

TESIS DOCTORAL

**Contribución al control de alteraciones
relacionadas con la obesidad mediante
tratamiento combinado de dieta, ejercicio físico
y un inhibidor de la ingesta en un modelo
experimental animal de obesidad inducida por la
dieta**



TÍTULO: Contribución al control de alteraciones relacionadas con la obesidad mediante tratamiento combinado de dieta, ejercicio físico y un inhibidor de la ingesta en un modelo experimental animal de obesidad inducida por la dieta

Departamento de Fisiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Programa de doctorado:

Nutrición y Ciencias de los Alimentos

Doctoranda: Luisa María López Trinidad

Bajo la dirección de los doctores:

Jesús María Porres Foulquie

María López Jurado Romero de la Cruz

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Luisa María López Trinidad
ISBN: 978-84-1117-198-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72321>



MEMORIA QUE PRESENTA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN
NUTRICIÓN HUMANA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA
LA GRADUADA

D^a. LUISA MARÍA LÓPEZ TRINIDAD

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra. María López-Jurado Romero de la Cruz

Prof. Dr. Jesús María Porres Foulquie

Graduada Luisa María López Trinidad

Aspirante al Grado de Doctor

Granada, 24 de Septiembre de 2021

ESTA TESIS DOCTORAL ESTÁ INCLUIDA DENTRO DEL
PROYECTO DEL PLAN NACIONAL DE I+D (CONTRIBUCIÓN AL
CONTROL DEL SINDROME METABÓLICO Y POSTERIOR
MANTENIMIENTO DEL PESO CON UN PROGRAMA DE DIETA,
EJERCICIO FÍSICO AERÓBICO Y UN INHIBIDOR DE INGESTA
EN RATAS) **REF. DEP2014-58296-R.**

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 Obesidad.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Epidemiología de la obesidad.....	1
1.1.3 Etiología.....	3
1.1.4 Morbilidad.....	9
1.1.5 Tejido adiposo como órgano endocrino.....	11
1.1.6 Obesidad y alteraciones hepáticas.....	14
1.1.6.1 Definición.....	14
1.1.6.2 Prevalencia.....	14
1.1.6.3 Fisiopatología de NAFLD.....	15
1.1.6.4 Estrés oxidativo en la esteatosis hepática.....	21
1.1.7 Obesidad y alteraciones cardiovasculares.....	22
1.1.7.1 Prevalencia.....	23
1.1.7.2 Fisiopatología cardiovascular.....	24
1.1.8 Obesidad y alteraciones renales.....	27
1.1.8.1 Definición.....	28
1.1.8.2 Prevalencia.....	29
1.1.8.3 Fisiopatología de la obesidad.....	29
1.1.8.4 El estrés oxidativo en el daño renal.....	36
1.1.9 Marcadores de funcionalidad hepática cardiovascular y renal.....	38
1.1.9.1 Marcadores de funcionalidad hepática.....	39
1.1.9.2 Marcadores de funcionalidad cardiovascular.....	42
1.1.9.3 Marcadores de funcionalidad renal.....	45
1.1.10 Síndrome Metabólico.....	49
1.1.10.1 definición y bases para el diagnóstico.....	50
1.1.10.2 prevalencia.....	51
1.1.10.3 fisiopatología.....	51
1.2 Tratamiento de la obesidad.....	52
1.2.1 Tratamiento no farmacológico.....	52
1.2.1.1 Restricción calórica.....	53
1.2.1.2 Ejercicio físico.....	54
1.2.2 Tratamiento farmacológico.....	57
1.2.2.1 Inhibidores de la ingesta.....	58
1.2.2.2 Otros medicamentos.....	60
1.2.3 Cirugía.....	61
1.3 Modelos experimentales de obesidad.....	63
1.3.1 Obesidad inducida por la dieta.....	63
1.3.2 Obesidad por alteración genética.....	65

2. OBJETIVOS.....	67
2.1 Objetivo general	67
2.2 Objetivos específicos	67
3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1 Experimentos con animales	69
3.2 Diseño experimental y dietas	69
3.3 Ingesta y peso corporal	73
3.4 Protocolo de entrenamiento	73
3.5 Metabolismo basal y capacidad aeróbica	74
3.6 Administración intraperitoneal de AM251	76
3.7 Análisis de sangre, plasma y orina	76
3.8 Electrocardiograma	77
3.9 Determinación de grasa total y perfil de ácidos grasos del hígado	77
3.9.1 Contenido total de lípidos hepáticos	77
3.9.2 Perfil de ácidos grasos del hígado	78
3.10 Actividad antioxidante del hígado y riñón, ensayos de peroxidación lipídica	78
3.10.1 Homogeneizados de tejidos	78
3.10.2 Determinación de la concentración de proteína	79
3.11 Actividad enzimática superóxido dismutasa	80
3.12 Actividad enzimática glutatión peroxidasa	81
3.13 Actividad enzimática catalasa	82
3.14 Peroxidación lipídica TBARS en hígado y riñón	83
3.15 Extracción de RNA y RTq-PCR	84
3.16 Tratamiento estadístico	86
4. RESULTADOS	87
4.1 Ingesta calórica y peso corporal	87
4.2 Expresión génica en hipotálamo de transcritos relacionados con la ingesta de alimento y balance energético	91
4.3 Capacidad aeróbica y parámetros de condición física	94
4.4 Perfil glucémico y área bajo la curva	96
4.5 Peso del hígado, contenido de grasa hepática, perfil de ácidos grasos y expresión génica de enzimas lipogénicas y lipolíticas	98
4.5.1 Peso del hígado y contenido de grasa hepática	98
4.5.2 Perfil hepático de ácidos grasos	99
4.5.3 Expresión de genes hepáticos de enzimas lipogénicas y lipolíticas.....	100
4.6 Funcionalidad cardiovascular: ECG y expresión génica en aorta	105
4.7 Parámetros plasmáticos de funcionalidad cardiovascular y renal	111
4.8 Parámetros urinarios de funcionalidad renal	112
4.9 Capacidad antioxidante en hígado y riñón	113
5. DISCUSIÓN	119
5.1 Ingesta calórica y cambios ponderales	119
5.2 Resistencia a la insulina y perfil glucémico	121

5.3	Efecto sobre función cardiovascular	123
5.4	Efecto sobre la función renal	124
5.5	Efecto sobre el hígado	126
6.	CONCLUSIONES	130
7.	BIBLIOGRAFÍA	134
8.	ANEXOS	156

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGL: Ácidos grasos libres en plasma

AGP: Ácidos grasos poliinsaturados

ALP: Fosfatasa alcalina

ALT: Alanina aminotransferasa

AMP: Adenosin monofosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

AP: Activador de proteínas

Apo-B: Apolipoproteína B

ARN: Ácido ribonucleico

ASCVD: Enfermedad cardiovascular aterosclerótica

AST: Aspartato aminotransferasa

ATP: Adenosin trifosfato

CAT: Catalasa

CB1: Receptor cannabinoide

CC: Cintura cadera

CIC: Centro de instrumentación científica

CK-MB: Creatina quinasa MB

CRP: Proteína C- reactiva

CV: Cardiovascular

DHA: Ácido decosaheptanoico

DM: Diabetes mellitus

EC: Endocannabinoide

ECG: Electrocardiograma

ECV: Enfermedad cardiovascular

EDTA: Ácido etileno diamino tetra acético

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

EO: Estrés oxidativo

ER: Enfermedad renal

ERC: Enfermedad renal crónica

ERCT: Enfermedad renal crónica Terminal

FAME: Análisis de éster metílico de ácidos grasos

FDA: Administración de medicamentos y Alimentos

FG: Filtración glomerular

FRV: Factores de Riesgo Vascular

GABA: Ácido gamma aminobutírico

GALT: Tejido linfoide asociado a intestino

GGT: Gamma- glutamil-transferasa

GLUT: Transportador de glucosa

GPC-DxTxSOE: Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y obesidad exógena.

GPX: Glutation peroxidasa

GSSG: Glutation disulfuro

HC: Hepatocarcinoma

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HFD: Dieta alta en grasas

HIIT: Entrenamiento interválico de alta intensidad

HNE: 4 Hidroxil – 2 Nonenal

HTA: Hipertensión arterial.

IEFS: Institute of European Foods Studies

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

ISAO: Asociación Internacional para el estudio de la Obesidad

JNK: Quinasas C- Jun N- terminal

KDIGO: Kidney Disease- Improving Global Outcomes

KO: Knowckout

KSCN: Tiocianato de potasio

LD: Lactato deshidrogenasa

LHA: Longitud hocico-ano

MDA: Malondialdéhido

MSH: Hormona Estimulante de Melanocitos

NAD: Neuropatía autonómica diabética

NADPH: Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato

NALFD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

NF-KB: Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: Óxido Nítrico

NPY: Neuropeptido Y

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno

PAI-1: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno

POMC: Proopiomelanocortina

PTH: Parathormona

PTS: Parque Tecnológico de la Salud

RE: Retículo endoplásmico

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SD: Sprague Dawley

SEEDO: Sociedad Española de Obesidad

SMet: Síndrome metabólico

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

SRAA: Sistema Renina- Angiotensina- Aldosterona.

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TFG: Tasa de filtrado glomerular

TG: Triglicéridos

TNF α : Factor de necrosis tumoral

TP: Tiempo de protrombina

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VSG: Velocidad de sedimentación globular

γ -GT: Glutamil transferasa

INTRODUCCIÓN OBJETIVOS Y PRINCIPALES RESULTADOS

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que aumenta el riesgo de desarrollar múltiples patologías. Conducen a efectos metabólicos adversos sobre la presión arterial, el colesterol, los triglicéridos y la resistencia a la insulina. Esta recopilación de factores se conoce como síndrome metabólico (MetS)¹, que está directamente relacionado con la enfermedad cardiovascular y la alteración de otras funciones vitales, como la función renal o la hepática. El sobrepeso, la obesidad y las enfermedades relacionadas se pueden prevenir en gran medida. Dado que todos sus componentes son reversibles, el diagnóstico temprano y las estrategias de intervención en el estilo de vida del MetS ofrecen un enfoque de tratamiento eficaz, dirigido principalmente al control del peso ².

El control y mantenimiento del peso corporal a un nivel estable se consigue cuando existe un equilibrio entre la ingesta alimentaria y el gasto energético. Un complejo sistema de control fisiológico interviene en el mantenimiento del equilibrio energético en este se incluyen múltiples interacciones como el tracto gastrointestinal, el tejido adiposo y el sistema nervioso central, influenciado por mecanismos conductuales, sensoriales, autónomos, nutricionales y endocrinos ³. Tras la pérdida de peso, otro tema importante para los sujetos que completan un programa de pérdida de peso es evitar el efecto rebote posterior a la intervención. Se requiere un abordaje multidisciplinar que incluya modificaciones del estilo de vida ⁴ y, en algunos casos, el refuerzo con tratamiento farmacológico. En relación con las intervenciones en el estilo de vida, la dieta y el ejercicio físico suponen dos aspectos fundamentales contribuyendo a generar un balance energético negativo, facilitando así la pérdida de peso y evitando el efecto rebote y posterior recuperación del peso corporal ⁵. Está bien establecido que diferentes protocolos de entrenamiento inducen cambios en una variedad de mecanismos moleculares involucrados en numerosas vías intracelulares relacionadas con el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la inflamación o el estado antioxidante⁶.

En ocasiones se hace preciso la prescripción de un agente farmacológico apropiado como coadyuvancia de los estilos de vida en el control del efecto rebote. El sistema endocannabinoide (ECS) juega un papel crítico en el desarrollo de la obesidad tanto en funciones centrales como periféricas relacionadas con el metabolismo energético⁷. A nivel central, los endocannabinoides actúan como neuromoduladores retrógrados de la plasticidad sináptica y participan en muchos procesos fisiológicos que incluyen la regulación del dolor, el aprendizaje y la memoria, el apetito y la ingesta de alimentos, la lipogénesis y los antojos ⁸. A nivel periférico, los endocannabinoides ejercen una acción tónica sobre la lipogénesis y la acumulación de grasa. Por lo tanto, el bloqueo de CB1 puede resultar en una disminución de la masa grasa independiente de la ingesta de alimentos a través de la lipólisis ⁹.

En los últimos años, el descubrimiento de un sistema endocannabinoide expandido, el endocannabinoidoma, que incluye varios mediadores que están relacionados bioquímicamente con los endocannabinoides y sus receptores y enzimas metabólicas, ha corroborado su complejidad y ampliado el potencial para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar múltiples patologías relacionadas que incluyen alteraciones neurológicas, inflamatorias o metabólicas ¹⁰.

El objetivo de esta tesis doctoral fue diseñar estrategias combinadas de pérdida de peso, restricción calórica, ejercicio físico y administración de un bloqueante del receptor CB1 para inhibir la ingesta de alimentos que también logren los objetivos de mantener la pérdida de peso y mejorar la función hepática, cardiovascular y renal. Se generó obesidad inducida por la dieta (DIO) en ratas Sprague Dawley durante 12 semanas para probar los efectos de estrategias únicas o combinadas (es decir, restricción calórica, protocolo de entrenamiento mixto y / o administración de supresores del apetito) sobre la ingesta calórica, el peso corporal, y funcionalidad renal resultante de un período de intervención para la pérdida de peso de 3 semanas seguido de 6 semanas de mantenimiento del peso. El consumo de una dieta alta en grasas (DFH) provocó un aumento significativo del peso corporal (5^a semana del período experimental) y condujo al desarrollo de resistencia a la insulina, alteraciones cardiovasculares y renales. Las diferentes intervenciones ensayadas, resultaron en una importante pérdida de peso corporal y mejora del metabolismo de la glucosa, capacidad aeróbica, parámetros electrocardiográficos, expresión

vascular de moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios, y funcionalidad renal, alcanzando valores similares al grupo control normocalórico o incluso mejorándolos. El mantenimiento exitoso del peso perdido se logró a lo largo de un período de mantenimiento de 6 semanas, además de un estado de salud adecuado. En conclusión, las estrategias de intervención ensayadas para la pérdida y mantenimiento del peso corporal fueron eficaces para revertir las alteraciones relacionadas con la obesidad en el peso corporal, el metabolismo de la glucosa, la capacidad aeróbica, la funcionalidad cardiovascular y renal. La acción beneficiosa fue muy consistente para la restricción calórica y el ejercicio físico, mientras que la administración de un bloqueador de los receptores CB1 complementó los efectos de las intervenciones previas en algunos parámetros como el peso corporal o la capacidad aeróbica, y mostró acciones específicas en el estado renal, aumentando la tasa de filtración glomerular y diuresis. En general, la novedad de nuestro estudio se basa en la fácil implementación de estrategias combinadas para el control eficaz del peso que resultaron en importantes beneficios para la salud.

Palabras clave: obesidad, dieta alta en grasa, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, restricción calórica, ejercicio físico, rata Sprague Dawley.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Obesidad

1.1.1 Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define la obesidad y el sobrepeso como una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo que puede ser perjudicial para la salud. Esta obesidad se va a medir clínicamente mediante el uso de un índice de masa corporal (IMC), el cual relaciona el peso con la talla del paciente, teniendo como unidades de medida Kg/m^2 ¹¹. Se habla de sobrepeso cuando encontramos el IMC entre 25 y 29,9 Kg/m^2 y de obesidad cuando este índice sea mayor a 30 Kg/m^2 . Por otro lado, también es posible determinar obesidad mediante el cálculo de porcentaje de grasa corporal. Se hablará de obesidad cuando encontremos una presencia de tejido graso del 25% o más en varones y en el caso de las mujeres cuando la presencia de grasa corporal sea de un 35% para la determinación de estos porcentajes es de utilidad la bioimpedancia eléctrica o la medición del pliegue cutáneo., entre otros métodos. La influencia de los efectos negativos que produce la obesidad se encuentra estrechamente relacionada con la cantidad de grasa visceral que se encuentre en el individuo, por eso se mide también el perímetro abdominal de los pacientes. Se considera obesidad en hombres un perímetro de 102 cm y 88 cm en mujeres o bien una proporción de cintura/cadera superior a 0,9 en hombres y 0,85 en mujeres ¹².

1.1.2 Epidemiología de la obesidad.

La obesidad es considerada una pandemia global, que ha presentado un aumento exponencial en los últimos años, siendo uno de los problemas de salud más prevalentes en los países desarrollados y en vías de desarrollo con un 39% de sobrepeso y 13% de obesidad en la población mundial adulta en 2016 ¹³.

✓ A nivel mundial

Cada año mueren, como mínimo, 2,8 millones de personas a causa de la obesidad o sobrepeso. Aunque anteriormente se consideraba un problema circunscrito a los países de altos ingresos, en la actualidad la obesidad también es prevalente en los países de ingresos bajos y medianos ¹⁴. Desde 1980 la obesidad se ha duplicado en todo el mundo, llegando en el año 2014 a más de 1 900 millones de adultos mayores de 18 años con sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones con obesidad, lo que implica una prevalencia en adultos mayores de 18 años de 39% de sobrepeso y 13% de obesidad. De mantenerse la tendencia, para el año 2030 más de 40% de la población del planeta tendrá sobrepeso y más de la quinta parte será obesa ¹³.

✓ Europa

En Europa la tendencia ha sido similar, observándose niveles crecientes en la prevalencia de obesidad en los diferentes países en el período comprendido entre 1975 y 2005¹⁵. Los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad (IASO) muestran que más del 50% de la población adulta en la Unión Europea sufre actualmente sobrepeso u obesidad, lo que indica que el número de personas obesas se ha triplicado en las últimas dos décadas ¹⁶. Los resultados sobre la prevalencia de obesidad obtenidos en el estudio de Institute of European Foods Studies (IEFS) varían según su distribución geográfica. El reino Unido muestra la mayor prevalencia de obesidad (12%), seguido de España (11%), siendo la menor en Italia, Francia y Suecia (7%). Considerando juntos obesidad y sobrepeso, la mayor prevalencia combinada de ambos se observó en España, Alemania y Grecia ¹⁷.

✓ España

La prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en España es alta, aunque su distribución es desigual entre las distintas comunidades autónomas tal y como se muestra en la (Figura1). Una comparación con datos anteriores revela un gran aumento en el sobrepeso, que parece haberse estabilizado, según estimaciones recientes ¹². Continúa aumentando la obesidad en España, que afecta ya al 17,4% de

la población adulta (18 y más años). Considerando la obesidad y el sobrepeso conjuntamente, más de la mitad (54,5%) de los adultos tiene exceso de peso. En los últimos 30 años la prevalencia de obesidad en adultos se ha multiplicado por 2,4, del 7,4% en 1987 al 17,4% en 2017. La obesidad es más frecuente en hombres (18,2%) que en mujeres (16,7%). La diferencia por sexo y edad en adultos aparece en los menores de 65 años, superando las mujeres a los hombres a partir de esa edad. El sobrepeso, al igual que la obesidad, es más frecuente en hombres, pero la diferencia es mucho mayor (44,3% hombres vs 30% mujeres) y se mantiene en todos los grupos de edad ¹².

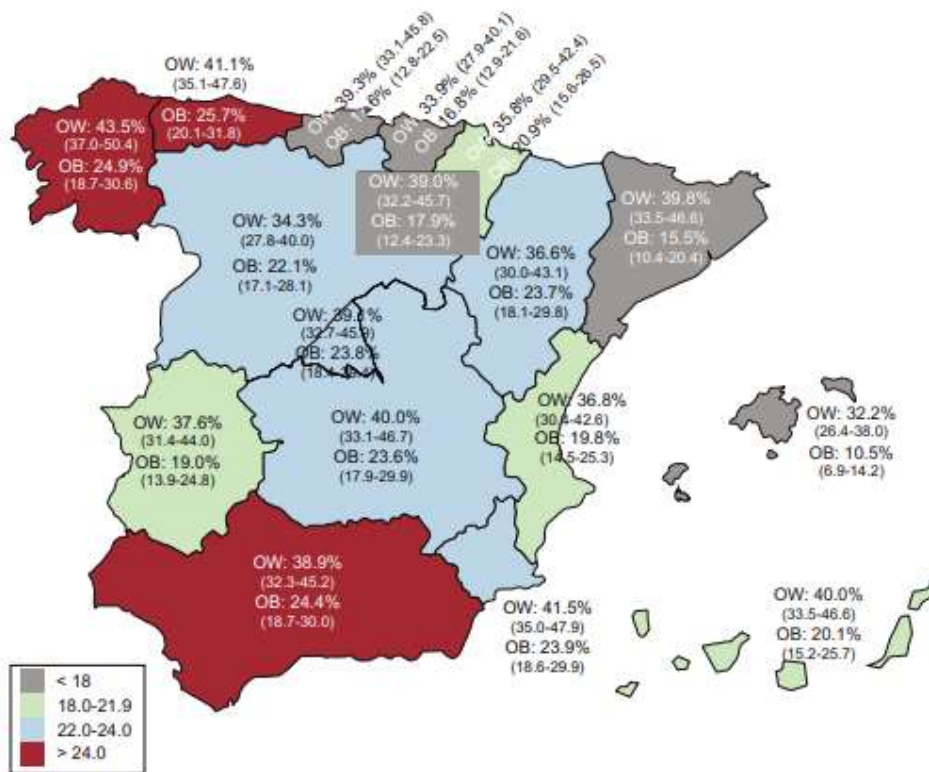


Figura 1.- Prevalencia de Obesidad en España ¹².

1.1.3 Etiología

La obesidad es una enfermedad heterogénea y compleja que afecta cada día a un mayor número de individuos, primordialmente de los países desarrollados. Se caracteriza por un acumulo excesivo de grasa corporal que a menudo supera el 20

% del peso corporal ¹⁸. Las causas de la obesidad se deben a una relación compleja entre factores genéticos y la influencia del ambiente y las conductas del individuo.

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, debido a un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico que son ricos en grasa y un descenso en la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización ¹⁴.

