). 1950, Oxford, England: Univ. of Minnesota Press. xxxii, 1385-xxxii, 1385.
99. Dulloo, A. and J. Jacquet, *An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation.* International Journal of Obesity, 2001. **25**(5): p. S22-S29.
100. Crace, C., I. Swenne, and R. Milner, *Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe protein or energy malnutrition in young rats.* Upsala Journal of Medical Sciences, 1991. **96**(3): p. 177-183.

101. Ernsberger, P. and D.O. Nelson, *Refeeding hypertension in dietary obesity*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1988. **254**(1): p. R47-R55.
102. Jackson, A.A., *Nutrients, growth, and the development of programmed metabolic function*. Short and long term effects of breast feeding on child health, 2002: p. 41-55.
103. Crescenzo, R., et al., *A role for suppressed thermogenesis favoring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1090-7.
104. Casimir, M., et al., *A role for pancreatic beta-cell secretory hyperresponsiveness in catch-up growth hyperinsulinemia: Relevance to thrifty catch-up fat phenotype and risks for type 2 diabetes*. Nutr Metab (Lond), 2011. **8**(1): p. 2.
105. Friedman, J.M., *Leptin and the endocrine control of energy balance*. Nature Metabolism, 2019. **1**(8): p. 754-764.
106. Summermatter, S., et al., *Thrifty metabolism that favors fat storage after caloric restriction: a role for skeletal muscle phosphatidylinositol-3-kinase activity and AMP-activated protein kinase*. Faseb j, 2008. **22**(3): p. 774-85.
107. Hernández-Puga, G., et al., *La AMPK como diana terapéutica del síndrome metabólico*. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 2020. **58**(5): p. 612-621.
108. Trefts, E. and R.J. Shaw, *AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time*. Molecular Cell, 2021. **81**(18): p. 3677-3690.
109. Solinas, G., et al., *The direct effect of leptin on skeletal muscle thermogenesis is mediated by substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation*. FEBS letters, 2004. **577**(3): p. 539-544.
110. Crescenzo, R., et al., *Altered skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial compartment during catch-up fat after caloric restriction*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2286-2293.
111. Cettour-Rose, P., et al., *Redistribution of glucose from skeletal muscle to adipose tissue during catch-up fat: a link between catch-up growth and later metabolic syndrome*. Diabetes, 2005. **54**(3): p. 751-6.
112. Boyle, P., L. Storlien, and R. Keesey, *Increased efficiency of food utilization following weight loss*. Physiology & Behavior, 1978. **21**(2): p. 261-264.
113. Hill, J., S. Fried, and M. DiGirolamo, *Effects of fasting and restricted refeeding on utilization of ingested energy in rats*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1984. **247**(2): p. R318-R327.
114. Calonne, J., et al., *Low 24-hour core body temperature as a thrifty metabolic trait driving catch-up fat during weight regain after caloric restriction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019. **317**(4): p. E699-e709.
115. Kensara, O.A., et al., *Substrate-energy metabolism and metabolic risk factors for cardiovascular disease in relation to fetal growth and adult body composition*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(2): p. E365-71.

116. Eriksson, J.G., et al., *Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study*. Bmj, 1999. **318**(7181): p. 427-31.
117. Eriksson, J.G., *Early growth, and coronary heart disease and type 2 diabetes: experiences from the Helsinki Birth Cohort Studies*. Int J Obes (Lond), 2006. **30 Suppl 4**: p. S18-22.
118. Barker, D.J., et al., *Trajectories of growth among children who have coronary events as adults*. N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1802-9.
119. OMS., S.d.I.T., *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*. 2003: OMS (Organización Mundial de la Salud).
120. Wrottesley, S., C. Lamper, and P. Pisa, *Review of the importance of nutrition during the first 1000 days: maternal nutritional status and its associations with fetal growth and birth, neonatal and infant outcomes among African women*. Journal of developmental origins of health and disease, 2016. **7**(2): p. 144-162.
121. Marquis, G.S., et al., *Breast milk or animal-product foods improve linear growth of Peruvian toddlers consuming marginal diets*. Am J Clin Nutr, 1997. **66**(5): p. 1102-9.
122. Dror, D.K. and L.H. Allen, *The importance of milk and other animal-source foods for children in low-income countries*. Food Nutr Bull, 2011. **32**(3): p. 227-43.
123. Koletzko, B., et al., *Infant feeding and later obesity risk*. Adv Exp Med Biol, 2009. **646**: p. 15-29.
124. L Nelson, D. and M. M Cox, *LEHNINGER PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY FIFTH EDITION*. 2014.
125. Gopalan, C., et al., *Effect of calorie supplementation on growth of undernourished children*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1973. **26**(5): p. 563-566.
126. Kim, S.H., et al., *Selection of carbohydrate to protein ratio and correlations with weight gain and body fat in rats allowed three dietary choices*. Int J Vitam Nutr Res, 1991. **61**(2): p. 166-79.
127. Hoppe, C., et al., *Animal protein intake, serum insulin-like growth factor I, and growth in healthy 2.5-y-old Danish children*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(2): p. 447-52.
128. Larnkjær, A., C. Mølgaard, and K.F. Michaelsen, *Early nutrition impact on the insulin-like growth factor axis and later health consequences*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(3): p. 285-92.
129. Koletzko, B., et al., *Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(6): p. 1836-45.
130. Socha, P., et al., *Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial*. Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6 Suppl): p. 1776s-1784s.
131. Koletzko, B., et al., *Protein intake in the first year of life: a risk factor for later obesity? The EU childhood obesity project*. Early Nutrition and its Later Consequences: New Opportunities: Perinatal Programming of Adult Health—EC Supported Research, 2005: p. 69-79.