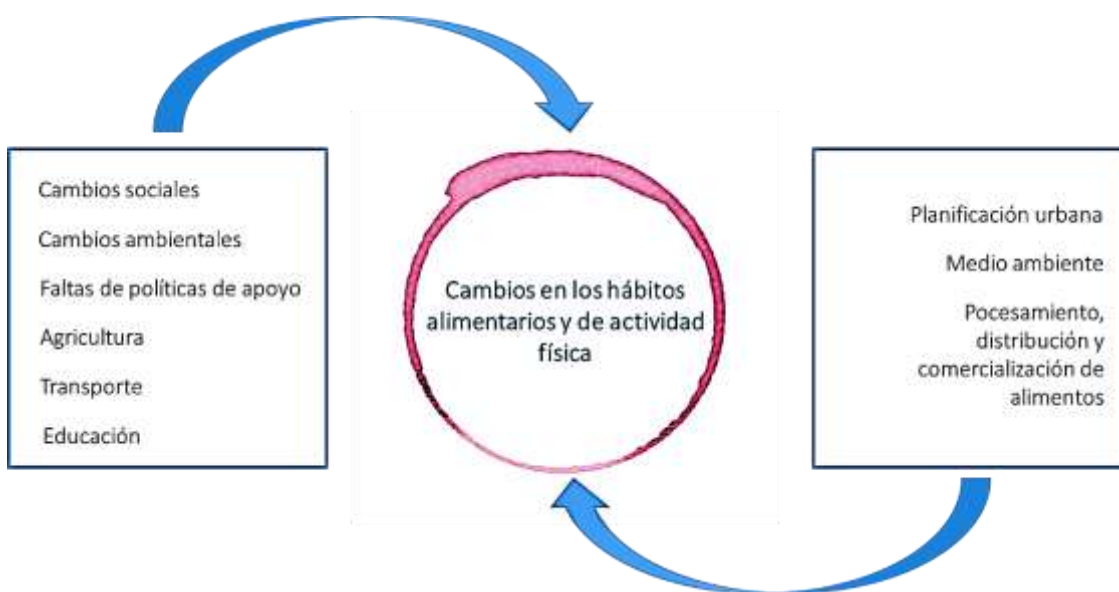


Figura 2.- Causas de la obesidad. Genéticas, nutricionales, socioeconómicas y psicológicas ¹⁴.

✓ Causas Genéticas

Las causas genéticas de la obesidad se van a deber a recombinaciones o mutaciones del material genético, que se producen por una alteración de una base, causada por una sustitución, inserción o eliminación de uno o varios nucleótidos, produciéndose un reordenamiento en el segmento de un gen. En ciertos estudios se dice que los factores genéticos hereditarios son responsables de la variación que se produce en la adiposidad de la obesidad, con un porcentaje que se encuentra entre un 30-50 % ¹⁹.

Estas alteraciones genéticas van a producir, según como se generen, un tipo de obesidad u otro:

- a) **Obesidad monogénica:** se produce una mutación en un gen que actúa sobre la regulación de la vía hipotalámica de la leptina-melanocortina, dando lugar a un desequilibrio energético. Se requiere la mayoría de las mutaciones dos copias disfuncionales de un gen homocigoto, para que se manifieste su fenotipo. Además, se van a poder originar mutaciones en la leptina, receptores de la leptina, en el neuropéptido pro-opiomelanocortina y en el receptor de la melanocortina (MC4R) ²⁰. Esta última es la más común de todas ellas, causando una deficiencia estructural en la mayoría de las mutaciones ¹⁹.
- b) **Síndromes con obesidad:** Estos síndromes van a producir obesidad junto a otras disfunciones porque van a estar originados por mutaciones en una amplia región de un cromosoma, afectándose varios genes y dando lugar a síndromes como el de Prader-Willi ²⁰. Dicho síndrome es el más común en el mundo y afecta a 1 de cada 20.000 recién nacidos ocasionando obesidad, hipotonía y dificultad en la alimentación en la infancia ¹⁹.
- c) **Obesidad poligénica:** Es el tipo más común de obesidad ocasionada por factores genéticos ¹⁹(Kumar & Kelly, 2017) y afecta a la mayoría de la población obesa. Se presentan múltiples variantes genéticas, produciendo una sumación de efectos que tienen como punto en común el aumento de la susceptibilidad a la ganancia de peso por el individuo ²¹.

✓ **Causas Nutricionales**

Las causas nutricionales generalmente están asociadas a un incremento en las calorías debido a un consumo elevado de alimentos ultraprocesados con altas proporciones de azúcares y grasas saturadas ¹⁹. Se asocia también a un elevado consumo de colesterol y sodio junto a un bajo consumo de fibra, vitaminas, antioxidantes debido en gran parte a un bajo consumo de frutas y grasas insaturadas ²². Además, se ve una causa en el ámbito nutricional por el cambio cultural que se ha

producido en nuestra sociedad, al verse incrementado el consumo de comidas rápidas que conlleva que se ingieran altas cantidades calóricas en un corto espacio de tiempo, lo que hace que no se llegue al punto de saciedad necesario y se acabe por consumir más cantidad de la necesaria ²³.

Las altas ingestas de proporciones de azúcares también se encuentra dentro las causas que generan obesidad, ya que estos se encuentran en altas cantidades en bebidas azucaradas, estando disponibles en cualquier parte y en mayor cantidad que el agua sobre todo en áreas urbanas. La ingesta elevada de este tipo de bebida origina en el individuo hiperglucemia que se va alternando con el estado glucémico postprandial, haciendo que las respuestas endocrinas puedan ser inexactas y aumente la lipogénesis ²³.

También es interesante hablar de la educación porque se ha comprobado que existe una correlación negativa entre el nivel educativo y el tipo de alimentos que se consume, siendo consumidos los alimentos más saludables en aquellos que tienen un nivel educativo más elevado ²³.

Dentro de las causas por nutrición se pueden incluir los compuestos obesogénicos como el bisfenol A que modifican la homeostasis lipídica y promueven una ganancia de tejido graso, además de a alterar la microbiota intestinal, induciendo indirectamente una ganancia de peso por un cambio el metabolismo basal y la alteración hormonal del apetito y la saciedad ²⁴. Dichos compuestos obesogénicos suelen estar expuestos en alimentos, además de en otros tantos productos de uso, por eso es muy importante cambiar la manera en la que se desarrollan estos alimentos, dejando de utilizar métodos en la cadena de producción y envasado que sean perjudiciales para la salud y optar por otros más saludables que impidan la generación de estos elementos químicos para la población ²⁴.

✓ **Causas Socioeconómicas**

El factor socioeconómico es muy importante dentro de las causas que originan obesidad, ya que se ha comprobado que los países que tienen una elevada prevalencia en obesidad son aquellos que tienen un porcentaje mayor de la población con bajos ingresos y que además se encuentran asociados a otros factores

obesogénicos como es el nivel de educación y las pocas facilidades que tienen para realizar prácticas deportivas diarias ²³.

Comparando países ricos y pobres en relación a la obesidad, se observa que son los pobres de los países ricos y los ricos de los países pobres los más expuestos debido a que los primeros consumen mayor cantidad de alimentos procesados con alto contenido calórico, y los últimos por una demanda excesiva de alimentos debido a su posición social dentro de un país pobre. En contraposición se puede observar que los que presentan menos riesgos son aquellos pobres en países pobres por tener una escasez de alimentos que en muchas ocasiones no le permiten llegar al requerimiento energético diario, y los ricos de los países ricos que pueden acceder a dietas saludables y a hacer prácticas deportivas por tener más tiempo para realizarlo ²⁵.

Los hábitos que se han señalado en el apartado de causas nutricionales muchas veces son promovidos por intereses comerciales y económicos, se utilizan alimentos ultraprocesados por ser económicos y contener componentes adictivos que implicaría una ganancia económica para la industria alimentaria, a causa de un mayor consumo por parte de la población, siendo desde la propia industria desde donde se promueve una campaña de marketing sobre la población más influenciable ¹⁵.

En el caso de la obesidad infantil se ha visto que es influenciada por aquellos padres que son obesos debido a una transferencia de comportamientos desde estos a sus hijos, adoptando los estilos de vida erróneos de los padres. Por eso sería adecuado realizar una educación sanitaria desde las instituciones más cercanas a los niños, como pueden ser los colegios e institutos, donde profesionales sanitarios formados adecuadamente, como los farmacéuticos, puedan asistir a charlas o conferencias con los alumnos para aconsejar sobre hábitos saludables que les permitan conseguir una buena calidad de vida ²⁵.

✓ **Causas Psicológicas**

Las causas psicológicas que van a derivar en una posible obesidad son ansiedad y la depresión, que presentan a lo largo de la enfermedad un estado de estrés. Este estrés

crónico produce una disfunción en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y genera aumento de la hormona adrenocorticotropa que mediante su acción en las glándulas suprarrenales inducirá la síntesis de corticoesteroides como el cortisol que induce una inmunosupresión, influyendo en la secreción de ciertas citoquinas y altera la función y permeabilidad de la barrera intestinal cambiando la composición de la microbiota intestinal ²⁶. Esto puede llegar a ocasionar una disbiosis en la microbiota que ocasione una alteración de la barrera intestinal y el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT), permitiendo el paso de componentes bacterianos a la sangre como lipopolisacáridos que se encuentran en la pared celular de ciertas bacterias, activando vías inflamatorias que contribuyen al desarrollo de una resistencia insulínica por la presencia de citoquinas inflamatorias. Además, esta disbiosis intestinal, puede alterar la producción gastrointestinal de péptidos asociados a la saciedad, contribuyendo a una ingesta de alimento superior a la que se requiere ²⁶.

Por otra parte, cuando la concentración de cortisol continua elevada en sangre durante un elevado tiempo ocasiona una ganancia de peso y la aparición de obesidad, como por ejemplo en el síndrome de Cushing en la que una secreción excesiva de cortisol se asocia con obesidad visceral ²⁷. La exposición crónica a glucocorticoides promueve la síntesis de tejido adiposo, ya que induce la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos maduros. También ocasiona una inhibición de la GLUT4 en las células, reduciendo la entrada de glucosa por parte de la célula, lo cual genera una hiperglucemia. En el hígado esto ocasiona un incremento de la lipogénesis y la gluconeogénesis y en el páncreas produce una hipertrofia e hiperplasia de las células beta, ocasionando una hiperinsulinemia y aumentando el riesgo de resistencia insulínica en el organismo ²⁷.

Los estados de resistencia insulínica e hiperglucemia junto con una ingesta de alimentos desequilibrada van a favorecer el desarrollo de la obesidad. Además, esta obesidad que se genera contribuye a la desregulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, debido a las alteraciones emocionales y psicológicas que produce esta enfermedad, al ocasionar una pérdida en la calidad de vida de los pacientes ²⁷.

1.1.4 Morbilidad

La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial, y cada año mueren como mínimo, 2,8 millones de personas a causa de la obesidad o sobrepeso ¹⁴. Como norma general conviene tener en cuenta que las mayores complicaciones corresponderán a mayores cifras de sobrepeso (obesidad mórbida y superobesidad), además presenta una gran influencia la edad, la duración del exceso ponderal y la distribución de la grasa adicional, puesto que la obesidad androide/visceral/abdominal se acompaña del llamado síndrome de resistencia a la insulina ²⁸.

Son bien conocidas las consecuencias del exceso de peso sobre el sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, osteoarticular, reproductor y endocrino-metabólico, así como la relación entre obesidad y algunos tipo de cáncer ¹¹. En la siguiente (figura 3) se presentan las distintas comorbilidades asociadas a la obesidad ²⁸.

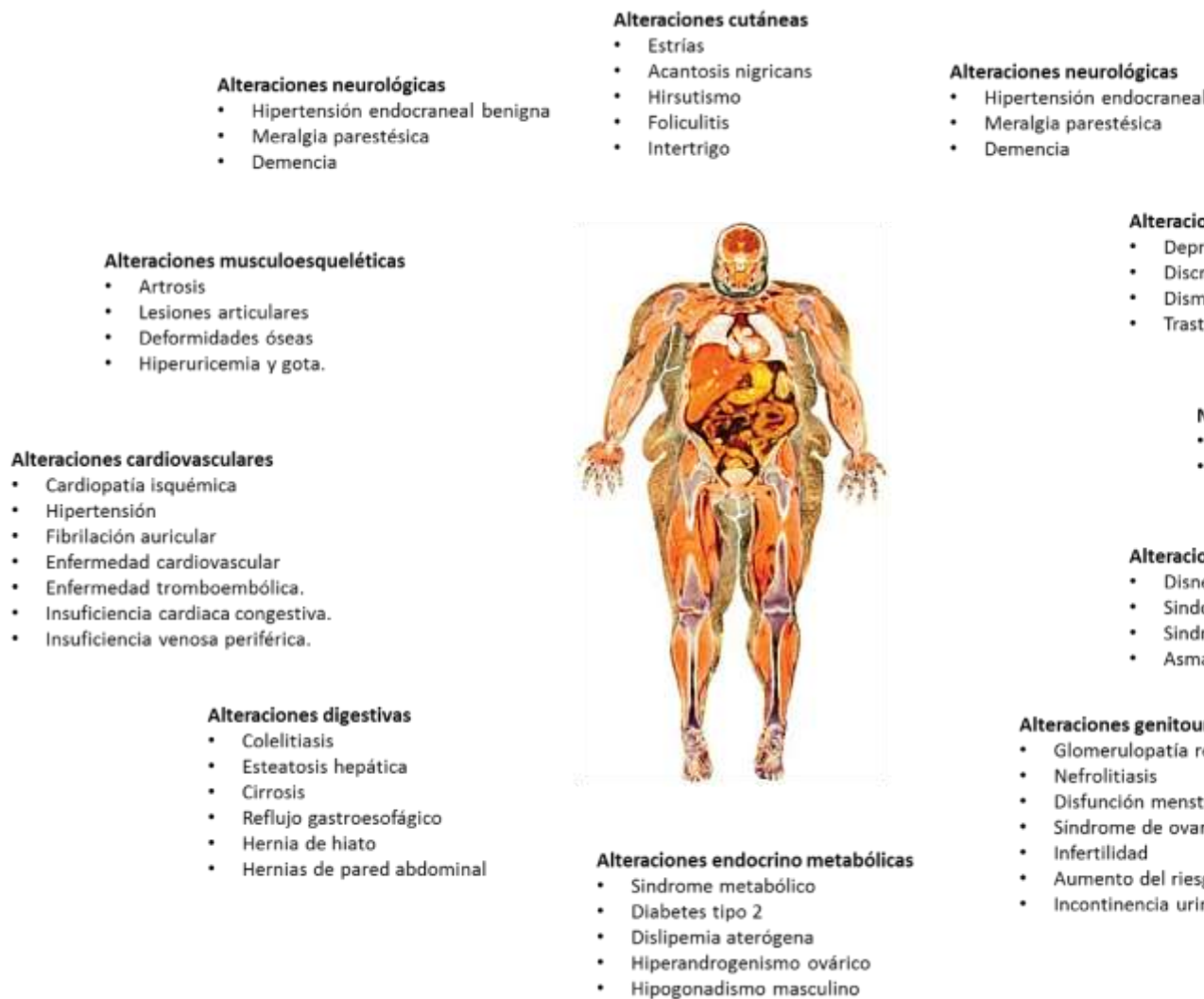


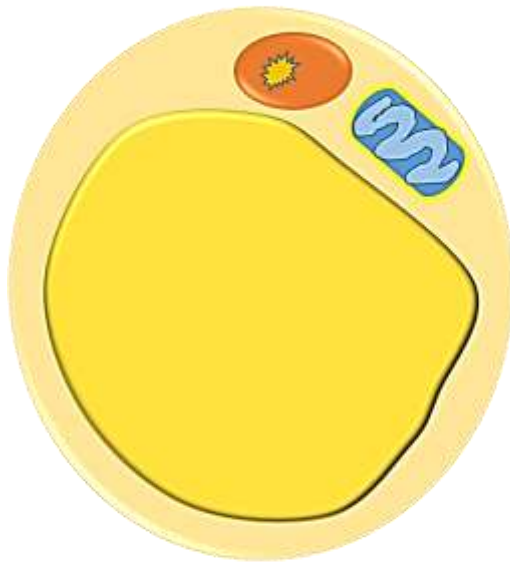
Figura 3.- Comorbilidades asociadas a la obesidad ²⁸

1.1.5 Tejido adiposo como órgano endocrino

La obesidad se caracteriza por un aumento en el número de células grasas, el tamaño de las células grasas o una combinación de ambos ²⁹. El tejido adiposo constituye la principal reserva energética del organismo. Estos depósitos se encuentran repartidos por distintas zonas corporales, a escala dérmica, subcutánea, mediastínica, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal. Este tejido tiene la capacidad de acumular grasa cuando el aporte energético es excesivo, y de movilizarla cuando el organismo requiere energía, es por ello que contiene distintas enzimas encargadas de la lipólisis y de la lipogénesis ³⁰.

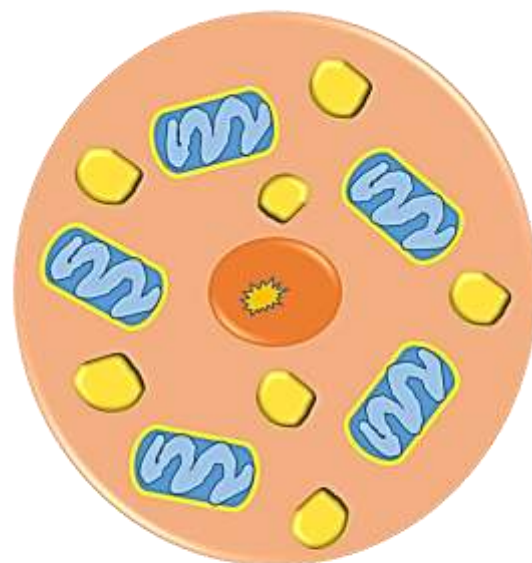
El adipocito representa la unidad básica del tejido adiposo, constituyendo entre uno y dos tercios del mismo ³¹. El resto del tejido está formado por células sanguíneas, endoteliales y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos, aunque también aparecen preadipocitos, células mesenquimales probablemente diferenciadas y células grasas muy pequeñas ³². El adipocito tiene su origen a partir de células precursoras o preadipocitos, las cuales, bajo el estímulo de numerosas hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes, inician un proceso de diferenciación morfológica y funcional hasta convertirse en un adipocito maduro, lo que se conoce como adipogénesis, proceso que está presente durante toda la vida. En la (figura 4) es posible distinguir dos grandes tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo o marrón. Ambos no presentan diferencias única y exclusivamente en cuanto a coloración, sino también en cuanto a su morfología, distribución, genes y función ³³.

Tejido adiposo Blanco



- La formación del tejido adiposo blanco se acentúa a partir del tercer trimestre del embarazo.
- La expansión del mismo desde el primer año de vida y su desarrollo es un proceso continuo a lo largo de la vida.
- Este tejido está formado por adipocitos uniloculares (cada célula de grasa contiene una sola gota grande de aceite) que contienen mitocondrias.
- La principal función de este tejido es controlar la ingesta de energía y la distribución de la misma a otros tejidos en los períodos catabólicos.
- Responde a hormonas, las produce y secreta. Posee una gran capacidad de almacenamiento de triglicéridos.

Tejido adiposo Pardo



- Participa en la regulación del metabolismo y en la termogénesis etapa neonatal, en lactantes y niños.
- Disminuye después de las 8 semanas de vida. Reservorio de cantidades pequeñas en todas las categorías de edad (1% de peso total).
- Restos ubicados en la región axilar, subescapular, interescapular, intercostal, cervical, e inguinal.
- Se caracteriza por poseer adipocitos multiloculares (su citoplasma contiene muchas gotas de lípido) y una gran cantidad de mitocondrias que otorgan una alta capacidad oxidativa, necesaria para la disipación energética (termogénesis).

Figura 4.- Principales diferencias entre tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo. Elaboración propia ³³.

El balance entre las áreas blancas y pardas puede verse modificado en respuesta a distintos factores tales como el frío, el calor, la obesidad, la edad, entre otros ³³.

Desde la identificación de la leptina como hormona producida principalmente en el adipocito, se ha descubierto una amplia variedad de moléculas con una gran actividad biológica, generadas y secretadas por los adipocitos, denominadas

adipocitoquinas, entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la leptina, la resistina, la adiponectina, y el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) entre otras. El tejido adiposo puede considerarse formalmente como un tejido endocrino, ya que produce y secreta péptidos con diferentes efectos que ejercen su acción en tejidos distantes (efecto endocrino), en contraste con efectos locales (paracrino o autocrino). Como ya es conocido las células endocrinas clásicamente son controladas por estímulos externos que generan un mecanismo de retroalimentación ³⁴.

Las citoquinas producidas por los adipocitos ejercen sus acciones en el sistema nervioso central, el músculo, el hígado, y el hueso entre otros muchos tejidos. El tejido adiposo también participa en los procesos de inflamación, regulación metabólica de energía, enfermedad vascular aterosclerótica, síndrome metabólico, y cáncer. En las dos últimas décadas se ha reconocido el importante papel de los adipocitos en la homeostasis de energía corporal, la sensibilidad a la insulina, y el metabolismo de carbohidratos y lípidos ³⁵. Cabe destacar el predominio proinflamatorio que presenta el tejido adiposo de la región visceral concretamente con respecto al subcutáneo, siendo este primero una fuente importante de citoquinas con una actividad metabólica muy alta, por ello la importancia a nivel cardiovascular del perímetro abdominal ³⁶.

En el estado obeso, el tejido adiposo está infiltrado por macrófagos inflamados. Existe evidencia de que la inflamación de bajo grado dentro del tejido adiposo produce una desregulación de la producción de adipocitocinas ³⁷. Niveles séricos de adipocina se encuentran elevados en humanos y animales con exceso de adiposidad, y la grasa visceral parece producir varias de estas adipocinas más activamente que el tejido adiposo subcutáneo ^{29 37}.

Dependiendo de la ubicación en el cuerpo, difieren en su capacidad para secretar adipocitocinas, así como en la composición celular con fenotipo variado, así como en la cantidad y proporción de adipocitos que lo forman, las células del estroma de los vasos sanguíneos y las células del sistema inmunitario ³². Ahora se reconoce generalmente que el tejido adiposo es un órgano importante de una red compleja que participa en la regulación de una variedad de funciones biológicas muy diversas ²⁹.

1.1.6 Obesidad y alteraciones hepáticas

1.1.6.1 Definición

La esteatosis hepática o enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés, Nonalcoholic Fatty Liver Disease) es la enfermedad hepática crónica más común. Es una condición clínico-patológica caracterizada por la acumulación de lípidos en el hígado que genera daños similares a los producidos por el consumo de alcohol, pero en individuos sin historial de consumo crónico. Histológicamente se caracteriza por una acumulación de lípidos, macro o microvesicular, mayor a 5% del peso total del hígado ³⁸.

1.1.6.2 Prevalencia

La prevalencia estimada varía de acuerdo a la población estudiada y al método usado para cuantificarla. El origen étnico es importante en su desarrollo, siendo el de los hispanos el de mayor riesgo, seguido por el de blancos y el de afroamericanos ³⁸. La prevalencia global del NAFLD es de 25.94%, la mayor prevalencia se reporta en Medio Oriente y Sudamérica, y la menor en África. En países occidentales se ha estimado su prevalencia entre 20 y 30%, y en países asiáticos en 15%, pero podría estar subestimada ya que los niveles sanguíneos de las aminotransferasas pueden ser normales en algunos individuos con NAFLD ³⁸.

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2012, reveló que casi el 30% de la población (37.5% de mujeres y 24.8% de los hombres) es obesa. ²³ Las estimaciones consideran que la NAFLD se presenta en 25% de la población obesa, la prevalencia de la diabetes en la población adulta es de 9.2% y se ha estimado la NAFLD en más de 50% de estos pacientes. En otro estudio realizado en México se ha estimado una o se ha estimado una prevalencia de alrededor de 17.05% en población asintomática. La NAFLD no es una enfermedad exclusiva de adultos, afecta también a niños y adolescentes. Dentro de estas poblaciones se ha comprobado que la prevalencia de la NAFLD aumenta con el índice de masa corporal y está relacionada con la obesidad en la infancia. Estimar la incidencia y prevalencia de la NAFLD es todavía un desafío debido a que comúnmente son asintomáticas y por la falta de métodos de diagnóstico exactos y no invasivos ³⁸.

1.1.6.3 Fisiopatología de NAFLD

La alteración del metabolismo lipídico hepático puede originar una acumulación excesiva de lípidos y llevar a la aparición de esteatosis hepática, que cuando no está relacionada con un consumo crónico de alcohol, se le conoce como enfermedad del hígado graso no alcohólico. Se trata de un padecimiento con una fisiopatología compleja y con varias fases, que abarcan diferentes grados de complejidad y severidad: esteatosis simple, esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y, en algunas ocasiones, hasta cáncer hepático. Además, esta enfermedad es difícil de diagnosticar y pasa inadvertida hasta que presenta complicaciones ³⁸. También está relacionada con otros padecimientos metabólicos como la obesidad, diabetes, dislipemias, resistencia a la insulina y síndrome metabólico; las cuales son un problema de salud pública a nivel nacional y mundial ³⁸.

Las características fisiopatológicas de la NAFLD van a ir en relación con las causas que producen la enfermedad hepática no alcohólica, como es en el caso de los pacientes con síndrome metabólico que se caracterizan por presentar obesidad central, hipertensión, resistencia insulínica, altos niveles de triglicéridos y bajos niveles de HDL, son los que más riesgos presentan en desarrollar la enfermedad ³⁹.

La resistencia a la insulina, contribuye a su patogénesis y se caracteriza por la reducción de la transferencia de glucosa en tejidos como el adiposo o el muscular, esto hace que se produzca una desregulación de la lipólisis que contribuye a que se produzca una incorrecta señalización de la insulina en el organismo ³⁸, en cuanto a la acción que produce la resistencia insulínica a nivel hepático, se ha descrito que va a inhibir la gluconeogénesis y la glucogenosíntesis. Finalmente se produce un aumento de la glucosa circulante en sangre que activa la secreción de más insulina, provocando en el organismo un estado de hiperinsulinemia e hiperglucemia, que inducen en el hepatocito la activación de factores de transcripción, favoreciendo la glucólisis y la lipogénesis ⁴⁰. Se ha demostrado que la anormalidad en la señalización de la insulina activa la vía de NF-kB intrahepática facilitando la secreción de citoquinas inflamatorias, como la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa y la IL-1b, estas sustancias inflamatorias van a ocasionar lesión e inflamación hepática ⁴¹. Además, la hiperinsulinemia que se produce va a favorecer la estimulación del factor

de crecimiento insulínico 1 que se considera un promotor tumoral implicado en ciertos tipos de cánceres ⁴².

La obesidad a nivel central, con un alto porcentaje de tejido adiposo visceral, produce un estado inflamatorio mediado por citoquinas inflamatorias, entre ellas la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa, y también otras sustancias como la leptina y la adiponectina, contribuyendo en la lesión hepática como ocurre con la resistencia insulínica (de Assunção y col, 2017), la obesidad al generar un incremento de macrófagos y otras células inmunitarias en el tejido adiposo, contribuye a la resistencia insulínica (Heymsfield, 2017).

Evolución hacia esteatohepatitis y cáncer hepático

El principal motivo de la generación de NAFLD es el incremento del tejido adiposo visceral, generado por la alteración del metabolismo lipídico y glucídico que va a inducir la acumulación de grasa en el hígado ³⁹, esta acumulación hace que el hígado se sobrecargue de ácidos grasos y sustratos energéticos, favoreciéndose la aparición de sustancias lipídicas tóxicas ⁴³. La incapacidad para hacer retroceder los procesos perjudiciales que producen esas sustancias tóxicas que se van a generar, hace que el daño hepático aumente y la enfermedad progrese hasta el estado de Enfermedad del Hígado graso No Alcohólico (NASH) desde ahí a la fibrosis que puede conducir a una cirrosis y el desarrollo de un cáncer hepatocelular (Rinella, 2015). Como se puede observar en la imagen X, los ácidos grasos libres son el núcleo principal de la patogénesis de la enfermedad NASH, producidos por la lipólisis de triglicéridos del tejido adiposo y transportados al hígado a través de la sangre, siendo este proceso regulado por la insulina a nivel de los adipocitos. También se observa un aumento de AGL a nivel hepático debido a la síntesis lipogénica de novo producida a partir de glucosa y fructosa. Los triglicéridos que no se distribuyen a sangre en forma de VLDL se acumulan en forma de gotitas en el hígado ⁴³. Estos AGL que llegan al hígado a partir de la sangre, o bien porque son sintetizados a partir de una lipogénesis de novo, se metabolizan en triglicéridos por una reacción de beta-oxidación en las mitocondrias. Si la función mitocondrial o del peroxisoma no puede contrarrestar un incremento en el flujo lipídico, la respiración oxidativa puede colapsar dañando

la homeostasis de los lípidos y ocasionando la generación de metabolitos lipídicos tóxicos y la sobreproducción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) ⁴⁴.

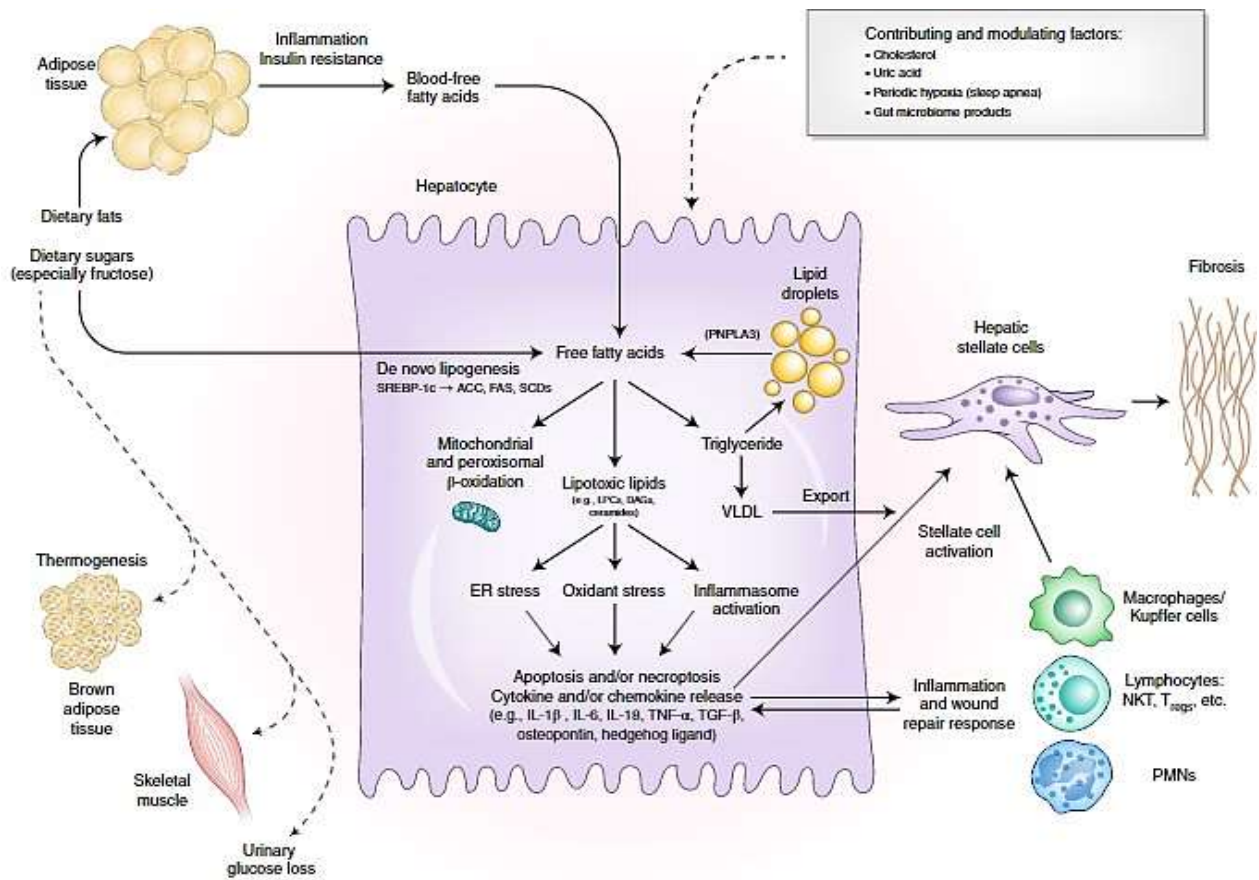


Figura 5.- Modelo de lesión hepática por sobrecarga de sustrato en la patogénesis de NASH (Friedman y col, 2018)

También se ha comprobado que depende de ciertos factores como la biodisponibilidad de carnitina que posibilita que estos ácidos grasos se transporten a las mitocondrias para realizar la beta oxidación ⁴⁵. La acumulación de especies reactivas de oxígeno se evita por compuestos antioxidantes como la cisteína, un componente esencial en la producción endógena de glutatión hepático, los cuales se pueden ver disminuidos ante cambios dietéticos o de la microbiota intestinal ⁴⁵. Esta acumulación de ROS genera un estrés a nivel del retículo endoplásmico, que además también se va a encontrar alterado funcionalmente por la hiperglucemia, por depleciones de ATP a causa de las alteraciones mitocondriales que se han comentado, por un estado de hipercolesterolemia y por una depleción de fosfatidilcolina. Se produce una respuesta proteínica disfuncional que activa la quinasa c-jun terminal (JNK) dando lugar a inflamación y apoptosis, además de dañar

la señalización de la insulina y como consecuencia favorecer el desarrollo de diabetes ⁴⁴. También produce la activación de inflamasomas que van a favorecer la lesión hepática y la aparición del NASH. Los inflamasomas son complejos multiproteínicos citoplasmáticos que activan la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1Beta y IL-18, ocasionando apoptosis por la activación de caspasa-1⁴³. En el caso de los hepatocitos que sufren la muerte celular por la acumulación de los triglicéridos no se producirá por caspasa-1, ya que van a carecer de ella. Su muerte se va a producir por especies reactivas y la activación de caspasa-2 que se asocian a piroptosis que causa una descarga de ATP intracelular, siendo un potente inflamatorio ⁴⁵.

Se puede deducir que la esteatosis hepática simple producida por un primer estímulo, como es la inflamación ocasionada en primera instancia por la obesidad producirá un aumento de la sensibilidad del hígado ante la llegada de un segundo estímulo, los compuestos lipotóxicos generados por el exceso de grasa en el entorno hepático que induciría una inflamación local ocasionando la esteatosis hepática no alcohólica ⁴⁶. Estos hepatocitos que son dañados por la lipotoxicidad van a activar diferentes mecanismos de muerte celular entre los que se puede destacar la apoptosis piroptosis y necrosis, influyendo en la progresión de la NASH debido a que la muerte celular activa las respuestas inflamatorias de las células que se encuentran alrededor ⁴⁶.

La fagocitosis de los desechos generados por la apoptosis facilita la diferenciación de las células estrelladas en células de Kupffer y miofibroblastos, los cuales van a generar factor de necrosis tumoral alfa y ligandos que promueven la inflamación y posterior fibrosis que conlleva la muerte de los hepatocitos ⁴⁵. Esta inflamación y lesión celular va a producir una reparación del tejido que será mayor cuanto mayor sea la inflamación y la lesión. Se ha comprobado que la presencia de ciertas células inmunitarias como las natural killer, juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad hacia NASH, ya que estas son precursoras de citoquinas fibrogénicas⁴⁵.

Estas citoquinas inducen el desarrollo de las células con forma estrellada que se encuentran en los pericitos hepáticos y estas células se van a ver estimuladas por la vía Hedgehog para transformarse en miofibroblastos que son los que se encargan

de la reparación tisular y los que producen las cicatrices que conducen al estado de fibrosis hepática. Los mayores productores de ligandos de la vía Hedgehog serán los hepatocitos que han sufrido muerte celular a causa de la inflamación hepática ⁴⁵. Esta respuesta celular regenerativa promueve, progresivamente, un anillo cicatrizante que conduce a la cirrosis hepática y perpetuando el estímulo de reparación celular en el tiempo, se verá aumentado el riesgo de cáncer hepático ⁴⁵.

Day et al 1998 describieron una teoría para tratar de explicar la etiología de la esteatosis hepática, llamada hipótesis del doble impacto.

- ✓ En el primer impacto, la resistencia a la insulina provoca un cambio metabólico aumentando la lipólisis en el tejido adiposo y creando un mayor flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado ³⁸. Esto provoca un aumento en la reesterificación de ácidos grasos y en la lipogénesis hepática de novo. También existe un decremento en la oxidación de ácidos grasos y una disminución en la exportación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ³⁸.
- ✓ El segundo impacto aparece cuando la acumulación de lípidos llega a ser tóxica e induce una respuesta de estrés oxidativo en el hígado, involucrando procesos de inflamación ³⁸. El estrés oxidativo origina la liberación de catepsinas lisosomales, la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico y la apoptosis celular, produciendo así la inflamación que activa a las células estrelladas (células de Ito o adipocitos hepáticos) y el depósito de colágeno en los sinusoides hepáticos, siendo muy variable la posibilidad del hígado de recuperarse de este daño. Esto puede resultar en muerte celular necrótica, apoptosis y conducir a esteatohepatitis y, posteriormente, a fibrosis. Lo cual a su vez predispone a la aparición de cirrosis y en muchos casos puede derivar a hepatocarcinoma (figura 6) ³⁸.

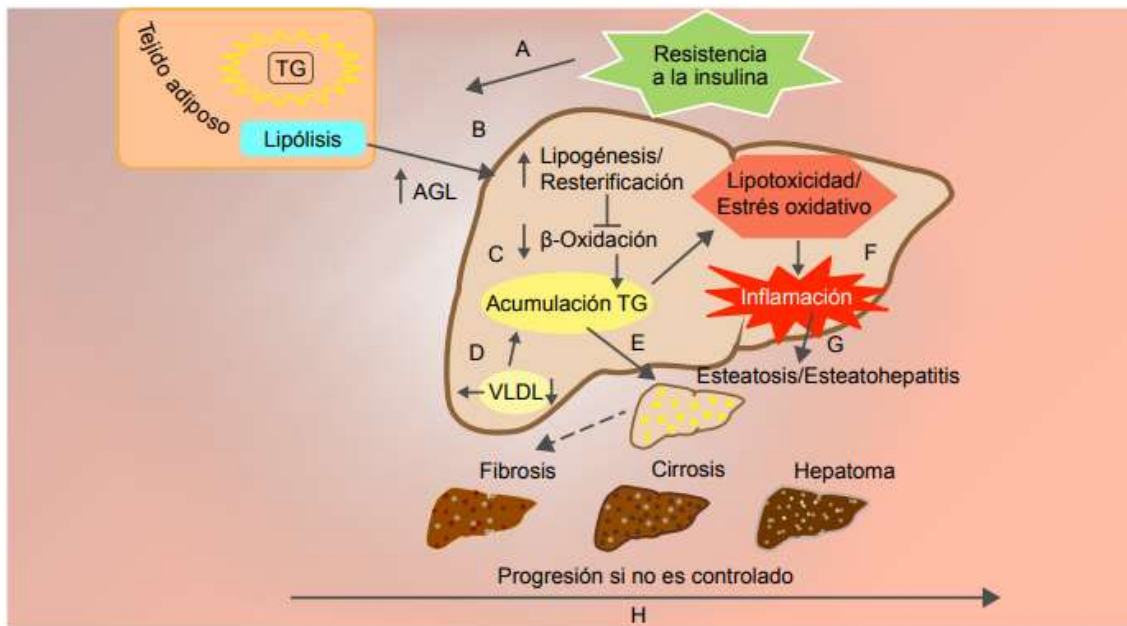


Figura 6.- Patogénesis de la esteatosis no alcohólica y sus complicaciones. A) Por la resistencia a la insulina se reduce el efecto antilipolítico de la insulina e incrementa la lipólisis. B) El incremento en la lipólisis aumenta el flujo de ácido grasos libres (AGL) hacia el hígado. C) La mayor cantidad de ácidos grasos incrementa la lipogénesis y la reesterificación, reduciéndose al mismo tiempo la oxidación de los ácidos grasos y ocasionando una acumulación de triglicéridos (TG). D) Existe una reducción en la exportación de triglicéridos, lo que contribuye a la acumulación de TG. E) La acumulación excesiva de triglicéridos por arriba del 5% del peso total del hígado origina la esteatosis hepática no alcohólica. F) La acumulación excesiva de TG provoca un lipotoxicidad y un estrés oxidativo. G) La inflamación crónica desencadena la esteatohepatitis. H) Si la esteatohepatitis no es controlada adecuadamente, puede progresar a fibrosis, cirrosis y cáncer hepático ³⁸..

Existen otras condiciones endocrinas que están relacionadas en menor grado con la NAFLD: hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipogonadismo y el síndrome poliquístico ovárico. La esteatosis también se ha asociado a enfermedades cardiovasculares, apnea obstructiva del sueño, adenomas colónicos, hiperuricemia, deficiencia de vitamina D, hiperferritemia y esteatosis pancreática ⁴⁷. Además, se ha determinado que pacientes con esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis tienen mayor riesgo de desarrollar hepatocarcinoma (HC) ⁴⁸. También la edad y los depósitos hepáticos de hierro son otros factores de riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma a partir de una NASH ⁴⁷.

1.1.6.4 Estrés oxidativo en la esteatosis hepática

La NAFLD, y más concretamente la esteatosis, son enfermedades multifactoriales y el estrés oxidativo está implicado en su patogénesis. En condiciones normales, el metabolismo aerobio hepático da como productos de deshecho pro-oxidantes, como las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) ³⁸. Estas sustancias son neutralizadas por los antioxidantes, manteniéndose el equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes. Con el aumento de la producción de sustancias pro-oxidantes por la alteración del metabolismo hepático normal este equilibrio se pierde, dando lugar al estrés oxidativo ⁴⁷. La reducción secuencial de un electrón del oxígeno produce intermediarios relativamente estables tales como el anión superóxido, que se dismuta a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (SOD) ³⁸.

El peróxido de hidrógeno puede ser completamente reducido a agua o parcialmente reducido a radical hidroxilo. El radical hidroxilo, uno de los más oxidantes en la naturaleza, se forma a través de las reacciones de Fenton y/o Haber-Weiss en presencia de metales de transición. El anión superóxido también puede reaccionar con otros radicales incluyendo el óxido nítrico, formando peroxinitrito. En estado fisiológico, las especies más reactivas del oxígeno son detoxificadas mediante su transformación en agua ³⁸.

En el retículo endoplásmico (RE), las monooxigenasas como el citocromo P450 reductasa, contribuyen a una mayor formación de peróxido de hidrógeno y anión superóxido, mientras que los peroxisomas son fuentes de peróxido de hidrógeno citosólico asociado a la oxidación de ácidos grasos. Se ha observado que el incremento de la expresión de los enzimas citocromo P450 son responsables del aumento de la producción de ROS ⁴⁷. Bajo condiciones fisiológicas, el peróxido de hidrógeno peroxisomal es eliminado por la catalasa (CAT). Aunque el mayor productor de ROS es la mitocondria debido a la ineficiencia de la cadena de transporte de electrones ⁴⁷.

Las ROS pueden atacar los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) e iniciar la peroxidación lipídica dentro de la célula, formándose subproductos de aldehído tales como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y malondialdehído (MDA). HNE y MDA tienen

mayor vida media que los ROS y tienen el potencial de difundirse y alcanzar objetivos intracelulares y extracelulares distantes, amplificando los efectos del estrés oxidativo ⁴⁹.

Una disminución de las defensas antioxidantes también es un factor de estrés oxidativo en pacientes con NAFLD. El aumento de los niveles de ROS y β -oxidación lipídica producen un descenso de los niveles de enzimas antioxidantes como la SOD, GPx y CAT, y de compuestos antioxidantes como el glutatión (GSH) y coenzima Q10 en pacientes con NAFLD ⁴⁹. ROS activan de forma indirecta el factor nuclear K β 2 (NF-kB) y el activador de proteínas-1 (AP-1) responsables de la activación de la producción de mediadores citotóxicos, proinflamatorios y fibrogénicos por las células Kupffer y células no parenquimales ³⁸. Además, se observa un aumento de expresión de la NADPH oxidasa. La activación de la NADPH oxidasa y el aumento del estrés oxidativo a su vez provocan una producción desregulada de adipocitocinas; incluyendo adiponectina, inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) TNF- α , leptina; IL-6, y la proteína quimiotáctica monocítica-1 ³⁸.

1.1.7 Obesidad y alteraciones cardiovasculares

La obesidad es cada vez más común en las sociedades posindustriales y además la carga de la obesidad sigue aumentando. Los principales efectos de la obesidad en la salud cardiovascular (CV) están mediados por el riesgo de síndrome metabólico (resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión), de modo que la ausencia de estos factores de riesgo en individuos obesos puede no estar asociada con un mayor riesgo de mortalidad ⁵⁰. Los efectos negativos de la obesidad en la salud CV se manifiestan como una progresión acelerada de la aterosclerosis, mayores tasas de remodelado ventricular y un mayor riesgo de enfermedades asociadas, como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, e insuficiencia cardíaca ⁵¹.

Las enfermedades vasculares constituyen la primera causa de fallecimientos en España, destacando entre ellas por su frecuencia y morbimortalidad las enfermedades isquémicas del corazón ⁵².