132. Koletzko, B., et al., *Can infant feeding choices modulate later obesity risk?* Am J Clin Nutr, 2009. **89**(5): p. 1502s-1508s.
133. Brands, B., H. Demmelmair, and B. Koletzko, *How growth due to infant nutrition influences obesity and later disease risk.* Acta Paediatr, 2014. **103**(6): p. 578-85.
134. Escribano, J., et al., *Effect of protein intake and weight gain velocity on body fat mass at 6 months of age: the EU Childhood Obesity Programme.* Int J Obes (Lond), 2012. **36**(4): p. 548-53.
135. Rolland-Cachera, M.F., *Rate of growth in early life: a predictor of later health?* Adv Exp Med Biol, 2005. **569**: p. 35-9.
136. Scaglioni, S., et al., *Early macronutrient intake and overweight at five years of age.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(6): p. 777-81.
137. Prentice, A.M. and A.A. Paul, *Fat and energy needs of children in developing countries.* The American journal of clinical nutrition, 2000. **72**(5): p. 1253s-1265s.
138. Butte, N.F., *Fat intake of children in relation to energy requirements.* The American journal of clinical nutrition, 2000. **72**(5): p. 1246s-1252s.
139. Blaxter, K., *Energy metabolism in animals and man.* 1989: CUP Archive.
140. Chen, L.-L., et al., *Lipid overaccumulation and drastic insulin resistance in adult catch-up growth rats induced by nutrition promotion after undernutrition.* Metabolism, 2011. **60**(4): p. 569-578.
141. Calonne, J., et al., *Countering impaired glucose homeostasis during catch-up growth with essential polyunsaturated fatty acids: is there a major role for improved insulin sensitivity?* Nutrition & diabetes, 2021. **11**(1): p. 1-11.
142. Sarda, F.A.H., et al., *Effectiveness of carbohydrates as a functional ingredient in glycemic control.* Food Science and Technology, 2018. **38**: p. 561-576.
143. Salud, O.M.d.I. *Enfermedades no transmisibles.* 2023; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.
144. Salud, O.M.d.I. *Diabetes.* 2023; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
145. Forbes, J.M. and M.E. Cooper, *Mechanisms of diabetic complications.* Physiological reviews, 2013. **93**(1): p. 137-188.
146. Ley, S.H., et al., *Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies.* The Lancet, 2014. **383**(9933): p. 1999-2007.
147. OOMdl, S., *Nota Informativa sobre la ingesta de azúcares recomendada en la directriz de la OMS para adultos y niños.* Nota Informativa. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud, Departamento de Nutrición para la Salud y el Desarrollo.
148. Joint, F., *Carbohydrates in human nutrition.* 1998.