- ✓ Patogenia de la aterosclerosis. Entre los múltiples fenómenos implicados en la patogenia de la aterosclerosis destaca por su importancia y precocidad la retención y oxidación subendotelial de las lipoproteínas ricas en colesterol, que podrían iniciar una serie de acontecimientos que originan la aparición de la placa aterosclerótica ⁵².
- ✓ Factores de riesgo. Sin duda los FRV están directamente relacionados con el desarrollo y evolución de la placa. Destacan por su especial relación los FRV mayores, aunque otros como los FRV menores y los denominados emergentes de menor prevalencia condicionan una mayor y más rápida evolución del proceso aterosclerótico ⁵².
- ✓ Mecanismos celulares. En la lesión aterosclerótica participan con diferente protagonismo distintos tipos de células. Entre todas las células endoteliales destacan el monocito/macrófago, los linfocitos, las células musculares lisas y las plaquetas ⁵².
- ✓ Mecanismos moleculares. El desarrollo y posterior evolución de la lesión aterosclerótica están estrechamente ligados a la presencia de numerosas moléculas liberadas por las células que participan en el proceso aterogénico ⁵³. Presentan en su conjunto, sobre todo, efectos proagregantes, protrombótico, mitogénico y proinflamatorio que contribuyen al crecimiento y complicación de la placa ⁵².

1.1.7.1 Prevalencia

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Son la principal causa de defunción en todo el mundo ⁵⁰.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en 2015 -último año del que se han publicado datos- murieron 17,7 millones de personas por enfermedades cardiovasculares, lo que representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo ⁵⁰.

Afectan en mucha mayor medida a los países de ingresos bajos y medianos: más del 80% de las defunciones por esta causa se producen en esos países ⁵³. Estas son

actualmente la principal causa de fallecimiento en todo el mundo: cada año mueren más personas por alguna patología relacionada con la salud cardiovascular que por cualquier otra causa ⁵¹.

En este escenario, España no es una excepción: en el último informe 'Defunciones según causa de la muerte', elaborado por el Instituto Nacional de Estadística, se advierte que en nuestro país la enfermedad cardiovascular también es la primera causa de muerte, por delante incluso del cáncer y las enfermedades respiratorias ⁵³.

Tanto hombres como mujeres deben prestar atención a la prevención si quieren evitar que la enfermedad cardíaca aparezca, ya que no se trata de una patología que afecte únicamente al colectivo masculino ⁵¹. De hecho, en la actualidad mueren más mujeres que hombres por esta causa en nuestro país: según los últimos datos del INE se producen 67.736 fallecimientos anuales de mujeres por 56.461 de hombres, lo que supone un 6% más de muertes entre el colectivo femenino ⁵³.

1.1.7.2 Fisiopatología cardiovascular

Para entender la fisiopatología cardiovascular y renal es necesario comprender los mecanismos celulares que vinculan las alteraciones metabólicas con alteraciones de funciones fisiológicas y terminan manifestándose en enfermedades crónicas. Está claro que dentro de los factores de riesgo del síndrome metabólico existe una clara tendencia y correlación para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales ⁵⁴.

Las ECV son trastornos del corazón y los vasos sanguíneos. Entre ellas destacan: las cardiopatías coronarias (ataques cardíacos), las enfermedades cerebrovasculares (apoplejía) el aumento de la tensión arterial (hipertensión), vasculopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas, cardiopatías congénitas y la insuficiencia cardíaca (OMS., 2019).

Los principales factores de riesgo para desarrollar ECV son: SMet, obesidad abdominal, circunferencia de cintura, incremento de adipocinas en el tejido graso visceral, resistencia a la insulina, y presión arterial elevada ⁵⁵.

El tejido adiposo es el órgano endocrino más grande del cuerpo, secreta principalmente adipocinas (adiponectina, leptina y resistina) y citoquinas (factor de necrosis alfa-tumoral (TNF- α), interleucina-6,(IL-6)) ⁵⁶.

Se considera que una inflamación sistémica de bajo grado comienza en la obesidad con el incremento del marcador inflamatorio; proteína C- Reactiva (C-reactive protein (CRP) ⁵⁷, en conjunto existe una actividad mayor por parte de los macrófagos, que rodean el tejido adiposo excedente, resultando una mayor liberación de citoquinas y manteniendo un estado de inflamación sistémica ⁵⁷.

Esta liberación de citoquinas también induce una resistencia a la insulina en el músculo esquelético ⁵⁸, altera el eje pituitario - suprarrenal, acelera la pérdida de células beta pancreáticas ⁵⁹ y activa el sistema nervioso simpático contribuyendo al aumento de la frecuencia cardiaca, retención de sodio y el desarrollo de daño cardiovascular ⁵⁶.

Los mecanismos celulares y moleculares entre obesidad, SMet y mayor riesgo cardiovascular se centran en la función del tejido adiposo (Figura 7) ⁶⁰.

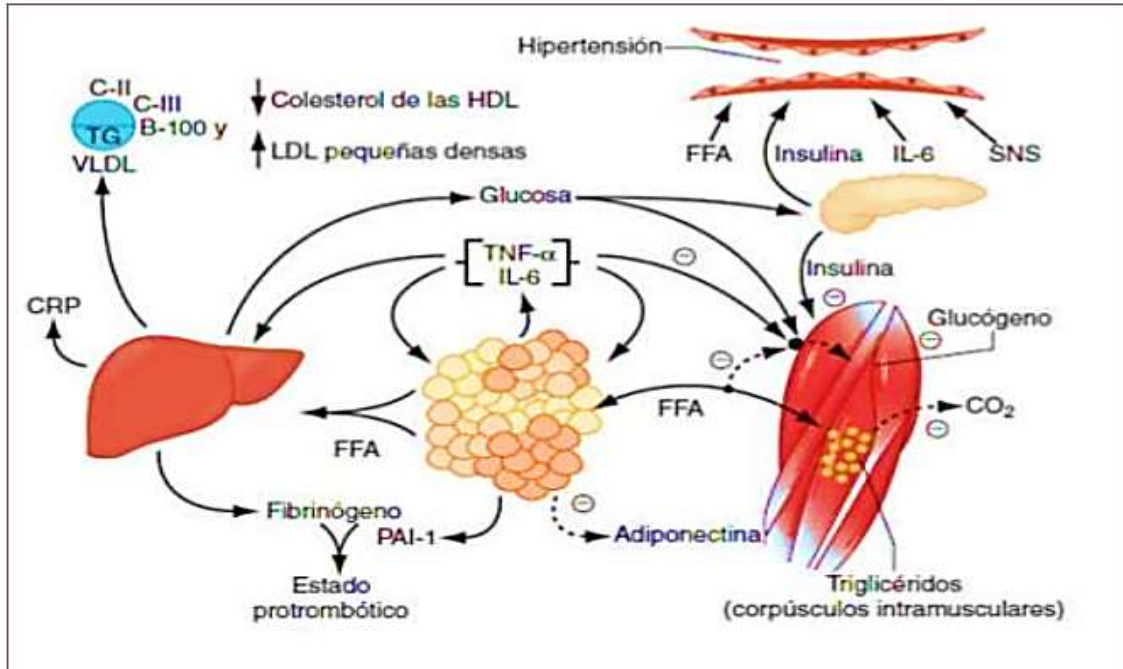


Figura 7.- Proceso aterosclerótico y trombótico ⁶⁰.

La obesidad y la aterosclerosis tienen una etiología inflamatoria ⁶⁰. La atrofia cardiaca generada por la inflamación sistémica y otros factores de riesgo antes mencionados se ha descrito como “cardiomiopatía de la obesidad” ⁶¹.

La resistencia a la insulina genera vasoconstricción, disminuyendo la actividad del óxido nítrico (NO) y su función antiaterogénica. El estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan, generando más inflamación lo que resulta en una disfunción endotelial ⁶². Las personas con SMet padecen múltiples alteraciones a nivel hemostático que los predisponen a ECV, entre ellos destacan: fibrinólisis y disfunción plaquetaria ⁶³.

En el proceso aterosclerótico las células inmunes crean una interacción con el endotelio, generando una formación temprana de ateroma, disminuyendo la homeostasis endotelial como consecuencia de la reducción de NO y la secreción del vasoconstrictor angiotensinógeno (angiotensina II) que contribuye a una hipertensión sistémica ⁶¹.

En la dislipidemia aterogénica el componente principal es el aumento plasmático de la apolipoproteína B (apo-B). Esta es una proteína estructural de lipoproteínas aterogénicas (LDL, VLDL, TG, y HDL-C reducido). Se considera que altos niveles de apo-B son la causa principal de Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica (ASCVD) ⁶¹.

El proceso aterosclerótico comienza cuando las lipoproteínas se filtran en la pared arterial, los macrófagos las atrapan formando células espumosas cargadas de lípidos generando una capa grasa en los capilares; al degradarse las células espumosas se forma un tejido conectivo (placa fibrosa) rica en colesterol ⁶⁴.

Los macrófagos se adhieren donde la capa es más inestable, provocando una ruptura y generalmente una trombosis ⁶⁵. En conjunto los niveles elevados de inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI – 1) pueden generar un estado protrombótico ⁶⁶ ⁶⁷. Los estados inflamatorios en el SMet, aceleran este proceso, cuando esta placa se rompe generalmente se produce un evento cardiovascular (infarto al miocardio o accidente cerebrovascular) (Figura 8) ⁶⁸.

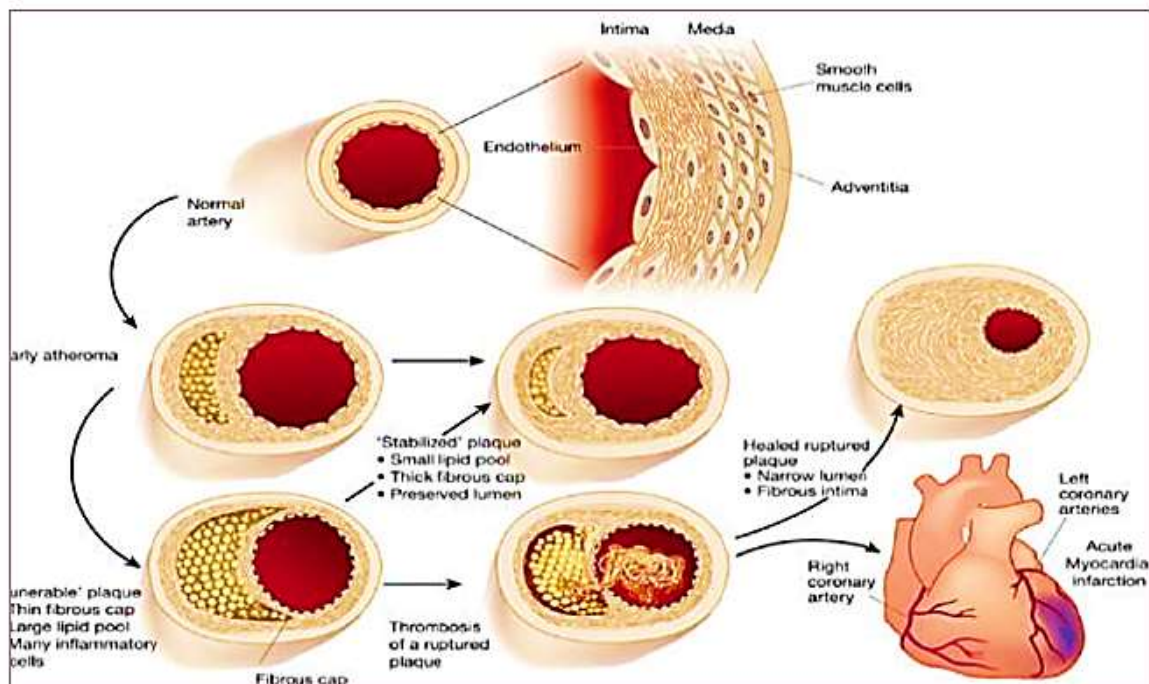


Figura 8.- Proceso aterosclerótico y trombótico ⁶⁸.

La hiperglucemia se relaciona con enfermedad microvascular, como retinopatía, neuropatía o enfermedad glomerular ⁶⁸ (Grundy y col., 2012). Cuando la función de las células beta pancreáticas se ve disminuida, los rangos de glucosa comienzan a aumentar, por lo tanto, la hiperglucemia en este caso se desarrolla como una secuela posterior a la obesidad y un estado inflamatorio sistémico ⁶⁹. Los rangos prediabéticos se establecen en: glucosa en ayuno 100-125mg/dL o niveles posprandiales a las 2 horas de 140-199mg/dL. La diabetes categóricamente se diagnostica como rangos de glucosa en ayunas de ≥ 126 mg/dL o niveles posprandiales de ≥ 200 mg/dL. Tanto la prediabetes como la diabetes se consideran factores de riesgo metabólico cardiovascular ⁶⁸.

1.1.8 Obesidad y alteraciones renales

1.1.8.1 Definición

La enfermedad renal crónica se define como la presencia de lesión renal, que abarca alteraciones histológicas en la biopsia renal o presencia de albuminuria y alteración

del sedimento urinario, o al menos 3 meses de filtrado glomerular estimado inferior a 60 ml/min/1.73 m² ⁷⁰.

Numerosos estudios poblacionales han demostrado asociación entre obesidad y el desarrollo y progresión de ERC. Un mayor IMC se asocia con la presencia y desarrollo de proteinuria en individuos sin enfermedad renal. Además, en numerosos estudios con gran población de pacientes, un mayor IMC parece asociarse con la presencia y desarrollo de una menor TFG, con una mayor pérdida de la TFG estimada con el tiempo y con aumento en la incidencia de ERCT. Un mayor IMC, con obesidad de clase II en adelante, se ha asociado con una progresión más rápida de la ERC en pacientes con ERC preexistente ⁷⁰.

Los efectos nocivos de la obesidad se extienden a otras enfermedades como el desarrollo de nefrolitiasis y neoplasias renales malignas. Un alto IMC se asocia con un aumento en la prevalencia e incidencia de nefrolitiasis. También la ganancia de peso corporal a través del tiempo y un mayor índice CC basal se han asociado con una mayor incidencia de nefrolitiasis. La obesidad se asocia también con algunos tipos de neoplasias malignas, particularmente cáncer renal ⁷⁰.

1.1.8.2 Prevalencia

El análisis de datos a nivel mundial ha revelado que cerca de 500 millones de adultos padecen ERC. La prevalencia de insuficiencia renal a nivel mundial difiere debido a múltiples factores, siendo más prevalente en Europa, Oriente Medio y Asia oriental y América Latina, que tienen un promedio del 12% de prevalencia ⁷¹.

La insuficiencia renal crónica se presenta en mayor cantidad en la población femenina y también es más prevalente dependiendo el color de piel, debido a que hay mayor predisposición en personas de color blanco a padecerla ⁷¹.

La insuficiencia renal crónica a nivel mundial es de un 10% y 1 de cada 3 personas tiene factores que predisponen el padecimiento de la enfermedad, siendo mayor esta predisposición en países con altos ingresos, esto por factores como la alimentación y el mundo industrializado ⁷¹. Esta tiene más presencia en adultos que en niños. En la población adulta las cifras superan los 100 por cada millón de habitantes en todas las regiones del mundo, mientras que los datos de las pocas

investigaciones referentes a insuficiencia renal crónica en niños, indican a una prevalencia de entre 10 y 74 por cada millón de pacientes pediátricos ⁷¹.

1.1.8.3 Fisiopatología de la obesidad

La obesidad resulta en una amplia gama de anomalías metabólicas complejas que influyen en las diversas enfermedades que afectan a los riñones. El mecanismo exacto a través del cual la obesidad puede empeorar o generar ERC es aún poco claro ⁷². El hecho de que la mayoría de los individuos obesos nunca desarrollen ERC, y que se clasifique hasta un 25% de la población obesa como «metabólicamente saludable», indica que el aumento de peso por sí solo no es suficiente para inducir daño renal. Algunas de las consecuencias renales deletéreas de la obesidad pueden estar mediadas por ciertas condiciones comórbidas asociadas como la diabetes mellitus y la hipertensión; sin embargo, existen también efectos de la propia adiposidad que pueden impactar directamente sobre los riñones, inducidos por la actividad endocrina del tejido graso, mediante la producción, entre otros, de adiponectina, leptina y resistina (fig. 9) ⁷². Estos incluyen el desarrollo de inflamación, estrés oxidativo, metabolismo lipídico anormal, activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, incremento de la producción de insulina y mayor resistencia a la insulina ⁷².

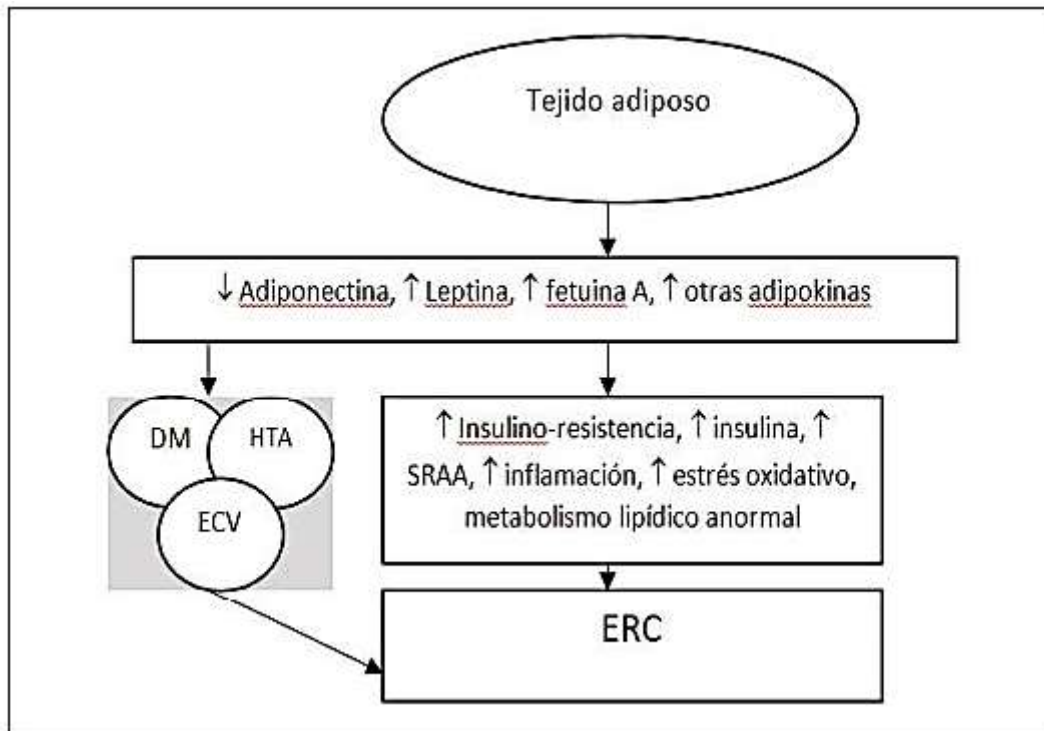


Figura 9.- Mecanismos responsables mediante los cuales la obesidad causa el daño renal ⁷².

Estos diversos efectos dan lugar a cambios patológicos específicos en el riñón, lo que podría explicar el riesgo elevado de ERC mostrado por algunos estudios observacionales. Entre ellos se incluyen la acumulación ectópica de lípidos y aumento de los depósitos grasos en el seno renal, el desarrollo de hipertensión glomerular e incremento de la permeabilidad glomerular generada por un estado de hiperfiltración, el cual se asocia al daño en la barrera de filtración glomerular, y finalmente, el desarrollo de glomerulomegalia y glomeruloesclerosis focal y segmentaria ⁷³. La incidencia de la llamada glomerulopatía asociada a obesidad se ha incrementado hasta 10 veces en el periodo comprendido entre 1986 y el año 2000. Es importante destacar que la glomerulopatía asociada a obesidad en ocasiones se presenta en conjunto con otros procesos fisiopatológicos propios de otras enfermedades o de la edad avanzada, perpetuando la generación de mayor lesión renal en pacientes con hipertensión o en ancianos ⁷².

La obesidad se asocia también con una serie de factores de riesgo que contribuyen a la alta incidencia y prevalencia de nefrolitiasis ⁷⁴. Un mayor peso corporal se asocia con menor pH urinario, aumento de oxalato urinario y mayor excreción urinaria de ácido úrico, sodio y fósforo. Las dietas ricas en proteínas y sodio pueden contribuir

a la acidificación de la orina y a la disminución del citrato urinario, lo que también contribuye al riesgo de desarrollo de cálculos renales ⁷⁵. La resistencia a la insulina, característica de la obesidad, puede predisponer al desarrollo de nefrolitiasis a través del impacto que genera en el intercambio tubular Na-H, la amoniogénesis y la generación de un medio ácido. Complicando aún más el panorama está el hecho de que algunas terapias de pérdida de peso aumentan el riesgo de desarrollo de cálculos renales ⁷⁴. Por ejemplo, la cirugía gástrica puede generar un incremento sustancial en la absorción enteral de oxalato y aumentar el riesgo de nefrolitiasis ⁷².

Los mecanismos que hay detrás del mayor riesgo de aparición de neoplasias renales en individuos obesos se encuentran poco claros ⁷². La resistencia a la insulina y, consecuentemente, la hiperinsulinemia crónica así como el incremento en la producción de factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 y numerosos efectos humorales secundarios complejos pueden ejercer efectos estimulantes en el crecimiento de varios tipos de células tumorales ⁷⁶. Más recientemente han surgido otras explicaciones adicionales, tales como las funciones endocrinas del tejido adiposo, sus efectos en la inmunidad y la generación de un estado proinflamatorio con efectos complejos sobre el cáncer ⁷⁷.

El tejido adiposo presenta una actividad endocrina de adipocinas ⁷⁵. Estas adipocinas se describen como leptina, resistina y adiponectina, esta última tiene la función de ayudar en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, se ha observado que en procesos obesogénicos, sus niveles se ven disminuidos y se relaciona con resistencia a la insulina ⁷⁶. Su principal receptor son los podocitos en el riñón y su actividad probablemente esté mediada por la proteína quinasa activada por 5'AMP (AMPK). Algunos estudios en ratones reflejan que una expresión reducida exhibe lesión en los podocitos, albuminuria y fibrosis renal ⁷³.

Por el contrario, la leptina, es una hormona que regula el apetito, su mecanismo de acción es inhibiendo el Neuropeptido Y (NPY – aumenta la ingesta y disminuye la termogénesis), en personas con obesidad se ha observado que su función se ve alterada, se presenta una resistencia a la leptina, la razón puede estar relacionada con altos niveles de triglicéridos que afectan su transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE) o que su transportador se encuentra saturado ⁶⁶. Se ha

observado in vitro que la leptina provoca hipertrofia de las células mesangiales glomerulares, generando mayor filtración de albúmina y proteína ⁷⁸.