149. EFSA Panel on Dietetic Products, N. and Allergies, *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the sugar replacers xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, lactitol, isomalt, erythritol, D-tagatose, isomaltulose, sucralose and polydextrose and maintenance of tooth mineralisation by decreasing tooth demineralisation (ID 463, 464, 563, 618, 647, 1182, 1591, 2907, 2921, 4300), and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 617, 619, 669, 1590, 1762, 2903, 2908, 2920) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*. EFSA Journal, 2011. **9**(4): p. 2076.
150. Livesey, G., *Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties*. Nutrition Research Reviews, 2003. **16**(2): p. 163-191.
151. Hofman, D.L., V.J. Van Buul, and F.J. Brouns, *Nutrition, health, and regulatory aspects of digestible maltodextrins*. Critical reviews in food science and nutrition, 2016. **56**(12): p. 2091-2100.
152. Menezes, E.W.d. and F.M. Lajolo, *Utilização do amido de leguminosas*. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 1997. **45**(1 (s)): p. 270-272.
153. Englyst, K., S. Liu, and H. Englyst, *Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates*. European journal of clinical nutrition, 2007. **61**(1): p. S19-S39.
154. Korczak, R. and J.L. Slavin, *Fructooligosaccharides and appetite*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2018. **21**(5): p. 377-380.
155. Weickert, M.O. and A.F. Pfeiffer, *Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes*. The Journal of nutrition, 2018. **148**(1): p. 7-12.
156. Astina, J. and S. Sapwarobol, *Resistant Maltodextrin and Metabolic Syndrome: A Review*. J Am Coll Nutr, 2019. **38**(4): p. 380-385.
157. Augustin, L.S., et al., *Glycemic index, glycemic load and glycemic response: an International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC)*. Nutrition, Metabolism and cardiovascular diseases, 2015. **25**(9): p. 795-815.
158. Jenkins, D.J., et al., *Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange*. The American journal of clinical nutrition, 1981. **34**(3): p. 362-366.
159. Brouns, F., et al., *Glycaemic index methodology*. Nutrition research reviews, 2005. **18**(1): p. 145-171.
160. Vlachos, D., et al., *Glycemic Index (GI) or glycemic load (GL) and dietary interventions for optimizing postprandial hyperglycemia in patients with T2 diabetes: A review*. Nutrients, 2020. **12**(6): p. 1561.
161. Esfahani, A., et al., *The glycemic index: physiological significance*. Journal of the American College of Nutrition, 2009. **28**(sup4): p. 439S-445S.
162. Menezes, E.W., et al., *In vitro colonic fermentation and glycemic response of different kinds of unripe banana flour*. Plant Foods for Human Nutrition, 2010. **65**: p. 379-385.
163. Vinoy, S., et al., *Cereal processing influences postprandial glucose metabolism as well as the GI effect*. Journal of the American College of Nutrition, 2013. **32**(2): p. 79-91.

164. Lina, B., D. Jonker, and G. Koziánowski, *Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies*. Food and Chemical Toxicology, 2002. **40**(10): p. 1375-1381.
165. Brunner, S., et al., *Metabolic effects of replacing sucrose by isomaltulose in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind trial*. Diabetes Care, 2012. **35**(6): p. 1249-51.
166. Holub, I., et al., *Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose™)*. British Journal of Nutrition, 2010. **103**(12): p. 1730-1737.
167. Salmerón, J., et al., *Dietary fiber, glycemic load, and risk of non—insulin-dependent diabetes mellitus in women*. Jama, 1997. **277**(6): p. 472-477.
168. Ludwig, D.S., *Glycemic load comes of age*. The Journal of Nutrition, 2003. **133**(9): p. 2695-2696.
169. Suissa, K., et al., *Effects of dietary glycemic index and load on children's cardiovascular risk factors*. Annals of Epidemiology, 2019. **40**: p. 1-7. e3.
170. Rouhani, M.H., A. Salehi-Abargouei, and L. Azadbakht, *Effect of glycemic index and glycemic load on energy intake in children*. Nutrition, 2013. **29**(9): p. 1100-1105.
171. Livesey, G., et al., *Dietary Glycemic Index and Load and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Updated Meta-Analyses of Prospective Cohort Studies*. Nutrients, 2019. **11**(6).
172. Brand-Miller, J. and A.E. Buyken, *The Relationship between Glycemic Index and Health*. Nutrients, 2020. **12**(2).
173. Buyken, A., et al., *Optimal dietary approaches for prevention of type 2 diabetes: a life-course perspective*. Diabetologia, 2010. **53**: p. 406-418.
174. Peres, M., et al., *The Health Effects of Low Glycemic Index and Low Glycemic Load Interventions on Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus: A Literature Review of RCTs*. Nutrients, 2023. **15**(24).
175. Wong, J.M. and D.J. Jenkins, *Carbohydrate digestibility and metabolic effects*. The Journal of nutrition, 2007. **137**(11): p. 2539S-2546S.
176. Wee, S.-L., et al., *Ingestion of a high-glycemic index meal increases muscle glycogen storage at rest but augments its utilization during subsequent exercise*. Journal of applied physiology, 2005. **99**(2): p. 707-714.
177. Tsintzas, K. and C. Williams, *Human muscle glycogen metabolism during exercise: effect of carbohydrate supplementation*. Sports Medicine, 1998. **25**: p. 7-23.
178. Suklaew, P., et al., *The effects of isomaltulose-based beverage on postprandial plasma glucose and lipid profiles in obese men*. Journal of Food Science and Agricultural Technology (JFAT), 2015. **1**: p. 36-39.
179. Stevenson, E.J., et al., *Influence of high-carbohydrate mixed meals with different glycemic indexes on substrate utilization during subsequent exercise in women*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **84**(2): p. 354-360.

180. Slavin, J.L., *Dietary fiber and body weight*. Nutrition, 2005. **21**(3): p. 411-8.
181. Chen, J.-P., et al., *Dietary fiber and metabolic syndrome: a meta-analysis and review of related mechanisms*. Nutrients, 2018. **10**(1): p. 24.
182. Li, S., et al., *NUTRIOSE dietary fiber supplementation improves insulin resistance and determinants of metabolic syndrome in overweight men: a double-blind, randomized, placebo-controlled study*. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2010. **35**(6): p. 773-782.
183. Aliasgharzadeh, A., et al., *Resistant dextrin, as a prebiotic, improves insulin resistance and inflammation in women with type 2 diabetes: a randomised controlled clinical trial*. British Journal of Nutrition, 2015. **113**(2): p. 321-330.
184. Hira, T., et al., *Resistant maltodextrin or fructooligosaccharides promotes GLP-1 production in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet, and partially reduces energy intake and adiposity*. Eur J Nutr, 2018. **57**(3): p. 965-979.
185. Blaak, E.E., et al., *Short chain fatty acids in human gut and metabolic health*. Benef Microbes, 2020. **11**(5): p. 411-455.
186. de Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 97-105.
187. Canfora, E.E., J.W. Jocken, and E.E. Blaak, *Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(10): p. 577-91.
188. Brennan, C.S., *Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes*. Molecular nutrition & food research, 2005. **49**(6): p. 560-570.
189. Livesey, G., *Tolerance of low-digestible carbohydrates: a general view*. British Journal of Nutrition, 2001. **85**(S1): p. S7-S16.
190. Slavin, J., *Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits*. Nutrients, 2013. **5**(4): p. 1417-1435.
191. Kumar, S.A., L.C. Ward, and L. Brown, *Inulin oligofructose attenuates metabolic syndrome in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats*. Br J Nutr, 2016. **116**(9): p. 1502-1511.
192. Granfeldt, Y., X. Wu, and I. Björck, *Determination of glycaemic index; some methodological aspects related to the analysis of carbohydrate load and characteristics of the previous evening meal*. European Journal of Clinical Nutrition, 2006. **60**(1): p. 104-112.
193. Vega-López, S., et al., *Postprandial lipid responses to standard carbohydrates used to determine glycaemic index values*. British journal of nutrition, 2013. **110**(10): p. 1782-1788.
194. Fleming, P. and M. Godwin, *Low-glycaemic index diets in the management of blood lipids: a systematic review and meta-analysis*. Family practice, 2013. **30**(5): p. 485-491.
195. Kubo, K., et al., *Combined Effects of a Dietary Fiber Mixture and Wheat Albumin in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus*. Journal of nutritional science and vitaminology, 2016. **62**(6): p. 416-424.

196. Martin, M.J., et al., *Feeding a slowly digestible carbohydrate diet during pregnancy of insulin-resistant rats prevents the excess of adipogenesis in their offspring*. J Nutr Biochem, 2018. **61**: p. 183-196.
197. Salto, R., et al., *Programming Skeletal Muscle Metabolic Flexibility in Offspring of Male Rats in Response to Maternal Consumption of Slow Digesting Carbohydrates during Pregnancy*. Nutrients, 2020. **12**(2).
198. Oberbach, A., et al., *Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(4): p. 895-900.
199. Friedman, S., et al., *Nutrition dwarfism: longitudinal analysis of anthropometric and metabolic parameters in rats*. Medicina, 1998. **58**(3): p. 282-286.
200. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey Jr, *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. 1993, Oxford University Press.
201. Khanna, D., et al., *Oral nutritional supplementation improves growth in children at malnutrition risk and with picky eating behaviors*. Nutrients, 2021. **13**(10): p. 3590.
202. Yang, Z.-D., et al., *Isomaltulose exhibits prebiotic activity, and modulates gut microbiota, the production of short chain fatty acids, and secondary bile acids in rats*. Molecules, 2021. **26**(9): p. 2464.
203. Grysman, A., T. Carlson, and T. Wolever, *Effects of sucromalt on postprandial responses in human subjects*. European journal of clinical nutrition, 2008. **62**(12): p. 1364-1371.
204. Ketabi, A., L. Dieleman, and M. Gänzle, *Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats*. Journal of applied microbiology, 2011. **110**(5): p. 1297-1306.
205. Rodríguez-Cabezas, M.E., et al., *The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats*. Clinical nutrition, 2010. **29**(6): p. 832-839.
206. Roberfroid, M., *Inulin-type fructans: functional food ingredients*. 2004: CRC Press.
207. Castro-Rodríguez, D.C., et al., *Strengths and validity of three methods for assessing rat body fat across the life course*. 2020, Nature Publishing Group.
208. McClave, S.A., et al., *Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry*. Journal of Parenteral and enteral Nutrition, 2003. **27**(1): p. 21-26.
209. Lusk, G. and E. Du Bois, *On the constancy of the basal metabolism*. The Journal of physiology, 1924. **59**(2-3): p. 213.
210. Even, P.C. and N.A. Nadkarni, *Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2012. **303**(5): p. R459-R476.
211. Ferrannini, E., *The theoretical bases of indirect calorimetry: a review*. Metabolism, 1988. **37**(3): p. 287-301.