En la obesidad los podocitos se agrandan para cubrir un área de superficie mayor en el glomérulo (Glomerulopatía) con el tiempo se atrofian y se genera un desprendimiento ya que su tamaño ya no es proporcional a la hipertrofia glomerular resultando en una glomeruloesclerosis segmentaria focal que conduce a una enfermedad renal en etapa terminal ⁷⁹.

El vínculo entre la resistencia a la insulina y la enfermedad renal podría entenderse en la dependencia de los podocitos glomerulares que componen la barrera de filtración glomerular a la insulina ⁸⁰. Esta última controla la contractibilidad de los podocitos asociada con la permeabilidad glomerular ⁸¹.

La insulina tiene la capacidad de regular la Tasa de Filtración Glomerular (TFG) a través de vasodilatación renal local, utiliza la indometacina para disminuirla y por medio de la síntesis de NO endotelial la aumenta ⁸². Sin embargo, este efecto de la insulina puede alterarse cuando existe una RI, en consecuencia la hiperinsulinemia puede producir hiperfiltración glomerular y aumento de la permeabilidad vascular desencadenando una albuminuria urinaria y la progresión de lesión renal ⁸³.

La hipertensión es una característica importante del SMet y una causa común de enfermedad renal ⁸⁴. Se han descrito diversos mecanismos por los cuales la presión arterial se puede elevar y su relación con la obesidad ⁸⁵. Una dieta alta en lípidos puede provocar un desequilibrio en la reabsorción de sodio. La alteración del sistema renina-angiotensina-aldosterona y el aumento de la actividad del sistema parasimpático, así como la liberación de angiotensinógeno y aldosterona contribuyen para desarrollar hipertensión ⁸⁶.

El estrés oxidativo juega un papel importante en el SMet ⁸⁷. La mitocondria es un orgánulo fundamental para generar energía y manejo de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ⁸⁸. Las células renales son ricas en mitocondrias y tienen una alta demanda de energía, por lo tanto la fisiopatología de las enfermedades renales afecta a casi todas sus células ⁸⁹.

La hiperuricemia tiene una fuerte asociación con el SMet y se correlaciona con hiperinsulinemia posiblemente por el efecto inflamatorio que genera en los

adipocitos, además los niveles séricos de ácido úrico se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar disfunción renal crónica ⁸⁹. Claramente la fisiopatología de la enfermedad renal, se relaciona con el SMet, ya que el riñón es un órgano diana susceptible a todos los factores de riesgo del Síndrome Metabólico ⁸⁹.

Respecto a los múltiples y variados mecanismos que subyacen al daño renal en la obesidad, no están totalmente aclarados. Sin embargo, es conocido un conjunto importante de mediadores metabólicos vinculados al tejido adiposo, capaces de generar lesión renal ⁹⁰. Las hormonas que secreta son denominadas en su conjunto adipokinas y tienen acción sistémica ⁹¹.

La **adiponectina** es una proteína producida predominantemente por el tejido adiposo. Tiene un elevado peso molecular y es capaz de circular como monómero o multímeros. Se han encontrado niveles bajos de adiponectina en pacientes con obesidad ⁹¹. Se ha encontrado a nivel renal al menos dos receptores capaces de ligar adiponectina: adipo R1 y adipo R2 ⁹⁰. El receptor adipo R2 está ubicado mayoritariamente a nivel podocitario y es activado a través de la vía de las kinasas frente a la presencia de adiponectina. Cambios moleculares vinculados a la activación del receptor podocitario de adiponectina determinan una menor permeabilidad a la albúmina por el diafragma de filtración por lo que se ha planteado que la adiponectina puede tener un rol protector a nivel podocitario ⁹⁰. Se ha encontrado una correlación entre la hipoadiponectinemia y la presencia de albuminuria en pacientes con hipertensión arterial y obesidad ⁹⁰. El incremento en los niveles de adiponectina tanto exógena como endógena se ha vinculado a normalización en la morfología podocitaria y disminución de la albuminuria en pacientes con obesidad de reciente diagnóstico y enfermedad renal. Bajos niveles de adiponectina determinan cambios en la isoforma de la enzima NAPDH oxidasa generándose incremento en especies reactivas de oxígeno y daño vascular ⁹².

La **fetulina-A** (alfa-2-Heremans Schmid glicoproteína), es una glicoproteína circulante, miembro de la familia de los inhibidores de la cisteína proteasa. Es sintetizada por los hepatocitos y está presente en todos los fluidos extracelulares ⁹². Su presencia induce insulino-resistencia en el musculo esquelético y en el hígado mediante la inhibición de una tirosinquinasa del receptor de insulina. Altos niveles

de fetuina-A se han asociado con obesidad e insulino-resistencia en pacientes con ERC ⁹³.

La **leptina** es una proteína secretada por los adipocitos y vinculada a la familia de receptores de citokina clase I ⁹⁴. Circula bajo cinco isoformas y se une a dos tipos diferentes de receptor. El rol primario de la leptina es actuar a nivel del sistema nervioso central (hipotálamo) en centro de saciedad, limitando la ingesta alimentaria como forma de regular el balance entre apetito e ingesta calórica ⁹³. La mayor parte de los efectos de la leptina están mediados por la unión al receptor Ob-Rb que se expresa a nivel central mayoritariamente en el hipotálamo. El balance entre apetito y gasto calórico se obtiene mediante la activación de la proopiomelanocortina (POMC) ⁹². La POMC determina la producción de hormona estimulante-alfa de los melanocitos que una vez unida a los receptores 3 y 4 de la melanocortina reduce el apetito y estimula el gasto energético. En individuos delgados el ayuno disminuye la concentración de leptina mientras que la hiperalimentación aumenta sus niveles. Por el contrario, en los pacientes obesos este mecanismo fisiológico se ve afectado ⁹¹. Esta observación sugiere una resistencia a la leptina a nivel del hipotálamo y de los órganos metabólicos, en esta población ⁹¹. Los niveles circulantes de leptina son proporcionales a la cantidad de tejido adiposo y se incrementan con la obesidad. La leptina es filtrada y eliminada a nivel renal por lo que sus niveles se incrementan en la ERC, siendo uno de los mediadores que se ha vinculado al ambiente aterogénico de la misma ⁹³.

En relación a la leptina y proteinuria las células renales expresan mayoritariamente una isoforma corta del receptor Ob-Ra. La exposición por corto tiempo a la leptina es capaz de inducir la síntesis de factor de crecimiento alfa-1, el que determina proliferación endotelial a nivel glomerular ⁹³. Sin embargo, la exposición por tiempo prolongado se ha vinculado a regulación en menos de la expresión glomerular de colágeno tipo I y tipo IV en células mesangiales y del endotelio glomerular, con depósito de matriz extracelular, glomeruloesclerosis y un incremento significativo de la proteinuria independiente de los incrementos de la presión arterial ⁹¹. A nivel de las células endoteliales glomerulares, la leptina estimula la proliferación celular e incrementa la síntesis de colágeno tipo IV. En las células mesangiales incrementa

la síntesis de colágeno tipo I. Estos cambios estructurales pueden vincularse al desarrollo de enfermedad glomerular en el contexto de la obesidad ⁹¹.

Leptina y daño tubular. A nivel experimental la exposición prolongada a leptina induce apoptosis en células tubulares renales *in vitro* a través de un incremento en la expresión de prostaglandina E2 mediada por cicloxigenasa-2 ⁷².

El **factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)**, una citokina inflamatoria, se encuentra elevado a nivel sistémico en pacientes obesos y juega un rol fundamental en la insulinoresistencia derivada de la obesidad ⁷². Niveles elevados de receptor de TNF- (se han asociado con un descenso en el filtrado glomerular en pacientes con diabetes tipo 2 e IMC>30 Kg/m². A nivel experimental se encontró que los niveles elevados de TNF-(determinan cambios en el citoesqueleto podocitario y en la membrana basal glomerular. Junto con la presencia de macrófagos y niveles elevados de interleukina 1, el TNF- α es capaz de suprimir la actividad del gen promotor de la nefrina pudiendo por este mecanismo explicarse la alteración podocitaria que ocurre cuando se elevan sus niveles en la obesidad ⁹¹.

La **interleukina 6 (IL-6)** es otra molécula inflamatoria que se encuentra elevada en pacientes obesos y que se ha relacionado a la presencia de insulinoresistencia ⁹¹. En pacientes con ERC el incremento de la masa grasa se acompaña de un aumento en los niveles circulantes de IL-6. Asimismo sus niveles plasmáticos guardan correlación inversa con los niveles circulantes de adiponectina plasmática ⁹³. Si bien el mecanismo por el que determina lesión renal permanece aún desconocido estos cambios metabólicos vinculados a su fisiología posiblemente están involucrados ⁹⁰.

La expresión de **moléculas de adhesión** a nivel de las células endoteliales está incrementada en pacientes con insulinoresistencia y enfermedad renal ⁹⁰. A nivel experimental se ha observado que la expresión de moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1 juega un rol central en la infiltración glomerular por macrófagos en la nefropatía diabética ⁹¹. Los niveles séricos de moléculas como ICAM-1, VCAM-1, P-selectina y E-selectina están incrementados en pacientes obesos y con nefropatía diabética. Se estima que estas moléculas en el contexto de la obesidad generan cambios morfológicos y funcionales renales secundarios a la infiltración macrofágica ⁹¹.

El **sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA)** también participa en el desarrollo de enfermedad renal en el contexto de la obesidad ⁹³. Múltiples estudios han identificado un sistema RAA nativo a nivel del tejido adiposo visceral de pacientes con obesidad ⁹⁰. La disminución en el peso corporal (de al menos 5%) se ha correlacionado con disminución en los niveles plasmáticos de angiotensinógeno, renina y aldosterona en pacientes obesos, con disminución de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y la expresión de angiotensinógeno a nivel de la grasa visceral ⁹¹. Adicionalmente el tejido adiposo segrega factores secretantes de mineralocorticoides, los que determinan la producción de angiotensina II a nivel suprarrenal de forma independiente ⁹⁰. Además de los conocidos efectos vinculados a la aldosterona, esta hormona es capaz de disminuir la expresión de nefrina y podocina a nivel podocitario determinando así daño glomerular ⁹¹.

La **resistencia a la insulina** vinculada a la obesidad es una importante relacionada con el daño renal en este contexto ⁹¹, ya que es un potente factor asociado al desarrollo de albuminuria en pacientes no diabéticos ⁹⁰. Incluso la hiperinsulinemia por sí sola se ha asociado al desarrollo de albuminuria en pacientes sanos y en diabéticos tipo 2. Los podocitos expresan transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 ⁹¹. La fosforilación de alguna de las moléculas vinculadas a estos transportadores se ha asociado a resistencia a la insulina a nivel renal y determina que los podocitos respondan a la insulina lo que incrementa la susceptibilidad al daño celular a ese nivel. También se ha asociado a una regulación a la baja en la expresión de la nefrina, con los cambios estructurales a nivel podocitario que de ello se derivan ⁹⁰. La insulina asimismo determina afectación directa de canales de calcio vinculados a los podocitos lo que altera la red de actina podocitaria con cambios estructurales a dicho nivel ⁹¹.

1.1.8.4 El estrés oxidativo en el daño renal

El estrés oxidativo describe un estado de daño causado por las especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas representan un tipo de moléculas que derivan del metabolismo del oxígeno y existen en todos los organismos aeróbicos. La mayoría

son de origen endógeno y son subproductos de reacciones normales y esenciales, como la generación de energía mitocondrial ⁹⁵.

Existen mecanismos de defensa contra el daño inducido por EROs. Uno de estos son las enzimas intracelulares: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, que descomponen el radical superóxido en H_2O_2 y este en H_2O y O_2 .

La superóxido dismutasa es una enzima esencial para la vida aeróbica, se encuentra en la mitocondria donde contiene manganeso, y en el citoplasma, donde contiene manganeso y cobre. Transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno. Este peróxido puede ser metabolizado por dos enzimas diferentes: la glutatión peroxidasa, única enzima humana que contiene selenio ⁹⁵, y que oxida el glutatión, reduciendo de esta manera el peróxido de hidrógeno; la catalasa, por otra parte, descompone el H_2O_2 en H_2 y O_2 ⁹⁵.

Respecto a las Alteraciones renales asociadas durante la última década se ha dedicado considerable esfuerzo a investigar el papel de los radicales libres en la patogenia de las enfermedades. En el caso del riñón, el estrés oxidativo representa un punto de convergencia del mecanismo de daño renal provocado por nefropatías resultantes de muy diversas etiologías ⁹⁶. Así, el daño que puede sufrir el riñón expuesto a isquemia, agentes nefrotóxicos o infecciosos, como también a obstrucciones de la vía urinaria, se asocia a un predominio pro-oxidante respecto a las defensas antioxidantes ⁹⁶. Blanco frecuente del ataque de los agentes pro-oxidantes son los lípidos de las membranas de las células renales, ocasionando la peroxidación de estos. Esta lipoperoxidación compromete la integridad de la membrana basal y del epitelio de los órganos, por lo que también puede afectar las funciones de transporte realizadas en el túbulo renal ⁹⁷. Se ha evidenciado que el estrés oxidativo (EO) está involucrado en varios estados patológicos como enfermedades cardiovasculares, infecciosas, cáncer, diabetes y trastornos neurodegenerativos ⁸⁰. Estas enfermedades tienen mayor incidencia en la uremia y en particular en los pacientes sometidos a diálisis, lo cual podría constituir una evidencia que apunta hacia la probable existencia de un aumento de la exposición a EO en el curso de un deterioro renal crónico ⁹⁷.

Cuando se estudian los mecanismos fisiopatológicos básicos de los trastornos renales se aprecia que en todos están presentes factores que predisponen al desequilibrio oxidativo ⁹⁷. Los fenómenos isquémicos o tóxicos que pueden dañar al túbulo de manera aguda, así como el daño glomerular de origen inmunológico, pueden acompañarse de la generación excesiva de especies reactivas del oxígeno (EROs) ⁹⁸.

Brevemente diremos que el EO aparece en las células y tejidos cuando existe una perturbación del equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras ⁹⁹. Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son los radicales libres derivados del oxígeno que son especies intermedias de las reacciones químicas, y que se diferencian de otras especies químicas, en que tienen orbitales con electrones desapareados ¹⁰⁰. Esto les hace ser extraordinariamente inestables y reactivas, y su avidez por electrones para completar el orbital, es lo que provoca sus ataques a estructuras moleculares. Entre las principales EROs destacan el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (OH⁻), el oxígeno singlete (1O₂⁻) y el ácido hipocloroso (HOCL) ¹⁰⁰.

1.1.9 Marcadores de funcionalidad hepática, cardiovascular y renal

1.1.9.1 Marcadores de funcionalidad hepática

El hígado lleva a cabo varias funciones bioquímicas, de síntesis y de excreción, por lo cual no hay una prueba que tenga la capacidad de detectar el estado de la función total del hígado ¹⁰¹. Para esto se utilizan un conjunto de pruebas, denominadas pruebas de función hepática. Para una correcta interpretación de las pruebas hepáticas, es necesario acompañarlas de una historia clínica completa y de un examen físico apropiado, y muchas veces recurrir a las pruebas imagen incluso a la biopsia siguientes ¹⁰¹. Las enfermedades hepáticas son comunes y muchas veces silenciosas, y son una causa importante de muerte en el mundo. Las principales entidades asociadas a daño hepático incluyen las enfermedades virales, la esteatohepatitis no alcohólica y el exceso de alcohol, entre otras ¹⁰².

Las pruebas de función hepática se utilizan en general para: 1) determinar presencia o ausencia de daño hepático; 2) realizar diagnósticos específicos; 3) determinar la severidad y establecer pronóstico; y 4) monitorizar el curso de la enfermedad hepática ¹⁰².

Algunas pocas pruebas hepáticas miden funciones fisiológicas identificables, como ocurre con la bilirrubina, la albumina y el tiempo de protrombina, mientras la mayoría no mide una función específica sino que indica la presencia de daño y la falta de permeabilidad de las vías biliares ¹⁰¹. Entre estas pruebas están las aminotransferasas, la gamma glutamil transpeptidasas y la fosfatasa alcalina. Por último, están las pruebas que evalúan la reacción al daño hepático, como las globulinas o los anticuerpos tisulares, y las pruebas que apuntan a una etiología específica, como son los marcadores de infección viral ¹⁰¹.

Las pruebas de función hepática no deben interpretarse como resultados anormales aislados, sino utilizando paneles con patrones característicos que permitan identificar o aproximarnos al diagnóstico de las enfermedades hepáticas ¹⁰².

El primer paso en la evaluación de disfunción hepática es determinar la presencia o ausencia de daño hepático, segundo paso, decidir si el daño es necrosis celular o colestasis; el tercero es identificar la enfermedad particular y el cuarto paso, determinar la severidad siguientes ¹⁰¹.

Detección de enfermedad hepática

En ausencia de cualquier sospecha clínica, la combinación de unos resultados normales de ALT, ALP, fosfatasa alcalina y bilirrubina total y directa, prácticamente excluyen enfermedad hepática activa; por otro lado, la presencia de cualquier anomalía en alguna de ellas, por ligera que sea, no excluye enfermedad hepática ¹⁰³.

Tabla 1.- Pruebas de función hepática

Necrosis celular	<ul style="list-style-type: none"> • Alanino aminotransferasa (ALT) • Aspartato aminotransferasa (AST) • Relación AST/ALT • Deshidrogenasa láctica (LDH)
Colestasis	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina • Gamma-glutamilttransferasa (GGT)
Metabolismo aniónico orgánico	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina total • Bilirrubina directa
Metabolismo aniónico orgánico	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina total • Bilirrubina directa
Síntesis proteica	<ul style="list-style-type: none"> • Albúmina • Tiempo de protrombina (TP)
Pruebas inmunológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Globulinas totales • Anticuerpos antinucleares • Anticuerpos anti-músculo liso • Inmunoglobulinas • Anticuerpos antimitocondriales • Anticuerpos antimicrosoma hepático-renal tipo 1 (LKM-1)
Marcadores virales para Hepatitis A	<ul style="list-style-type: none"> • HAV total • HAV IgM
Marcadores virales para Hepatitis B	<ul style="list-style-type: none"> • HBsAg • Anti-HBc total • Anti-HBc IgM • HBe Ag • Anti-HBe IgG • Anti-HBs IgG
Marcadores virales para Hepatitis C	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-HCV • RIBA (ensayo inmunoblot recombinante) • Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)
Marcadores genéticos para hemocromatosis hereditaria	<ul style="list-style-type: none"> • Saturación de transferrina • Ferritina • Mutación C282Y/H16BD • Índice de hierro hepático
Marcadores genéticos para enfermedad de Wilson	<ul style="list-style-type: none"> • Ceruloplasmina sérica • Cobre urinario
Marcadores genéticos para deficiencia de alfa 1 antitripsina	<ul style="list-style-type: none"> • Electroforesis de proteínas séricas • Alfa 1-antitripsina sérica • Análisis fenotípico

Algunos análisis de la función hepática frecuentes son los siguientes:

Alanina transaminasa (ALT). La ALT es una enzima que se encuentra en el hígado y que ayuda a convertir las proteínas en energía para las células hepáticas. Cuando el hígado está dañado, se libera ALT al torrente sanguíneo y aumentan sus niveles ¹⁰¹.

- **Aspartato transaminasa (AST).** La AST es una enzima que ayuda a metabolizar los aminoácidos. Al igual que la ALT, la AST normalmente está presente en la sangre en niveles bajos. Un aumento en los niveles de AST puede indicar daño o enfermedad del hígado o daño muscular ¹⁰¹.
- **Fosfatasa alcalina (ALP).** La ALP es una enzima que se encuentra en el hígado y los huesos y es importante para descomponer las proteínas. Si los

niveles de ALP son más altos de lo normal, es posible que el hígado presente alguna enfermedad o daño, como una vía biliar obstruida o ciertas enfermedades óseas ¹⁰¹.

- **Albúmina y proteína total.** La albúmina es una de las diversas proteínas producidas en el hígado. El cuerpo necesita estas proteínas para combatir infecciones y realizar otras funciones. Si los niveles de albúmina y de proteína total son más bajos de lo normal, es posible que el hígado presente alguna enfermedad o daño ¹⁰¹.
- **Bilirrubina.** La bilirrubina es una sustancia producida durante la descomposición de los glóbulos rojos. La bilirrubina pasa a través del hígado y se expulsa en las heces. Si los niveles de bilirrubina (ictericia) son elevados, es posible que el hígado presente alguna enfermedad o daño, o la presencia de ciertos tipos de anemia ¹⁰¹.
- **Gamma-glutamyl-transferasa (GGT).** La GGT es una enzima de la sangre. Si los niveles son más altos de lo normal, es posible que el hígado o las vías biliares estén dañados ¹⁰¹.
- **Lactato deshidrogenasa (LD).** La LD es una enzima que se encuentra en el hígado. Si los niveles son altos, es posible que el hígado esté dañado, pero esto también ocurre en otros trastornos ¹⁰¹.
- **Tiempo de protrombina (TP).** El TP es el tiempo que tarda la sangre en coagularse. Un aumento del TP puede indicar daños en el hígado, pero también puede deberse a la toma de determinados medicamentos anticoagulantes, como warfarina ¹⁰¹.

Tabla 2.- Resultados normales en los análisis de sangre de función hepática

ALANINA TRANSAMINASA (ALT)	De 7 a 55 unidades por litro (U/L)
ASPARTATO TRANSAMINASA (AST)	De 8 a 48 U/L
FOSFATASA ALCALINA (ALP)	De 40 a 129 U/L
Albumina	De 3,5 a 5,0 gramos por decilitro (g/dl)
Proteína total	De 6,3 a 7,9 g/dl
Bilirrubina	De 0,1 a 1,2 miligramos por decilitro (mg/dl)
GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA (GGT).	De 8 a 61 U/L
LACTATO DESHIDROGENASA (LD).	122 a 222 U/L
TIEMPO DE PROTROMBINA (TP).	9,4 a 12,5 segundos

1.1.9.2 Marcadores de funcionalidad cardiovascular

Marcadores de obesidad

Los marcadores de diagnóstico para la obesidad son principalmente el Índice de Masa Corporal (IMC), que en humanos se obtiene a partir de la fórmula peso (kg)/talla(m²). La evidencia indica que lo más apropiado sería medir la grasa corporal total y la circunferencia de cintura/cadera y no solo el IMC ya que puede subestimar o sobreestimar el diagnóstico de la obesidad debido a que utiliza el peso total como denominador, por lo tanto, sujetos con mayor masa muscular y poca grasa serán diagnosticados como obesos o con sobrepeso (IMC \geq 30= obesidad) ¹⁰⁴. Y por otra parte los individuos que presentan IMC normal (IMC=18.5 - 24.9) o sobrepeso (IMC \geq 25-29.9), pero con una distribución anormal de la grasa corporal podrían estar en riesgo elevado de eventos cardiovasculares ¹⁰⁵.

En cuanto a medidas de obesidad en roedores encontramos principalmente:

- ✓ Longitud Hocico-Año (LHA)

Medición obtenida al posicionar al animal de manera recta sobre una base plana, tomando la longitud representada desde el hocico hasta el ano, empleando un vernier profesional. Siendo expresado en centímetros ¹⁰⁶.

✓ Índice de Lee

Este índice fue utilizado por ¹⁰⁷ y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal (g)}}}{\text{Longitud Hocico Ano (cm)}}$$

Es ampliamente utilizado en investigaciones como un predictor de obesidad.

Electrocardiograma como marcador de riesgo cardiovascular

La Sociedad Europea de Hipertensión recomienda que el electrocardiograma debería formar parte de las técnicas de diagnóstico en todos los pacientes con alteraciones metabólicas ¹⁰⁸.

En la práctica clínica el estudio electrocardiográfico es una herramienta fiable y un marcador importante para monitorizar la correcta función del corazón. Diferentes estudios han demostrado una relación entre pacientes con SMet y el desarrollo de fibrosis miocárdica ^{108 109}. El complejo QRS fragmentado (QRSf) representa un retraso en la conducción ventricular causada por una cicatriz o fibrosis miocárdica lo que podría asociarse a un mayor riesgo de muerte súbita en pacientes con insuficiencia cardiaca y eventos arrítmicos ^{109 84}.

Estudios en animales reportan que la neuropatía autonómica diabética (NAD) muestra alteraciones en el estudio electrocardiográfico en la amplitud de la onda R y ensanchamiento del intervalo QTc ¹¹⁰, la alteración de estos intervalos es signo de progresión de enfermedad cardiovascular y arritmias ventriculares ¹¹¹.

La aterosclerosis coronaria y la hipertrofia ventricular izquierda en el SMet está relacionada con hiperglucemia en ayuno y esto a su vez se correlaciona

positivamente con una alteración del intervalo QT y QT corregido (QTc). Según este índice se puede utilizar como un marcador de efectivo de riesgo cardiovascular ¹¹².

- Marcadores de aterogénesis y proceso inflamatorio

La aterosclerosis es un proceso crónico inflamatorio, la acumulación de lipoproteínas de baja densidad en el espacio subendotelial parecen ser los primeros episodios de desarrollo de lesión aterosclerótica ¹¹¹.

Uno de los marcadores más utilizados para diagnosticar el riesgo de aterogénesis es el índice aterogénico, que resulta de la proporción entre los niveles de colesterol total y colesterol HDL. Se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula y el resultado expone el riesgo del paciente (Tabla x) ¹¹³.

$$IA = (\text{colesterol total} - \text{colesterol HDL}) / \text{colesterol HDL}$$

Tabla 3.- Relación entre el Índice aterogénico y el riesgo de enfermedad cardiovascular

ECV Valor calculado	Riesgo de ECV
Menor de 3.5	Riesgo bajo
3.5 - 5.0	Riesgo normal
5.1 - 9.6	Riesgo moderado
9.7 a 24	Riesgo alto

Un marcador de riesgo de ECV es la prueba de proteína C reactiva (PCR) de alta densidad que evalúa el riesgo de padecer enfermedad cardíaca, mide la cantidad de inflamación presente en el cuerpo, es probablemente la prueba de medición de inflamación más sensible y es necesario realizar simultáneamente un análisis del perfil lipídico (Espínola Klein y col., 2007). La lectura normal de la prueba debe ser inferior a 2mg/L ¹¹¹.

La tasa de sedimentación de eritrocitos/ velocidad de sedimentación globular (VSG) se considera otro marcador para analizar los procesos inflamatorios. Esta prueba mide la velocidad de caída de los eritrocitos en el tubo de ensayo ¹¹⁴. En un proceso

inflamatorio diversas sustancias como citoquinas, interleucinas, fibrinógeno, alfa-macroglobulinas e inmunoglobulinas se secretan en la sangre lo que genera un aumento de la agregación eritrocitaria formando complejos más densos y como consecuencia un descenso más rápido en comparación con una célula individual. Determina si el nivel de inflamación aumenta o disminuye ¹¹⁴.

1.1.9.3 Marcadores de funcionalidad renal

Filtración glomerular y aclaramiento renal de creatinina

Las enfermedades renales normalmente cursan de forma asintomática, la función renal se puede medir por medio de analíticas comunes ¹¹⁵. La valoración clínica de la función renal analiza los siguientes marcadores:

- Medida de filtración glomerular (FG) y la concentración plasmática de creatinina (Cr) y de urea (U)
- Determinación de la concentración de iones en plasma y en orinae
- Análisis de la osmolaridad plasmática y urinaria
- Valoración del equilibrio ácido - base plasmático
- Proteinograma plasmático y proteinuria
- Hemograma, calcemia, fosforemia y fosfatasa alcalina
- Uroanálisis, sedimento y cultivo de orina

Las enfermedades renales afectan la funcionalidad de las nefronas, dañando al glomérulo, manifestándose en una alteración en la tasa de filtración glomerular o una pérdida de proteínas o células por orina¹¹⁵.

La función renal se evalúa estimando la tasa de filtración glomerular (TGF) mediante fórmulas basadas en marcadores endógenos como la creatinina sérica, urea o la Cistatina C y otras variables como peso, edad y género ¹¹⁵. La filtración glomerular (FG) se puede medir por diferentes pruebas prácticas (Tabla 4).

Tabla 4.- Pruebas clínicas de valoración de FG

Pruebas	Valor normal
Filtración glomerular (ml/min/1.73m ²)	Hombre 124 ± 25 Mujer 119 ± 13
Aclaramiento de creatinina (ml/min/1.73m ²)	90 - 130
Creatinina sérica (mg/dl)	0.5 - 1.1
Aclaramiento de urea (ml/min/1.73m ²)	60 - 100
Urea sérica	5 - 50
Cistatina C (mg/l)	< 0.96
Densidad urinaria (12h sin líquidos)	> 1025
Osmolaridad urinaria (12h sin líquidos)	> 800
U/P osmolar	> 3.1

La creatinina se produce por la conversión de la creatina muscular en el hígado y se filtra libremente por el glomérulo, su excreción la regulan las células del túbulo proximal, por lo que el aclaramiento de creatinina excede la filtración glomerular y los valores se elevan proporcionalmente menos de lo que empeoran la funcionalidad renal ¹¹⁶.

Además de la secreción tubular, la creatinina sérica tiene otras formas de degradación que pueden alterar su interpretación, la masa muscular y la ingesta dietética son los principales componentes de su formación y probablemente estén relacionados con una mayor variación en los resultados de las pruebas clínicas. Otras maneras de degradación son la eliminación extrarrenal por bacterias intestinales y también algunos fármacos pueden elevar los niveles de creatinina sérica sin que descienda de forma real el filtrado glomerular ¹¹⁵.

El aclaramiento renal de creatinina sirve para valorar el grado de insuficiencia renal en un individuo, se realiza una extracción sanguínea y una recogida de orina de 24 horas aplicando la siguiente fórmula:

$$CCr \text{ (ml/min)} = UCr \text{ (mg/dL)} \times Vol \text{ (ml/min)} / PCr \text{ (mg/dl)}$$

Donde:

- UCr = Creatinina en orina
- Vol = Vol. min urinario
- PCr = Concentración de creatinina en plasma

Albuminuria

La albúmina es la principal proteína sérica, tiene un peso molecular de 69.000 y está negativamente cargada, por estas características no se filtra normalmente, es un biomarcador de disfunción glomerular. La microalbuminuria es un marcador precoz para nefropatía diabética y mortalidad cardiovascular ¹¹⁷. Se identifica como un factor de riesgo significativo en ER según lo que determina la TFG reducida ¹¹⁸. La albuminuria se asocia con la progresión de enfermedad renal crónica y la aparición de eventos cardiovasculares ¹¹⁹. El aumento de albuminuria basal y los niveles elevados de albuminuria se asocian significativamente con el tiempo para enfermedad renal terminal ¹²⁰.

La albuminuria se clasifica por el sistema KDIGO, la Sociedad Española de Nefrología lo valida (Tabla 14). Se define como la presencia de valores entre 30-300mg/24horas confirmados en 2 o 3 determinaciones ¹²¹.

Tabla 5.- Escala KDIGO. Categorías, descripción y rangos de albuminuria

Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (ml/min/1,73 m ²)			Albuminuria Categorías, descripción y rangos		
			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
			< 30 mg/g ^a	30-300 mg/g ^a	> 300 mg/g ^a
G1	Normal o elevado	≥ 90		Monitorizar	Derivar
G2	Ligeramente disminuido	60-89		Monitorizar	Derivar
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59	Monitorizar	Monitorizar	Derivar
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44	Monitorizar	Monitorizar	Derivar
G4	Gravemente disminuido	15-29	Derivar	Derivar	Derivar
G5	Fallo renal	< 15	Derivar	Derivar	Derivar

Minerales y pH en relación a formación de cálculos renales

En la enfermedad renal crónica existen alteraciones comunes en el metabolismo óseo caracterizados por hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario y riesgo de fractura ¹²². Los principales minerales que se ven alterados son el calcio y el fósforo además de la vitamina D. El desequilibrio de estos compuestos se diagnostica mediante pruebas analíticas donde se evalúan los niveles en sangre y orina de calcio, fósforo y calcifediol ¹²².

Los niveles de calcio en suero deben mantenerse entre 8 y 10.5mg/dL y su equilibrio depende de la parathormona (PTH) la vitamina D y la calcitonina. Los niveles normales de fósforo en suero oscilan entre 2.5 y 4.5mg/dL y para medir el fosfato en orina, es necesario recogerlo durante 24 horas por su amplia variación diurna ¹²².

La litiasis renal o cálculos renales se pueden formar en los cálices y en la pelvis renal, los uréteres y la vejiga, su tamaño puede ser variable, apenas visibles o los llamados “asta de ciervo” por su forma. Su eliminación dependerá de su tamaño, los más pequeños pueden ser expulsados por orina, sin embargo, este tratamiento es sumamente doloroso para el paciente. Los más grandes requieren de ondas ultrasónicas (litotricia) para romper los más pequeños y poder ser eliminados por la orina. En casos muy severos se puede emplear la extirpación quirúrgica ¹²³.

El 75% de los cálculos renales están compuestos por oxalato de calcio o fosfato. Estos cálculos se asocian con frecuencia a trastornos metabólicos de calcio y fósforo, pero la dieta y la obesidad también pueden estar relacionadas ¹²⁴.

La evaluación del pH urinario y un análisis de orina de 24 horas proporcionan información sobre los factores que forman el cálculo y pueden guiar el tratamiento y prevención. El pH urinario es el factor más destacado que precede a la formación de cálculos renales. En condiciones de normalidad el pH de la orina es superior a 7 ¹²⁴.

La prevención de litiasis renal por oxalatos de calcio, cistina y ácido úrico, está relacionado con alcalinizar la orina por medio de una dieta compuesta por alimentos con propiedades alcalinizantes como algunas frutas, verduras y legumbres, también es importante un adecuado tratamiento farmacológico ¹²⁵.

1.1.10 Síndrome metabólico

1.1.10.1 Definición y bases para el diagnóstico

El concepto de síndrome metabólico ha evolucionado mucho desde su introducción en la década de los años 1920 hasta la actualidad ¹²⁶. Aunque los distintos organismos y grupos de expertos científico-médicos no coinciden exactamente en su definición ni en sus componentes, atendiendo a criterios clínicos y epidemiológicos, la mayoría conviene en considerarlo como un desorden metabólico que agrupa toda una serie de alteraciones metabólicas y funcionales estrechamente relacionadas entre sí, incluyendo como principales: obesidad de distribución central, resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica, con elevación de triglicéridos y disminución de colesterol-HDL e hipertensión ^{126 54 127}.

Tabla 6.- Clasificaciones para el diagnóstico de SMet.

	OMS 1999	EGIR 1999	NCEP 2001
	Diabetes o ITG o RI	RI o hiperinsulinemia (en no DM)	Tres de los siguientes
	Más dos de los siguientes	Más dos de los siguientes	
Alteración del metabolismo de la glucosa		GBA > 110 mg/dl	GBA > 110 mg/dl
Dislipemia	TG > 150 mg/dl y/o HDL • < 35 mg/dl (hombres) • < 38,7 mg/dl (mujeres)	TG > 175 mg/dl y/o HDL o dislipemia tratada	TG > 150 mg/dl y/o HDL • < 40 mg/dl (hombres) • < 50 mg/dl (mujeres)
PA elevada	PA > 140/90 mmHg y/o necesidad de medicación	PA > 140/90 mmHg y/o necesidad de medicación	PA > 130/85 mmHg y/o necesidad de medicación
Obesidad	IMC > 30 y/o • ICC > 0,9 (hombres) • ICC > 0,85 (mujeres)	Obesidad central Perímetro cintura • > 94 cm (hombres) • > 80 cm (mujeres)	Obesidad central Perímetro de cintura • > 102 cm (hombres) • > 88 cm (mujeres)
Otros	Microalbuminuria		

ITG: intolerancia a la glucosa; RI: resistencia a insulina; GBA: glucemia basal alterada; TG: triglicéridos; PA: presión arterial; ICC: índice cintura cadera.

1.1.10.2 Prevalencia

Debido a la diversidad de criterios que definen esta patología establecidos por las diferentes organizaciones, existe una gran variación en la prevalencia según los diferentes criterios empleados y una gran dificultad para comparar la prevalencia entre distintas poblaciones ¹²⁸. Por ejemplo, en Australia según los criterios de la OMS la prevalencia es de 20,9%; según ATPIII es de 18,3% y según EGIR 15,9%. En México la diferencia es aún mayor, siendo la prevalencia según los criterios de la OMS 13,6% y según ATPIII 26,6% ¹²⁸.

Por lo tanto, es complicado determinar la prevalencia de esta patología y realizar comparaciones precisas entre países. Aun así, se estima que el 20-25% de la población padece de este síndrome ¹²⁹. Aunque la prevalencia de este síndrome no sea establecida de forma precisa, ha sido observado un aumento de la misma en los últimos años ¹²⁸.

1.1.10.3 Fisiopatología

La patogénesis de este síndrome está relacionada con la obesidad. El acúmulo de tejido adiposo en la obesidad conlleva a la liberación de ácidos grasos libres (AGL) ⁵⁴.

Estos AGL provocan un aumento de la producción de glucosa, triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) y disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a nivel hepático. Además, los AGL reducen la sensibilidad a la insulina en el tejido muscular y con ello inhibe la absorción de glucosa por medio de la insulina ⁵⁵. Como consecuencia de ello, se produce un aumento de la degradación de glucógeno a glucosa y un aumento de la acumulación de lípidos en forma de triglicéridos (TG) a nivel hepático ⁵⁵.

Debido a la resistencia a la insulina, hay un aumento de la glucosa en sangre. Para equilibrar la glucemia, aumenta la secreción de insulina, generando una hiperinsulinemia ⁵⁶. La hiperinsulinemia podría producir un incremento de la reabsorción del sodio y de la actividad del sistema nervioso simpático, contribuyendo al aumento de la tensión arterial ⁵⁵. Además, existe un efecto paracrino y endocrino sobre el estado proinflamatorio que se superpone y contribuye a la insensibilidad a la insulina inducida por el exceso de AGL. Las células de tejido adiposo, como los adipocitos y los macrófagos derivados de los monocitos, aumentan la secreción de interleucina-6 (IL-6) y otras citoquinas y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) generando un aumento de la insensibilidad a la insulina y de la lipólisis de los TG almacenados en el tejido adiposo, produciendo AGL circulantes ⁵⁶. Las citoquinas también podrían incrementar la producción de glucosa y VLDL en el hígado y aumentar la producción de fibrinógeno y de inhibidores del activador del plasminógeno (PAI-1) en el hígado, que se suma a la superproducción de PAI-1 por parte del tejido adiposo; conllevando a un estado protrombótico ⁵⁷.

Existe un acuerdo generalizado en que cada uno de los componentes del SM se relaciona con cambios en el estilo de vida ⁶⁰. El sedentarismo, el desequilibrio entre la energía ingerida y la gastada, y la ingesta elevada de algunos alimentos a costa de otros, se asocian con la presencia de cada uno de los componentes. Sin duda pues, la

prioridad preventiva/terapéutica en el SM se centra en la reducción de peso y para ello los cambios en el estilo de vida son ineludibles ⁶⁰⁶⁰.

1.2 Tratamiento de la obesidad

Los objetivos terapéuticos de la pérdida de peso están dirigidos a mejorar o eliminar las comorbilidades asociadas a la obesidad y disminuir el impacto de las futuras complicaciones médicas relacionadas con el exceso de peso. Se busca una pérdida del 5-10% del peso inicial y el mantenimiento de peso ¹³⁰. Las herramientas disponibles a nuestro alcance incluyen cambios en el estilo de vida (plan de alimentación, actividad física, modificación conductual) y la farmacoterapia ¹³⁰. Como se ha mencionado anteriormente, la dieta y la actividad física son los pilares para prevenir y tratar la obesidad y sus comorbilidades. En casos de especial gravedad, y en individuos previamente bien seleccionados tiene sus indicaciones la cirugía de la obesidad ¹³⁰.

1.2.1 Tratamiento no farmacológico

Los estilos de vida sedentarios, la urbanización y el acceso a alimentos industrializados y precocinados están creando una pandemia del SMet ¹³¹. Un cambio en los estilos de vida sedentarios y una reducción del exceso de peso es imprescindible para mejorar los signos y síntomas de enfermedades cardiovasculares y renales ¹³¹.

La restricción calórica y el ejercicio físico son hoy en día las dos principales terapias no farmacológicas en el tratamiento de la obesidad y el SMet ¹³⁰. El uso de ingredientes multifuncionales que tienen un beneficio demostrable en el tratamiento de pacientes con síndrome metabólico aún está bajo investigación y se sugieren como terapias de acompañamiento del tratamiento farmacológico ¹³⁰.

1.2.1.1 Restricción calórica

Una de las causas fundamentales del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías ingeridas y calorías gastadas. Se ha observado una tendencia universal a tener una mayor ingesta de alimentos hipercalóricos, ricos en grasa, sal y azúcares, pero al mismo tiempo pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes ¹³².

Todo lo cual favorece el desarrollo de esta patología. Por lo tanto, para la pérdida de peso se requiere un balance energético negativo ¹³³. Para conseguirlo se emplea una dieta hipocalórica y actividad física. Según SEEDO la restricción energética debe ser de 500 a 1.000 kcal/día respecto a la dieta habitual, lo que se traduce en una pérdida ponderal de 0,5-1,0 kg/semana. El aporte calórico no deber ser menor de 1.000-1.200 kcal/día en mujeres y 1.200-1.600 kcal/día en hombres ¹³³.

En cuanto al reparto calórico, en los pacientes obesos en general, y más concretamente con SM y NAFLD, se emplea una dieta alta en proteínas y baja en hidratos de carbono. La dieta hiperproteica además de inducir un mayor gasto energético derivado de su acción termogénica, también mejora la sensibilidad a la insulina, como se puede observar en el estudio de Piatti ¹³⁴. En este estudio se compararon dos dietas hipocalóricas, una dieta hiperproteica (45% proteínas, 35% hidratos de carbono y 20% grasa) y otra con alto contenido de hidratos de carbono (60% carbohidratos, 20% proteínas, 20% grasa). Aunque con ambas dietas se observó una disminución de la masa grasa, con la dieta rica en carbohidratos se observó también una disminución de la masa libre de grasa. Además, con la dieta hiperproteica se observó un aumento de la oxidación de glucosa y disminución de la oxidación lipídica ¹³³.

El estudio de Noakes et al. ¹³⁵ también confirma los beneficios de una dieta hiperproteica. En este estudio se realizó una comparación entre una dieta hipocalórica e hiperproteica frente a una dieta convencional alta en hidratos de carbono y baja en grasa. En el grupo tratado con una dieta hiperproteica se observó una mayor disminución de la masa grasa y TG plasmáticos. Además, junto a la pérdida de peso se observó un descenso de la glucosa plasmática, insulina, proteína C reactiva, AGL, colesterol LDL y HDL en ambos grupos ¹³⁵.

El contenido de proteínas en la dieta debe ser vigilado principalmente en la enfermedad renal ya que un exceso puede empeorar el diagnóstico y la progresión de la función renal¹³⁵.

La modificación de la dieta es una de las estrategias preventivas y de manejo esenciales, una reducción de la ingesta calórica de 500 a 1000 Kcal al día por un periodo de 6 a 12 meses representa una pérdida de peso significativa para la mejora de todos los síntomas ¹³³. Es importante una composición adecuada de macronutrientes y micronutrientes. Los objetivos de prevención de enfermedades cardiovasculares según la FAO/OMS recomienda que el consumo de grasa total en la dieta no debe sobrepasar el 30% de las calorías totales y, como máximo de este porcentaje, el 11% debe corresponder a grasas saturadas. También sugiere un consumo de 200-500mg de DHA (1 a 2 veces un consumo de alimentos ricos en DHA). Las dietas muy altas o bajas en grasas aumentan el riesgo de dislipidemia aterogénica (Rochlani y col., 2017).

Una dieta baja en hidratos de carbono sencillos ayuda en el tratamiento de la dislipidemia, la hiperglucemia y la hipertensión. Se recomienda que el contenido de hidratos de carbono en la dieta este dentro del 45 -65% de las calorías totales, y dentro de este porcentaje solo un 10% para los sencillos, en este sentido lo ideal sería elegir frutas, por su contenido de fibra, vitaminas y minerales, evitando los azúcares refinados o edulcorantes artificiales ¹³⁵.

1.2.1.2 Ejercicio físico

Es conocida la importancia de la práctica de ejercicio físico en la mejora y control de enfermedades crónicas, que junto a una alimentación saludable ofrecen como resultado un mayor efecto beneficioso para la salud.