212. Oshima, T., et al., *Indirect calorimetry in nutritional therapy. A position paper by the ICALIC study group*. Clinical nutrition, 2017. **36**(3): p. 651-662.
213. Haugen, H.A., L.N. Chan, and F. Li, *Indirect calorimetry: a practical guide for clinicians*. Nutrition in Clinical Practice, 2007. **22**(4): p. 377-388.
214. Smith, P.e., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
215. Chan, T.M. and J.H. Exton, *A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes*. Anal Biochem, 1976. **71**(1): p. 96-105.
216. Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. Proceedings of the Nutrition Society, 2001. **60**(3): p. 349-356.
217. Shaw, D., K. Gohil, and M.D. Basson, *Intestinal mucosal atrophy and adaptation*. World journal of gastroenterology: WJG, 2012. **18**(44): p. 6357.
218. Nauck, M.A. and J.J. Meier, *Incretin hormones: their role in health and disease*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2018. **20**: p. 5-21.
219. Jitrapakdee, S., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor- γ regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(29): p. 27466-27476.
220. Eissing, L., et al., *De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1528.
221. Linden, A.G., et al., *Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice [S]*. Journal of lipid research, 2018. **59**(3): p. 475-487.
222. Dessalle, K., et al., *SREBP-1 transcription factors regulate skeletal muscle cell size by controlling protein synthesis through myogenic regulatory factors*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50878.
223. Hargreaves, M. and L.L. Spriet, *Skeletal muscle energy metabolism during exercise*. Nat Metab, 2020. **2**(9): p. 817-828.
224. Marcelino, H., et al., *A role for adipose tissue de novo lipogenesis in glucose homeostasis during catch-up growth: a Randle cycle favoring fat storage*. Diabetes, 2013. **62**(2): p. 362-72.
225. Eleftheriades, M., et al., *Assessment of body composition in Wistar rat offspring by DXA in relation to prenatal and postnatal nutritional manipulation*. Pediatric Research, 2016. **80**(2): p. 319-325.
226. Jou, M.-Y., B. Lönnerdal, and I.J. Griffin, *Effects of early postnatal growth restriction and subsequent catch-up growth on body composition, insulin sensitivity, and behavior in neonatal rats*. Pediatric Research, 2013. **73**(5): p. 596-601.
227. Cani, P.D., et al., *Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1*. Obes Res, 2005. **13**(6): p. 1000-7.

228. Cani, P.D., et al., *Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study*. Eur J Clin Nutr, 2006. **60**(5): p. 567-72.
229. Thompson, S.V., et al., *Effects of isolated soluble fiber supplementation on body weight, glycemia, and insulinemia in adults with overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Am J Clin Nutr, 2017. **106**(6): p. 1514-1528.
230. Hume, M.P., A.C. Nicolucci, and R.A. Reimer, *Prebiotic supplementation improves appetite control in children with overweight and obesity: a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2017. **105**(4): p. 790-799.
231. Dulloo, A.G., *Adipose tissue plasticity in catch-up-growth trajectories to metabolic syndrome: hyperplastic versus hypertrophic catch-up fat*. Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1037-9.
232. Delcourt, M., et al., *Influence of Nutritional Intake of Carbohydrates on Mitochondrial Structure, Dynamics, and Functions during Adipogenesis*. Nutrients, 2020. **12**(10): p. 2984.
233. Cho, W.K. and B.-K. Suh, *Catch-up growth and catch-up fat in children born small for gestational age*. Korean journal of pediatrics, 2016. **59**(1): p. 1.
234. Zamanillo-Campos, R., et al., *Longitudinal association of dietary carbohydrate quality with visceral fat deposition and other adiposity indicators*. Clinical Nutrition, 2022. **41**(10): p. 2264-2274.
235. Demerath, E.W., et al., *Rapid postnatal weight gain and visceral adiposity in adulthood: the Fels Longitudinal Study*. Obesity, 2009. **17**(11): p. 2060-2066.
236. Mittal, B., *Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue*. The Indian journal of medical research, 2019. **149**(5): p. 571.
237. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Molecular and cellular endocrinology, 2010. **316**(2): p. 129-139.
238. Yadav, A., et al., *Role of leptin and adiponectin in insulin resistance*. Clinica chimica acta, 2013. **417**: p. 80-84.
239. Liu, J., et al., *The Leptin Resistance*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1090**: p. 145-163.
240. Jaquet, D., et al., *High serum leptin concentrations during catch-up growth of children born with intrauterine growth retardation*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999. **84**(6): p. 1949-1953.
241. Büyükgöbüz, B., et al., *Serum leptin concentrations in children with mild protein-energy malnutrition and catch-up growth*. Pediatrics international, 2004. **46**(5): p. 534-538.
242. Yazıcı, D. and H. Sezer, *Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 277-304.
243. Chait, A. and L.J. den Hartigh, *Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease*. Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 22.