Se ha demostrado que la actividad física presenta múltiples efectos beneficiosos, comenzando por una pérdida de peso, lo cual influye sobre la mejora de la resistencia a la insulina, disminuye la inflamación sistémica y reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular ⁶⁸.

Tabla7.- Beneficios del ejercicio físico

REDUCE	AUMENTA
El riesgo de cardiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares	Preserva la masa muscular y tonifica los músculos
El riesgo de desarrollar hipertensión y dislipemia	Incrementa la densidad mineral ósea, manteniendo los huesos y articulaciones más resistentes
El riesgo de desarrollar obesidad	Mejora la actividad del sistema inmunológico
El riesgo de desarrollar cáncer principalmente de colon y mama	Mejora la resistencia a la insulina
Ayuda a controlar sentimiento de ansiedad y depresión	Promueve el bienestar psicológico

Se han realizado numerosos estudios para determinar qué tipo de ejercicio es el más beneficioso para dichas patologías. Recientemente se ha demostrado que la actividad física aeróbica interválica de alta intensidad tiene grandes beneficios frente a otros tipos de ejercicio en la mejora del perfil lipídico y la obesidad ¹³⁶.

Más concretamente, el protocolo HIIT (High Intensity Interval Training) consiste en cortas pero intensas series de ejercicio intercaladas con breves periodos de pausa activa o pasiva, alcanzando valores de VO₂max de 80-85% ¹³⁷. La evidencia actual del impacto de este tipo de entrenamiento sobre la salud respalda la idea de que HIIT es un método que mejora la salud. Estos beneficios son debidos a que el alto nivel de consumo de oxígeno (VO₂máx) disminuye el impacto negativo del sobrepeso, hipertensión, o hipercolesterolemia ¹³⁷.

Los beneficios del ejercicio aeróbico interválico se ven potenciados por la realización de ejercicios de fuerza ¹³⁶. La combinación de ambos tipos de ejercicio conlleva mejoras del perfil lipídico y tolerancia a la glucosa mediadas por un aumento en la actividad enzimática responsable de la glucólisis y lipólisis asociado a una mayor activación de los transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT-4) y de los AG (FAT/CD36), mejora de la composición corporal, disminución de los marcadores de inflamación (IL-1, IL-10), mejora en la salud cardiovascular y activación de la vía mediada por AMPK, siendo la responsable del control metabólico y del gasto energético ¹³⁸.

Mecanismo de acción del ejercicio físico

Se hace preciso estudiar la fisiología del deporte y para comprender los mecanismos que regulan las respuestas fisiológicas del cuerpo.

El músculo esquelético satisface sus necesidades energéticas a partir de los nutrientes de la dieta, principalmente de hidratos de carbono y grasas, estos sustratos se transforman en adenosina trifosfato (ATP) a partir de esta molécula se obtiene la energía necesaria para realizar cualquier movimiento o entrenamiento¹³⁹. La célula presenta tres rutas metabólicas para sintetizar ATP; a partir de fosfocreatina (PCr), la glucólisis anaeróbica con la transformación del glucógeno muscular en lactato y la fosforilación oxidativa ¹⁴⁰.

El ejercicio físico puede estimular la secreción dentro del músculo esquelético de cientos de sustancias como proteínas, factores de crecimiento, citocinas, metalopeptidasas y provocar la miogénesis ¹⁴⁰. Las moléculas derivadas de los músculos que ejercen un efecto endocrino o paracrino en el cuerpo se denominan “mioquinas” y son las responsables y mediadoras de los efectos del ejercicio físico en la salud ¹⁴¹.

Una de las primeras mioquinas en ser descrita fue la miostatina, esta es un potente inhibidor del crecimiento muscular, según lo descrito, los ejercicios de resistencia crónica reducen su expresión. Su aumento puede contribuir a la resistencia a la insulina y obesidad ¹⁴². La IL-6 es otra mioquina que aumenta con la intensidad y duración del ejercicio, pero disminuye con el daño muscular y la ingestión de carbohidratos. El entrenamiento aumenta la sensibilidad del receptor de IL-6 en los músculos ejerciendo una acción local en ellos o de manera periférica similar a las hormonas, mediando efectos metabólicos, antiinflamatorios o inmunomoduladores. La IL-6 tiene acciones similares a la leptina, tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo aumenta la absorción de glucosa y mejora la oxidación de lípidos ¹⁴³. En las enfermedades cardiometabólicas los efectos del ejercicio pueden liberar mioquinas como la IL-6 creando un entorno saludable para inducir la liberación de otras citoquinas antiinflamatorias como el antagonista del receptor de Interleucina 1 (IL-1RA) e inhibir la citoquina proinflamatoria TNF-alfa. Otro tipo de mioquina inducida por la contracción muscular es la Interleucina - 15 (IL-15), sus efectos

principales son anabólicos y anticatabólicos locales, esta mioquina tiene un efecto antiobesogénico, por lo tanto se considera un mediador de los efectos del ejercicio contra la obesidad ¹⁴³.

1.2.2 Tratamiento farmacológico

El tratamiento convencional para la obesidad incluye dieta y ejercicio, así como intervenciones quirúrgicas. Sin embargo, estos métodos tienen sus limitaciones, por lo que es necesario disponer de fármacos que coadyuven en el tratamiento y para mantener las pérdidas de peso en el largo plazo. La GPC-DxTxSOE recomienda iniciar farmacoterapia en aquellas personas con un IMC > 30 kg/m² o un IMC de 27-29.9 kg/m² con comorbilidades, tales como hipertensión, diabetes o dislipidemia, que no han logrado perder al menos el 5% de su peso corporal total a los 3 o 6 meses tras una adecuada intervención de cambios en el estilo de vida ¹⁴⁴.

El tratamiento farmacológico va dirigido a los siguientes objetivos: Reducir el apetito, alterar la absorción de nutrientes o incrementar la termogénesis ¹⁴⁵. Aún con tratamiento farmacológico se debe continuar con los cambios en el estilo de vida, porque de no hacerlo, la pérdida de peso es menor ¹⁴⁶.

Las hormonas y fármacos empleados en el tratamiento de la obesidad de acuerdo con su mecanismo de acción, pueden clasificarse de la siguiente forma:

- 1) Disminución de la absorción de lípidos.
- 2) Reducción de la ingesta de energía.
- 3) Reducción de la masa o grasa corporal.
- 4) Disminución de la diferenciación y la proliferación de preadipocitos.
- 5) Disminución de la lipogénesis y aumento de los lípidos.

Actualmente, la FDA ha aprobado cinco medicamentos contra la obesidad en adultos que presentan obesidad ¹⁴⁷ a continuación en la tabla 8.

Tabla 8.- Fármacos aprobados en el tratamiento de la obesidad.

Orlistat	Fármaco que altera la digestión de grasas mediante la inhibición de lipasa pancreática y gástrica.
Liraglutida	Análogo agonista del receptor del Péptido Similar al Glucagón tipo 1 (GLP-1).
Combinación fentermina/topiramato	El primer componente es un agente liberador de norepinefrina, el segundo es un modulador del receptor GABA.
Combinación naltrexona/bupropión	El primer componente es un antagonista de opioides; el segundo es un inhibidor de recaptura de dopamina y norepinefrina.
Lorcaserina	Agonista selectivo del receptor 2C de la serotonina (5-HT _{2c}).

1.2.2.1 Inhibidores de la ingesta

Sibutramina. Originalmente la sibutramina fue desarrollada como antidepresivo pero fue inefectivo. Sin embargo, este fármaco reduce el peso corporal y el apetito e incrementa la saciedad ¹⁴⁸. El mecanismo de acción de la sibutramina consiste en suprimir el apetito dado que inhibe la recaptación de monoaminas; noradrenalina en un 73% y serotonina en un 54%, a nivel de SNC. Actúa también a nivel periférico aumentando la lipólisis por su mecanismo adrenérgico ¹⁴⁹. Fue aprobada por la Food and Drugs Administration (FDA) en el año 1997 y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en el año 1999. Se le consideraba un fármaco para uso a largo plazo tanto para el descenso de peso como para el mantenimiento del peso perdido ¹⁴⁹. Los efectos adversos incluyeron constipación, incremento de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca, boca seca y dolor de cabeza. La EMA en el 2008 detectó problemas de seguridad en el fármaco, por lo cual suspendió la licencia de la sibutramina y fue prohibida en 2010. La sibutramina incrementa el riesgo de ataques al corazón no fatales ¹⁴⁸.

Rimonabant. En el 2006, la EMA aprobó el primer fármaco que bloquea el sistema endocannabinóide (EC), el rimonabant. La sobreestimulación del sistema EC produce obesidad ¹⁵⁰. El sistema EC modula la ingesta de alimento y el metabolismo energético a diferentes niveles, comenzando con los receptores del sistema gastrointestinal para regular los mecanismos de recompensa en el cerebro. El

rimonabant es un potente antagonista selectivo del receptor canabinoide del cerebro CB1 y fue indicado para el tratamiento de la obesidad, sin embargo este fue retirado por efectos secundarios graves ¹⁵¹¹⁵² .

Lorcaserina. La lorcaserina es un agonista de los receptores 5HT2C. El receptor de serotonina modula la reducción de la ingesta de alimento y el aumento de gasto energético. Este producto requiere vigilancia por aparición de valvulopatías tras el antecedente en 1997 con el producto fenfluramina (con efecto en los receptores 2B). Los efectos secundarios son náusea, cefalea y mareos, pero la seguridad y tolerancia parecen aceptables. La actividad sobre el peso corporal es moderada, con pérdidas del 4.8% y 4% respecto del placebo en las series publicadas ¹⁵³

La lorcaserina es un agonista selectivo del receptor 2C de la serotonina (5-HT2C) que se expresa en el SNC específicamente en áreas que se han relacionado con el control del humor y la cognición; así como en el núcleo del tracto solitario, los núcleos dorsomedial y paraventricular del hipotálamo y la amígdala, las cuales se han relacionado con la regulación del apetito (Smith et al, 2008). Su mecanismo de acción consiste en incrementar la actividad de las neuronas de POMC. La lorcaserina tiene actividad selectiva y esto limita el riesgo de alteraciones valvulares, tal como se ha descrito en estudios *in vivo* en ratas y en estudios clínicos en seres humanos ¹⁵⁴.

Bupropión/naltrexona. La combinación de naltrexona/bupropión fue aprobada por la FDA en septiembre de 2014 y en 2015 por la EMA. Este medicamento es útil para las personas que manifiestan deseos de comer permanentemente (craving), lo cual está asociado al desarrollo de la obesidad. Se ha demostrado que la combinación disminuye estas ansias de comer debido a que ambos componentes actúan sobre el sistema de recompensa y adicionalmente sobre los centros del hambre en el hipotálamo ¹⁵⁵. Aumenta la activación de la POMC (proopiomelanocortina) por el bupropión y la inhibición de la supresión contrarreguladora de las endorfinas por la naltrexona. La combinación produce pérdidas de peso aceptable de 7.3% y 7.8% superiores al placebo en un año ¹⁵⁴.

El bupropión es un inhibidor de la recaptación de dopamina/norepinefrina inicialmente prescrito como antidepresivo y para el cese del tabaquismo, pero también demostró efectos en relación con la pérdida de peso. Dicho efecto es

secundario a la estimulación de las neuronas POMC hipotalámicas, con lo que disminuye la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético al incrementar la termogénesis mediante la secreción de hormona estimulante de los melanocitos (MSH) ¹⁵⁵. La naltrexona es un antagonista del receptor de opioide, prescrito para tratar la dependencia al alcohol y para disminuir los antojos a través de la supresión de la acción de la endorfina en las vías de recompensa dopaminérgica ¹⁵⁴.

Fentermina/topiramato. En 2012, la FDA aprobó la combinación fija de liberación controlada de fentermina/topiramato como tratamiento a largo plazo de la obesidad ¹⁵⁶. En México se comercializan por separado. La combinación fue aprobada para su uso en adultos con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más o en adultos con un IMC de 27 o mayor que tienen al menos una enfermedad relacionada con el peso, como hipertensión, diabetes tipo 2 o dislipidemia ⁶³. Ambos medicamentos reducen el apetito e incrementan la termogénesis. La fentermina es un inhibidor del apetito y actúa liberando noradrenalina y dopamina, químicamente similar a la anfetamina. Fue probado por la FDA para uso a corto plazo por potencial abuso. Tiende a desarrollar tolerancia, por lo que es necesario aumentar la dosis con el tiempo. Los efectos adversos son: Estimulación del SNC, cefalea insomnio, palpitaciones, taquicardia, aumento de la presión arterial y hemorragia intracraneal ⁶³.

El topiramato es un agonista GABA que se aprobó inicialmente para el tratamiento de la migraña y epilepsia. Induce la supresión del apetito mediante la modulación de canales dependientes de voltaje, incrementa la actividad de los receptores GABA-A, inhibe receptores glutamato AMPA/kainato y la actividad de anhidrasa carbónica; incluso, en diversos estudios se demostró la capacidad del topiramato para inhibir los antojos compulsivos y el comportamiento adictivo ^{153 156}.

1.2.2.2 Otros medicamentos

Orlistat. El orlistat, es un fármaco que inhibe la lipasa pancreática y produce mala digestión de la grasa ingerida, con la consecuente pérdida fecal de más del 30% de ésta. Ha demostrado que logra reducir 8% a 10% del exceso de peso en un año, en conjunto con la dieta, en comparación con el placebo (6%)¹⁵⁷. El orlistat fue aprobado en 1998 por la FDA para el tratamiento de la obesidad asociado a una dieta

baja en calorías supervisada por el médico. En 2006 se convirtió en el único fármaco de venta libre comercializado con este propósito.

La tetrahidrolipstatina (orlistat) actúa a un nivel fisiológico completamente distinto, disminuyendo la absorción de los triglicéridos de cadena larga y aumentando de este modo la eficacia de una dieta moderadamente hipocalórica, sin modificar ni la sensación de hambre/saciedad ni el gasto energético. Se trata de una sustancia procedente en estado natural del hongo *Streptomyces toxytricini*, que se sitúa en la parte externa de las emulsiones lipídicas intestinales, por lo que se expone de forma directa a la acción de la lipasa pancreática y bloquea su acción ¹⁵⁷. De esta manera, impide la hidrólisis de un 30% de los triglicéridos de cadena larga a ácidos grasos y monoglicéridos, por lo que no pueden formarse micelas grasas solubles por efecto de las sales biliares y se limita su absorción por los vasos linfáticos del tracto digestivo. Al disminuir la absorción de los triglicéridos, disminuye la litogénesis y promueve a su vez la lipólisis ¹⁵⁷.

Liraglutida. Es un agonista de larga duración del péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), que inicialmente se aprobó como tratamiento de segunda línea contra la diabetes mellitus tipo 2, y en diciembre de 2014 se aprobó para tratamiento de la obesidad con al menos una comorbilidad relacionada con la misma, como hipertensión, diabetes o dislipidemia ¹⁵⁸. Las incretinas son péptidos responsables de la liberación postprandial de insulina por parte de las células beta pancreáticas, así como inhibición de la liberación de glucagón por parte de las células alfa. Este mecanismo forma parte del eje enteropancreático y ayuda a la preservación de la célula beta ¹⁵⁹. El GLP-1 es una incretina endógena que se secreta en las células L del intestino en respuesta a la ingesta de alimentos que estimula la liberación de insulina, inhibe la secreción de glucagón y gluconeogénesis con lo que se reducen las concentraciones séricas de glucosa. Además, retrasa el vaciamiento gástrico e incrementa la saciedad mediante la estimulación de las neuronas POMC en el hipotálamo ¹⁵⁹.

1.2.3 Cirugía

La cirugía bariátrica es un método eficaz y seguro de pérdida de peso en pacientes con obesidad mórbida o con obesidad y comorbilidades, como la enfermedad coronaria ¹⁶⁰.

Algunos estudios indican que la cirugía bariátrica puede inducir mejoras significativas en la presión arterial, la glucemia, las concentraciones lipídicas y la calidad de vida. Más del 70% de los pacientes con hipertensión notaron mejoría o resolución de los valores de presión arterial ¹⁶¹. Cerca de la mitad de los pacientes diabéticos que se someten a cirugía bariátrica pueden normalizar la HbA1c e incluso pueden dejar de usar insulina o medicamentos hipoglucemiantes ¹⁶². Los pacientes sometidos a cirugía bariátrica experimentan una reducción significativa en el riesgo cardiovascular estimado y algunos estudios indican disminución en la mortalidad después de la cirugía bariátrica ¹⁶².

Las complicaciones quirúrgicas más frecuentes e inherentes a la propia cirugía bariátrica incluyen la dehiscencia de suturas, úlcera marginal, comunicación gastrogástrica, estenosis de la anastomosis gastroeyunal o eventración (25-50%) en cirugías abiertas. Entre las complicaciones médicas se encuentran los vómitos, diarreas, síndrome de dumping y aquellas relacionadas con la malabsorción de proteínas y vitaminas. Por ello, el seguimiento de las pautas alimentarias y la suplementación diaria de complejos de vitaminas y minerales (en especial hierro, calcio y vitaminas B12 y D) deben conformar parte de la educación nutricional que necesariamente deben recibir estos pacientes tras la cirugía y la monitorización analítica periódica para ajustar los tratamientos ¹⁶³.

Balón gástrico

El balón intragástrico consiste en la colocación endoscópica de un balón relleno de suero salino o aire en la cavidad gástrica, con la finalidad de reducir sensiblemente la capacidad para la ingestión de alimentos y en consecuencia se alcanzan pérdidas promedio de 15 a 20 kg durante un período temporal de 6 meses ¹⁶⁴. La ausencia de datos disponibles a largo plazo, una vez retirado el balón y los posibles efectos secundarios y complicaciones descritas, relegan esta técnica a casos excepcionales, de aplicación limitada en el tiempo, donde han fracasado medidas intensivas dietéticas y farmacológicas y al mismo tiempo las opciones quirúrgicas pueden representar un riesgo no asumible por el paciente ¹⁶⁵.

1.3 Modelos experimentales de obesidad

Los modelos experimentales constituyen una valiosa herramienta en el campo de la investigación y ayudan a comprender los procesos fisiológicos asociados a enfermedades. Una gran parte de estudios se desarrollan en roedores dada la similitud biológica con el humano.

La importancia de los modelos experimentales animales en el estudio de la obesidad, SM y NAFLD se justifica por la gran cantidad de parámetros biológicos relacionados cuyo estudio se puede abordar en un modelo *in vivo*. De forma sencilla, podemos distinguir dos grandes grupos de modelos animales: Los inducidos por agentes externos (sea la dieta, fármacos o toxinas) o los que son resultado de modificaciones genéticas (espontáneas o artificiales). A veces se combinan ambos tipos ¹⁶⁶.

1.3.1 Obesidad inducida por la dieta

La dieta ha sido de gran importancia en los estudios sobre SM debido a que afecta al metabolismo de todo el organismo, siendo especialmente grande su importancia en la actividad reguladora sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Los roedores más utilizados para este tipo de estudios son las ratas Sprague Dawley (SD), Wistar, ratones C57BL/6 y el hámster sirio dorado ¹⁶⁷.

Los estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en grasas podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina ¹⁶⁷. Además, la grasa es el macronutriente más denso en energía por lo que aumenta las probabilidades de desarrollar obesidad cuando se consume en cantidades excesivas. En consecuencia, las dietas ricas en grasa (HFD), por ejemplo, 30% - 75% del total de calorías derivadas de ácidos grasos saturados (\pm ácidos grasos insaturados) se han propuesto como una herramienta útil para inducir alteraciones metabólicas y NAFLD. De hecho, dependiendo del porcentaje de grasa, la duración del tiempo de alimentación y la combinación de ácidos grasos, los roedores desarrollan obesidad, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, aumento de la expresión de reguladores de lipogénesis y expresión de citoquinas proinflamatorias ¹⁶⁸. Estas dietas son útiles para el estudio de la obesidad ya que las alteraciones que producen en roedores son

similares a las alteraciones patológicas y moleculares encontradas en humanos con NAFLD.

Los resultados de varios estudios clínicos y epidemiológicos en diferentes países sugieren que un cambio en los patrones dietéticos hacia una dieta rica en azúcares sencillos (dieta rica en fructosa) también puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de NAFLD en humanos ¹⁶⁹. Las dietas con un contenido elevado de hidratos de carbono sencillos como dietas altas en sacarosa o altas en fructosa también se han usado para inducir el desarrollo de NAFLD en modelos de ratón. Tras estudiar el efecto de distintos monosacáridos y disacáridos se reveló que la fructosa era el que tenía el efecto más dañino en el hígado a pesar de tener el menor impacto en el aumento de peso corporal ¹⁷⁰. Además, se demostró que la fructosa disuelta en el agua de bebida no solo conduce al desarrollo de NAFLD sino también a la resistencia a la insulina ¹⁷¹. Al igual que las dietas ricas en grasa, las ricas en fructosa pueden conducir al estrés oxidativo, expresión de citoquinas proinflamatorias y niveles elevados de endotoxinas en la sangre portal así como alteraciones en la expresión de adipoquinas en el tejido adiposo visceral en relación a la dosis y el tiempo de exposición ¹⁶⁸.

Una combinación de altas proporciones de grasa y fructosa en la dieta, se relaciona con la dieta consumida actualmente en el mundo occidental. Ha sido utilizada también, en repetidas ocasiones, como modelo dietético para inducir NAFLD y SM en roedores. Un estudio de Charlton et al. ¹⁷² mostró que después de alimentar ratones C57BL/6 durante 6 meses, con una dieta rica en grasa (40% de energía en forma de grasa con 2% de colesterol) y agua potable enriquecida con jarabe de maíz de alto contenido en fructosa (concentración final de 42 g/L) los ratones no solo adquirieron sobrepeso y resistencia a la insulina, sino que también desarrollaron esteatohepatitis no alcohólica con una expresión génica que indicaba un aumento del riesgo de fibrosis. En este estudio, también se demostró que los ratones alimentados con la dieta de comida rápida desarrollaron estrés en el retículo endoplasmático y disfunción del tejido adiposo, signos que también aparecen en humanos con NAFLD. La combinación de una dieta rica en grasa con un elevado consumo de fructosa favorece la progresión de la esteatosis a etapas más avanzadas de la enfermedad en los modelos estudiados con mayor rapidez que los que son

alimentados con una dieta rica en grasa o fructosa únicamente e incluso parecen sufrir una mayor ganancia de peso ¹⁷².