244. Lumeng, C.N. and A.R. Saltiel, *Inflammatory links between obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2111-7.
245. Kojta, I., M. Chacińska, and A. Błachnio-Zabielska, *Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance*. Nutrients, 2020. **12**(5): p. 1305.
246. Lionetti, L., et al., *From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2009. **19**(2): p. 146-152.
247. Alzamil, H., *Elevated Serum TNF- α Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Associated with Glycemic Control and Insulin Resistance*. J Obes, 2020. **2020**: p. 5076858.
248. Stephens, J.M., J. Lee, and P.F. Pilch, *Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(2): p. 971-976.
249. Hernández, M.A.G., et al., *The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity*. Nutrients, 2019. **11**(8).
250. Den Besten, G., et al., *The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism*. Journal of lipid research, 2013. **54**(9): p. 2325-2340.
251. Jambunathan, L., D. Neuhoff, and M. Younoszai, *Intestinal disaccharidases in malnourished infant rats*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1981. **34**(9): p. 1879-1884.
252. Lykke, M., et al., *Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition*. American journal of translational research, 2013. **5**(5): p. 543.
253. Martínez-Oca, P., et al., *Gut DYSBIOSIS and altered barrier function precedes the appearance of metabolic syndrome in a rat model of nutrient-induced catch-up growth*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020. **81**: p. 108383.
254. Buchmiller-Crair, T.L., et al., *Delayed disaccharidase development in a rabbit model of intrauterine growth retardation*. Pediatric research, 2001. **50**(4): p. 520-524.
255. Kelly, P., *Starvation and its effects on the gut*. Advances in Nutrition, 2021. **12**(3): p. 897-903.
256. Wu, T., C.K. Rayner, and M. Horowitz, *Incretins*, in *Metabolic Control*. 2015, Springer. p. 137-171.
257. Steinert, R.E., et al., *Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY (3–36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB*. Physiological reviews, 2017. **97**(1): p. 411-463.
258. Østergaard, S., et al., *The design of a GLP-1/PYY dual acting agonist*. Angewandte Chemie International Edition, 2021. **60**(15): p. 8268-8275.
259. Horner, K. and S. Lee, *Appetite-related peptides in childhood and adolescence: role of ghrelin, PYY, and GLP-1*. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2015. **40**(11): p. 1089-1099.

260. Meeran, K., et al., *Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7–36) amide or exendin-(9–39) alters body weight in the rat*. *Endocrinology*, 1999. **140**(1): p. 244-250.
261. Crespo, M.A., et al., *Gastrointestinal hormones in food intake control*. *Endocrinol Nutr*, 2009. **56**(6): p. 317-330.
262. Hira, T., et al., *GLP-1 secretion in response to oral and luminal palatinose (isomaltulose) in rats*. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 2011. **57**(1): p. 30-35.
263. Ye, Z., et al., *Soluble dietary fiber (Fibersol-2) decreased hunger and increased satiety hormones in humans when ingested with a meal*. *Nutrition Research*, 2015. **35**(5): p. 393-400.
264. Parnell, J.A. and R.A. Reimer, *Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults*. *The American journal of clinical nutrition*, 2009. **89**(6): p. 1751-1759.
265. Shahkhalili, Y., et al., *The fat:carbohydrate energy ratio of the weaning diet programs later susceptibility to obesity in male sprague dawley rats*. *J Nutr*, 2011. **141**(1): p. 81-6.
266. Bickel, P.E., *Metabolic fuel selection: the importance of being flexible*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(11): p. 1547-9.
267. Summermatter, S., et al., *Adipose tissue plasticity during catch-up fat driven by thrifty metabolism: relevance for muscle-adipose glucose redistribution during catch-up growth*. *Diabetes*, 2009. **58**(10): p. 2228-37.
268. Smith, R.L., et al., *Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease*. *Endocr Rev*, 2018. **39**(4): p. 489-517.
269. Hoffman, D.J., et al., *Why are nutritionally stunted children at increased risk of obesity? Studies of metabolic rate and fat oxidation in shantytown children from Sao Paulo, Brazil*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **72**(3): p. 702-7.
270. Gillen, Z.M., et al., *Impact of slow versus rapid digesting carbohydrates on substrate oxidation in pre-pubertal children: A randomized crossover trial*. *Clinical Nutrition*, 2021. **40**(6): p. 3718-3728.
271. Banerji, M.A., et al., *Body composition, visceral fat, leptin, and insulin resistance in Asian Indian men*. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 1999. **84**(1): p. 137-144.
272. Lair, B., et al., *Novel Insights and Mechanisms of Lipotoxicity-Driven Insulin Resistance*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
273. Schade, D.S., L. Shey, and R.P. Eaton, *Cholesterol review: a metabolically important molecule*. *Endocrine Practice*, 2020. **26**(12): p. 1514-1523.
274. Ma, D., et al., *Effects of rapid growth on fasting insulin and insulin resistance: a system review and meta-analysis*. *Eur J Clin Nutr*, 2020.

275. Griesel, B.A., et al., *Acute inhibition of fatty acid import inhibits GLUT4 transcription in adipose tissue, but not skeletal or cardiac muscle tissue, partly through liver X receptor (LXR) signaling*. Diabetes, 2010. **59**(4): p. 800-7.
276. Nurjhan, N., A. Consoli, and J. Gerich, *Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1992. **89**(1): p. 169-75.
277. Alquraishi, M., et al., *Pyruvate kinase M2: a simple molecule with complex functions*. Free Radical Biology and Medicine, 2019. **143**: p. 176-192.
278. Gray, L.R., S.C. Tompkins, and E.B. Taylor, *Regulation of pyruvate metabolism and human disease*. Cellular and molecular life sciences, 2014. **71**(14): p. 2577-2604.
279. Jitrapakdee, S., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27466-76.
280. Jitrapakdee, S. and J.C. Wallace, *Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase*. Biochemical Journal, 1999. **340**(1): p. 1-16.
281. Ratner, C., et al., *Impaired oxidative capacity due to decreased CPT1b levels as a contributing factor to fat accumulation in obesity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2015. **308**(11): p. R973-82.
282. Mataix, J. and A. Gil, *Libro blanco de los omega-3*. Instituto omega-3. Granada, España: Ed. Puleva Food, 2004.
283. Lao-On, U., P.V. Attwood, and S. Jitrapakdee, *Roles of pyruvate carboxylase in human diseases: from diabetes to cancers and infection*. J Mol Med (Berl), 2018. **96**(3-4): p. 237-247.
284. Hillgartner, F.B., L.M. Salati, and A.G. Goodridge, *Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis*. Physiological reviews, 1995. **75**(1): p. 47-76.
285. Huan, J.-N., et al., *Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(46): p. 45638-45650.
286. Berndt, J., et al., *Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(7): p. 1472-80.
287. Karpe, F., J.R. Dickmann, and K.N. Frayn, *Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation*. Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2441-2449.
288. Blüher, M., et al., *Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 25-38.
289. Nolfi-Donagan, D., A. Braganza, and S. Shiva, *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement*. Redox Biol, 2020. **37**: p. 101674.

290. Yau, W.W. and P.M. Yen, *Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
291. Liu, J., et al., *The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus*. J Diabetes Res, 2013. **2013**: p. 585897.
292. Sugden, M.C., M.G. Zariwala, and M.J. Holness, *PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection*. Pharmacol Res, 2009. **60**(3): p. 141-50.
293. Dowell, R.D., *Transcription factor binding variation in the evolution of gene regulation*. Trends Genet, 2010. **26**(11): p. 468-75.
294. Marion-Letellier, R., G. Savoye, and S. Ghosh, *Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma*. Eur J Pharmacol, 2016. **785**: p. 44-49.
295. Hanson, R.W. and L. Reshef, *Glyceroneogenesis revisited*. Biochimie, 2003. **85**(12): p. 1199-205.
296. Dulloo, A.G. and S. Samec, *Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered*. Br J Nutr, 2001. **86**(2): p. 123-39.
297. Thorens, B., *GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis*. Diabetologia, 2015. **58**(2): p. 221-232.
298. Oosterveer, M.H. and K. Schoonjans, *Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(8): p. 1453-67.
299. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol, 2014. **4**(1): p. 177-97.
300. Jensen-Urstad, A.P. and C.F. Semenkovich, *Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?* Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(5): p. 747-53.
301. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(5): p. 1343-1351.
302. Bayley, J.P. and P. Devilee, *The Warburg effect in 2012*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(1): p. 62-7.
303. Uyeda, K. and J.J. Repa, *Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis*. Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 107-10.
304. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. Cell metabolism, 2008. **8**(3): p. 224-236.
305. Peterson, T.R., et al., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. Cell, 2011. **146**(3): p. 408-420.
306. Lam, Y.Y. and E. Ravussin, *Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity*. Eur J Clin Nutr, 2017. **71**(3): p. 318-322.

307. Jeon, J.H., et al., *Loss of metabolic flexibility as a result of overexpression of pyruvate dehydrogenase kinases in muscle, liver and the immune system: Therapeutic targets in metabolic diseases*. J Diabetes Investig, 2021. **12**(1): p. 21-31.
308. Zhang, S., et al., *The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility*. Nutr Metab (Lond), 2014. **11**(1): p. 10.
309. Woolbright, B.L., et al., *Metabolic Flexibility in Cancer: Targeting the Pyruvate Dehydrogenase Kinase:Pyruvate Dehydrogenase Axis*. Mol Cancer Ther, 2019. **18**(10): p. 1673-1681.
310. Nie, Y. and F. Luo, *Dietary fiber: An opportunity for a global control of hyperlipidemia*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021. **2021**.
311. Huang, W.-C., et al., *Inulin and fibersol-2 combined have hypolipidemic effects on high cholesterol diet-induced hyperlipidemia in hamsters*. Molecules, 2016. **21**(3): p. 313.
312. Agius, L., *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. Biochemical Journal, 2008. **414**(1): p. 1-18.
313. Ritze, Y., et al., *Effect of high sugar intake on glucose transporter and weight regulating hormones in mice and humans*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101702.
314. Esteves, J.V., F.J. Enguita, and U.F. Machado, *MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance*. J Diabetes Res, 2017. **2017**: p. 7267910.
315. Gatford, K.L., et al., *Exercise as an intervention to improve metabolic outcomes after intrauterine growth restriction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **306**(9): p. E999-1012.
316. Kanungo, S., et al., *Glycogen metabolism and glycogen storage disorders*. Ann Transl Med, 2018. **6**(24): p. 474.
317. Abdul-Ghani, M.A. and R.A. DeFronzo, *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 476279.
318. Ellingwood, S.S. and A. Cheng, *Biochemical and clinical aspects of glycogen storage diseases*. J Endocrinol, 2018. **238**(3): p. R131-r141.
319. Perseghin, G., *Pathogenesis of obesity and diabetes mellitus: insights provided by indirect calorimetry in humans*. Acta Diabetol, 2001. **38**(1): p. 7-21.
320. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-83.
321. Nordfors, L., et al., *Reduced gene expression of UCP2 but not UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects*. Diabetologia, 1998. **41**: p. 935-939.
322. McLeish, M.J. and G.L. Kenyon, *Relating structure to mechanism in creatine kinase*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2005. **40**(1): p. 1-20.

323. Malin, S.K., et al., *A whole-grain diet reduces peripheral insulin resistance and improves glucose kinetics in obese adults: A randomized-controlled trial*. Metabolism, 2018. **82**: p. 111-117.
324. Yamori Y, M.H., Mori M, Kashimura J, Sakamua T, Ishikawa PM, Moriguchi E, Moriguchi Y, *Japanese perspective on reduction in lifestyle disease risk in immigrant japanese brazilians: a double-blind, placebo-controlled intervention study on palatinose*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(S5-S7).
325. Oizumi T, D.M., Jimbu Y, Kameda W, Arawaka N, Yamaguchi H, Ohnuma H, Sasaki H, Kato T, *A palatinose-based balanced formula improves glucose tolerance, serum free fatty acid levels and body fat composition*. Tohoku J Exp Med 2007. **212**(2): p. 91-99.
326. Konig, D., et al., *Postprandial substrate use in overweight subjects with the metabolic syndrome after isomaltulose (Palatinose) ingestion*. Nutrition, 2012. **28**(6): p. 651-6.
327. Corpeleijn, E., W.H. Saris, and E.E. Blaak, *Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle*. Obes Rev, 2009. **10**(2): p. 178-93.
328. Fan, W., et al., *PPAR δ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose*. Cell Metab, 2017. **25**(5): p. 1186-1193.e4.
329. Nakamura, M.T., B.E. Yudell, and J.J. Loor, *Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids*. Prog Lipid Res, 2014. **53**: p. 124-44.
330. Holness, M. and M. Sugden, *Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation*. Biochemical Society Transactions, 2003. **31**(6): p. 1143-1151.
331. Reilly, S.M. and C.H. Lee, *PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 26-31.
332. Park, E.A., et al., *Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I*. Biochemical Journal, 1995. **310**(3): p. 853-858.
333. Richards, P., et al., *MondoA/ChREBP: The usual suspects of transcriptional glucose sensing; Implication in pathophysiology*. Metabolism, 2017. **70**: p. 133-151.
334. Ahn, B., et al., *MondoA coordinately regulates skeletal myocyte lipid homeostasis and insulin signaling*. J Clin Invest, 2016. **126**(9): p. 3567-79.
335. Song, Z., et al., *Glucose-sensing transcription factor mondoa/ChREBP as targets for type 2 diabetes: Opportunities and challenges*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(20): p. 5132.
336. Filhoulaud, G., et al., *Novel insights into ChREBP regulation and function*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2013. **24**(5): p. 257-268.
337. Aziz, A., Q.C. Liu, and F.J. Dilworth, *Regulating a master regulator: establishing tissue-specific gene expression in skeletal muscle*. Epigenetics, 2010. **5**(8): p. 691-5.

- 338. Runfola, V., et al., *Rbfox proteins regulate tissue-specific alternative splicing of Mef2D required for muscle differentiation*. J Cell Sci, 2015. **128**(4): p. 631-7.
- 339. Wang, Y.-X., et al., *Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity*. Cell, 2003. **113**(2): p. 159-170.
- 340. Tanaka, T., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(26): p. 15924-15929.
- 341. Dressel, U., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor δ /agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells*. Molecular endocrinology, 2003. **17**(12): p. 2477-2493.