1.3.2 Obesidad por alteración genética

Se ha creado un gran número de modelos transgénicos y knockout (KO) con fenotipos obesos y delgados desde la caracterización de los primeros genes de la obesidad ^{173 174}. La actualización en 2005 del mapa genético de la obesidad humana citaba 248 genes que, cuando son mutados o expresados como transgenes en el ratón, resultan en fenotipos que afectan al peso corporal y a la cantidad de tejido adiposo ¹⁷⁵. La capacidad de introducir o eliminar genes en la línea germinal de los animales ha facilitado el desarrollo de complejos modelos genéticos de enfermedad, así como el estudio *in vivo* de las funciones génicas. Las investigaciones sobre la obesidad han sido un reto debido a su compleja etiología en lo que se refiere a los factores genéticos, metabólicos, de comportamiento y ambientales ¹⁷⁴. La investigación utilizando modelos animales, genéticamente modificados, de obesidad y delgadez ha llevado a una importante expansión de nuestro conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos y moleculares que afectan al equilibrio energético. Dicho conocimiento es útil para la identificación de dianas potenciales para el desarrollo de terapias frente a la obesidad humana ¹⁷⁵.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Contribuir a la prevención y control de las alteraciones asociadas a la obesidad y SMet mediante la combinación de una dieta hipocalórica, un protocolo de ejercicio físico mixto y la administración de un fármaco inhibidor del sistema endocannabinoide para prolongar y mantener la pérdida de peso y mejorar parámetros de funcionalidad hepática, cardiovascular y renal.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Desarrollar un modelo experimental de obesidad inducida por la dieta.
- ✓ Conseguir el control de la obesidad con una pérdida de peso efectiva mediante intervenciones nutricionales, ejercicio físico y administración de un fármaco de control de ingesta
- ✓ Conseguir el mantenimiento del peso perdido evitando el efecto rebote mediante las intervenciones mencionadas.
- ✓ Determinar el efecto de las estrategias diseñadas en el control del metabolismo glucídico.
- ✓ Estudiar los cambios en la capacidad aeróbica y la funcionalidad cardiovascular asociadas a la obesidad y los cambios producidos por las intervenciones de control de peso y mantenimiento de peso perdido.
- ✓ Estudiar las alteraciones renales asociadas a la obesidad y su modificación por las intervenciones ensayadas.
- ✓ Estudiar las alteraciones de la función hepática asociadas a la obesidad y la eficacia de las estrategias ensayadas para su control.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Experimentos con animales

Para el desarrollo de este estudio fue elegido el modelo de rata Sprague Dawley, con un peso corporal medio para el inicio (Charles Rives, Barcelona, España). El tamaño promedio de la camada de la rata Sprague Dawley es de 10,5. El peso corporal de adultos es de 250g a 300g para las hembras, y 450g a 520g para los machos. Fueron seleccionados únicamente machos debido a la menor influencia hormonal que presentan estos frente al femenino.

3.2 Diseño experimental y dietas

Se asignaron un total de 112 ratas macho Sprague Dawley con un peso corporal medio 184 ± 10 g (6 semanas de edad, Charles Rives, Barcelona, España) en catorce grupos experimentales diferentes ($n = 8$). Los experimentos tuvieron una duración de 21 semanas y se dividieron en tres etapas (0-12, 12-15 y 15-21 semanas) (Figura 10).

G6. HFD 21 semanas

Tras la primera etapa de 12 semanas de obesidad inducida por la dieta mediante la ingesta de la dieta hipercalórica, le sucede una segunda etapa de 3 semanas del experimento (hasta la semana 15), 4 grupos experimentales fueron sometidos a las siguientes intervenciones con el fin de adelgazar y mejorar las alteraciones metabólicas.

G7. Se implementó una intervención de restricción calórica utilizando una dieta experimental diseñada para inducir una mayor saciedad, combinando los efectos del contenido alto en proteínas y fibra dietética soluble (WLs15) (2,9 Kcal / g; (Tabla 9). Además de su acción saciante, la fibra dietética soluble es un agente terapéutico eficaz para tratar muchos de los componentes del síndrome metabólico asociados a la obesidad ¹⁷⁶.

Tabla 9.- Diseño de dietas y composición.

	SD	HFD	WL
Protein (%)	13.5	22.2	26.7
Ash (%)	4.53	4.11	4.2
Fiber (%)	22.3	5.0	23.1
Carbohydrate (by difference) (%)	55.3	37.5	41.8
Energy (Kcal/g)	2.4	5.2	2.5
Fat (%)	4.41	31.2	4.23
Fatty acid profile (%)			
Miristic (C14:0)	-	0.25	-
Palmitic (C16:0)	10.36	21.33	7.20
Stearic (C18:0)	0.46	7.10	1.30
Palmitoleic (C16:1n9)	-	0.36	-
Oleic (C18:1n9)	12.84	41.62	78.16
Octadecenoic (C18:1n7)	-	0.36	-
Linoleic (C18:2n6)	74.35	27.86	12.42
Linolenic (C18:3n3)	1.99	1.13	0.92

G8. Intervención dietética similar combinada con un protocolo de entrenamiento mixto implementado 5 días a la semana durante la intervención de pérdida de peso de 3 semanas (WLe15).

G9. Intervención dietética similar combinada con la administración intraperitoneal de un bloqueador del receptor CB1 (AM251) tres veces por semana a una dosis de 3 mg / kg de peso corporal, según lo descrito por Martínez et al. ¹⁷⁷ durante la intervención de pérdida de peso de 3 semanas (WLe AM15).

G10. Intervención dietética similar combinada con el protocolo de entrenamiento y el bloqueante del receptor CB1 durante la intervención de pérdida de peso de 3 semanas (WLe AM15).

Finalmente, para otros 4 grupos experimentales, una tercera etapa del experimento se desarrolló durante un período entre las semanas 15 y 21 y fue diseñada para mantener el peso corporal perdido evitando el efecto rebote:

G11. Ingesta de una dieta normocalórica después de la intervención dietética de reducción de peso de 3 semanas de restricción calórica con una dieta alta en proteínas / fibra (WMs 21). La cantidad de alimento ingerido durante ese período de 6 semanas se ajustó a 23 g / d para lograr una reducción calórica del 12-15% en comparación con el mismo período en el grupo de control CNOR como parte de la estrategia para mantener el peso perdido, durante la etapa de posintervención evitando el efecto rebote.

G12. Tratamiento dietético similar combinado durante la intervención y el período de mantenimiento de la pérdida de peso con un protocolo de entrenamiento mixto implementado 5 días a la semana (WMe21).

G13. Tratamiento dietético similar combinado con la administración intraperitoneal de un bloqueador de los receptores CB1 tres veces por semana durante la intervención de pérdida de peso y una vez por semana durante la etapa de mantenimiento de la pérdida de peso a una dosis de 3 mg / kg de peso corporal (WMsAM21).

G14. Tratamiento dietético similar combinado con el protocolo de entrenamiento mixto y la administración de un bloqueador del receptor CB1 (WMeAM21).

3.3 Ingesta y peso corporal

La ingesta de los animales fue determinada diariamente por diferencia de peso de la dieta suministrada en el comedero y la restante tras la ingesta del alimento. Los animales se pesaron al comienzo de cada semana del periodo experimental y los distintos órganos se extrajeron y se pesaron después del sacrificio de los animales.

Por otro lado la determinación de la composición corporal se realizó utilizando un EchoMRI™; EchoMedical Systems, Houston TX. Se trata de un analizador que estima la grasa corporal de cuerpo entero en animales vivos mediante resonancia magnética.

3.4 Protocolo de entrenamiento

Las ratas fueron entrenadas siguiendo un protocolo basado en entrenamiento aeróbico a intervalos combinado con ejercicio de fuerza en la misma sesión descrita previamente por Coll-Risco et al.¹⁷⁷ y Martínez et al.¹⁷⁸. El ejercicio se realizó en un tapiz rodante especialmente diseñado (Panlab, LE 8710R) y todas las sesiones se realizaron 5 días a la semana durante el ciclo de oscuridad de los animales (período activo). Todas las sesiones del protocolo de entrenamiento mixto consistieron en 60 min de trabajo eficaz. Las sesiones comenzaron con un calentamiento de 10 minutos a una velocidad equivalente al 35-50% del consumo máximo de oxígeno, seguido por el entrenamiento de fuerza que consiste en ocho bloques de 2 min separados por 1 min de descanso durante los cuales los animales corrían por el tapiz con una inclinación desde 10° hasta 20° a una velocidad lenta constante (20-25 cm / s, equivalente a 30-40% de consumo máximo de oxígeno). El ejercicio de fuerza fue seguido por 30 minutos de ejercicio aeróbico en intervalos, alternando episodios de 4 minutos al 50-65% del consumo máximo de oxígeno con episodios de 3 min a intensidad submáxima al 65-85% del consumo máximo de oxígeno. El protocolo de entrenamiento fue diseñado en base a los efectos beneficiosos del entrenamiento aeróbico en intervalos de alta intensidad sobre la obesidad y los parámetros de metabolismo de los lípidos. Además, se implementó un protocolo de entrenamiento

de fuerza aeróbica ya que este tipo de ejercicio se ha postulado como una buena herramienta para la mejora de sensibilidad a la insulina y perfil lipídico.

Una semana antes del inicio del estudio, los animales se sometieron a un proceso de adaptación para los procedimientos de entrenamiento a través de un protocolo de carrera de baja intensidad cada día durante 20 min en la cinta a 18 m / min. Para establecer la velocidad que corresponden al consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx) de cada rata, se realizó un test incremental al inicio del estudio. Posteriormente se realizó un test incremental final 96 h antes del final del estudio para probar la capacidad aeróbica máxima y el rendimiento físico alcanzado por los animales como resultado de las intervenciones. La prueba incremental máxima se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Wisløff et al.¹⁷⁹ y¹⁸⁰ con leves modificaciones.

3.5 Metabolismo basal y capacidad aeróbica

La determinación del metabolismo basal en los animales se llevó a cabo durante un periodo experimental de 24 horas, durante el cual los animales permanecieron en jaulas metabólicas individuales con acceso libre de agua y alimento. El gasto metabólico se determinó en periodos de ayuno y de acceso a alimento. Se realizó un control de peso de los animales antes de comenzar las 24 horas de determinación del gasto metabólico basal, así como al final del periodo experimental.

El procedimiento consistió en utilizar un analizador de gases Panlab Oxylet System, que dispone de un tapiz rodante y jaulas metabólicas individuales. Este sistema utiliza una calorimetría indirecta, que se basa en determinar el consumo de O_2 y producción de CO_2 . Se establece un flujo de aire dentro de cada jaula. La velocidad del tapiz rodante se mantiene a una velocidad de 0.5 – 0.8L/min cuando las ratas se encuentran en reposo y de 0.7 – 1.2 L/min cuando están en movimiento (test incremental). Los gases son detectados por medio de sensores específicos de O_2 y CO_2 , estos sensores están asociados a un equipo que registra los valores obtenidos. Este sistema utiliza un “Laser Absorption O_2 Sensor” que atraviesa la cavidad donde se realiza la determinación y es importante para disminuir la influencia de humedad

ambiental en las determinaciones de parámetros metabólicos en animales dentro de jaulas. El gasto metabólico basal (kcal/min/kg^{0.75}) se obtuvo realizando una media con los valores obtenidos de los periodos de luz y oscuridad. Los datos se registraron en el Software (METABOLISM V2.2.00) instalado previamente en el procesador informático.

La capacidad aeróbica se determinó mediante un analizador de gases Panlab Oxylet System conectado a un tapiz rodante diseñado específicamente para animales de experimentación. Se utilizó el protocolo propuesto por Wisløff et al.¹⁷⁹ con mínimas modificaciones. La metodología de esta técnica se basa en determinar los valores de O₂ y CO₂ por calorimetría indirecta a través de un circuito abierto. Se inició registrando valores de O₂ y CO₂ del aire ambiental durante 5 minutos y a continuación dio comienzo el test con un incremento en la velocidad de 3cm por segundo. Dicho test finalizó cuando el animal estaba visiblemente exhausto. Se paró el tapiz rodante y los datos se guardaron en el procesador informático. En la (Tabla 10) se describe el aumento progresivo de la intensidad del test incremental.

Tabla 10.- Valores de intensidad del test incremental.

Tiempo (minutos)	Velocidad (cm/s)	Tiempo (minutos)	Velocidad (cm/s)
5	25 - 30	18	66 - 69
6	30 - 33	19	69 - 72
7	33 - 36	20	72 - 75
8	36 - 39	21	75 - 78
9	39 - 42	22	78 - 81
10	42 - 45	23	81 - 84
11	45 - 48	24	84 - 87
12	48 - 51	25	87 - 90
13	51 - 54	26	90 - 93
14	54 - 57	27	93 - 96
15	57 - 60	28	96 - 99
16	60 - 63	29	99 - 102
17	63 - 66	30	102 - 105

3.6 Administración intraperitoneal de AM251

El agonista inverso del receptor CB1, N- (piperidin-1-il) -5 (4-yodofenil) -1- (2,4-diclorofenil) -4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM251) (Tocris Cookson , Reino Unido) fue reconstituido en el vehículo dimetilsulfóxido: tween-80: NaCl al 0,9% (1: 2: 97) para su posterior administración intraperitoneal en ratas a una dosis de 3 mg / kg de peso corporal ¹⁸¹.

3.7 Análisis de sangre, plasma y orina

La glucosa en sangre en ayunas y la prueba de tolerancia a la glucosa se realizaron mediante sobrecarga de glucosa oral siguiendo el protocolo descrito por Prieto et al ¹⁸². La concentración de glucosa en sangre de la cola de los animales se registró en los períodos 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la ingestión de sobrecarga de glucosa y el área bajo la curva (AUC) se calculó siguiendo la regla trapezoidal.

El índice aterogénico (IA) se calculó con la fórmula: $IA = (Colesterol\ total - Colesterol\ HDL) / Colesterol\ HDL$. El índice de triglicéridos-glucosa como medida de RI, se calculó con la fórmula: $Tr-Gl = Ln [triglicéridos\ plasmáticos\ en\ ayunas\ (mg / dL) \times glucosa\ en\ ayunas\ (mg / dL) / 2]$. El pH urinario se analizó utilizando un pHmetro de mesa.

Los parámetros bioquímicos plasmáticos y urinarios se midieron utilizando un analizador Shenzhen Midray BS-200 Chemistry Analyzer (Bio-Medical Electronics) en la Unidad de Bioanálisis del Centro de Instrumentación Científica (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Se utilizaron kits analíticos (Spin-React, España) para medir lo siguiente parámetros en plasma (ácido úrico, urea, creatinina, proteína total, albúmina, Ca, P, MB creatincinasa, actividad de la enzima convertidora de angiotensina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), actividades de γ glutamil transferasa (γ -GT) y fosfatasa alcalina (ALP).

) y orina (proteína total, albúmina, creatinina). La tasa de aclaramiento de creatinina renal como índice de la tasa de filtración glomerular fue calculado usando la fórmula estándar $C = U \times V / P$, donde U es la concentración en orina (mg / dL), V es la tasa de flujo de orina (mL / min) y P es la concentración plasmática (mg / dL).

3.8 Electrocardiograma

Para el estudio del electrocardiograma (ECG) en ratas se llevó a cabo utilizando el sistema de adquisición de datos Power Lab (ADInstruments) asociado al módulo BIO - AMP y el software Labchart Pro, diseñado con objetivo de adquirir, analizar e interpretar los datos obtenidos. El ECG se realizó en animales previamente tratados con ketamina (75mg /kg) y xilacina (10mg/kg) inyectada de modo intraperitoneal. Para las distintas medidas determinadas se empleó la derivación II, donde el valor medio para cada rata se obtuvo mediante 10 medidas en ciclos cardiacos consecutivos durante los periodos 10-20seg, 30-40seg, 50-60seg, a lo largo de un intervalo de 1 min. Las medidas determinadas en el estudio del ECG fueron las siguientes: Intervalo RR, frecuencia cardiaca, duración y amplitud de la onda P, amplitud de complejo QRS, duración y amplitud de la onda T, duración intervalo PR, duración intervalo QT, QTc calculado según la fórmula de Bazett ($QTc = \text{Intervalo QT} / \sqrt{\text{Intervalo RR}}$) y variabilidad de la frecuencia cardiaca (desviación estándar de los intervalos RR).

3.9 Determinación de grasa total y perfil de ácidos grasos del hígado

3.9.1 Contenido total de lípidos hepáticos

Se liofilizó una porción de hígado para determinar el porcentaje de agua. Se extrajeron lípidos hepáticos con hexano de una alícuota de la porción de hígado liofilizado utilizando el método descrito por Prieto et al. ¹⁸² con ligeras modificaciones ¹⁸³. Los lípidos hepáticos totales se midieron gravimétricamente después de la evaporación del solvente bajo Corriente de nitrógeno.

3.9.2 Perfil de ácidos grasos del hígado

Una porción de hígado liofilizado fue extraída y metilada de acuerdo con Lepage y Roy¹⁸⁴. El análisis cromatográfico del perfil de ácidos grasos se realizó utilizando un cromatógrafo Agilent 7890A equipado con CTC Muestreador modelo Pal combi-xt y detector espectrómetro de masas Waters Quattro micro GC. Grasa individual. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) se separaron con una columna capilar ZB Fame de 30 m × 0,25 mm (0,2 μm espesor) (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). Las condiciones de la cromatografía de gases fueron las siguientes: inyector temperatura 250 ° C, volumen de inyección 2 μL Split (proporción 10: 1), gradiente de temperatura de 100 ° C a 210 ° C con una velocidad de 4 ° C / min, tiempo de retención 5 min. El caudal del gas portador (helio) fue de 1 ml / min.

El tiempo de análisis fue de 40 minutos y el rango de medición de 45 a 450 uma (modo de escaneo). Los datos cromatográficos fueron grabados e integrados con el software Masslynx, versión 4.1. Los FAME se identificaron mediante análisis de estándares y biblioteca de espectros de masas. Se midieron las áreas de los picos y se usaron para calcular el porcentaje de cada ácido graso individual relacionado con la suma total de todas las áreas de ácidos grasos de la muestra. Las proporciones de ácidos grasos precursores se utilizaron como índices de las actividades de la enzima desaturasa o desaturasa-elongasa en la hígado como describen González-Torres et al.¹⁸⁵ utilizando las siguientes fórmulas. Delta-6-elongasa-desaturasa: Ácido araquidónico / ácido linoleico. Actividad oleoil-coA (SCD): ácido oleico / ácido esteárico.

3.10 Actividad antioxidante del hígado y riñón y ensayos de peroxidación lipídica

3.10.1 Homogenización de tejidos

Para realizar el homogeneizado de los tejidos se siguió el método descrito por Oboh y Rocha, (2007) con mínimas modificaciones descritas a continuación. Se homogeneizó una alícuota de riñón o hígado (1g:10mL respectivamente) en tampón fosfato 50 mM (pH 7,8), compuesto por Triton X-100 al 0,1% y 1.34 mM de DETAPAC. Se utilizó un homogeneizador Micra D-1 (ART moderne labortechnik) a

18,000 rpm por 30 segundos, consecutivamente se realizó un tratamiento con homogeneizador ultrasónico Sonoplus HD 2070 (Bandelin) por tres veces (10 seg.) al 50% de su potencia. Los homogeneizados renales y hepáticos se centrifugaron a 16.000rpm, 4°C durante 45 minutos (BECKMAN, Allegra 64R) y el sobrenadante se usó para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica.

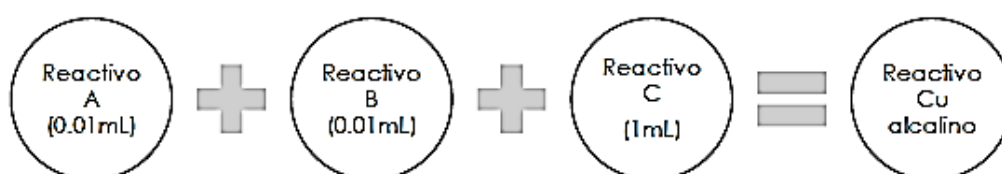
3.10.2 Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína en los homogeneizados de riñón e hígado se utilizó la técnica de Lowry y col., (1951) con mínimas modificaciones, el objetivo fue adaptarlo al protocolo de microplaca de 96 pocillos (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai – China).

Se realizó una recta patrón para todas las determinaciones de concentración de proteína con las siguientes cantidades 0, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL utilizando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) concentración inicial 1000 µg/mL. Se prepararon tres reactivos, además de la solución de Folin – Ciocalteu en la que se diluyó con agua tipo I en una proporción 1:4. A continuación, se describe la composición de los reactivos:

- Reactivo A: Cu₂SO₄ al 1%
- Reactivo B: Tartrato al 2%
- Reactivo C: Na₂CO₃ al 2% y NaOH 0.1N

Para obtener el reactivo Cu alcalino los reactivos se mezclaron de la siguiente manera.



La determinación de proteína se inició agregando a cada pocillo de la placa 50µL de las muestras diluidas o los patrones y posteriormente se añadió 200µL del reactivo de Cu alcalino, las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió 50 µL de solución de Folin –

Ciocalteau diluida. Las muestras se incubaron durante 30 minutos nuevamente a temperatura ambiente y después se hizo la lectura de la placa a 750nm. Todas las muestras y la recta patrón se determinaron por réplicas de cuatro. Los valores resultantes de la recta patrón se ajustaron a un modelo de ecuación polinómica para extrapolar los valores obtenidos de las absorbancias de las muestras en la recta patrón. Los resultados obtenidos se expresaron como mg proteína/mL de homogeneizado.

3.11 Actividad enzimática superóxido dismutasa

La actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) se midió como se describe por Ukeda et al., (1997) mediante el método colorimétrico, adaptado para un lector de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai – China). La función principal de esta enzima es catalizar el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrogeno. Básicamente esta reacción enzimática se centra en la inhibición por parte de la SOD de realizar una acción de oxidación entre aniones superóxido (2-methoxy -4 nitrito-5-sulfofenil) -2H-terazolium- 5 - carboxanilido (XTT). La actividad enzimática total de la SOD se determinó preparando una mezcla de reacción que contenía de volumen final 1ml, constituida con los siguientes reactivos:

- 740 µL de tampón fosfato (50mM pH 7.8)
- 38µL de DETAPAC (3mM)
- 55 µL de XTT (0.0007g/1mL de tampón fosfato 50mM)
- 167µL de xantina oxidasa (70mU/mL)

En cada pocillo de la placa se añadieron 150µL de la mezcla de reacción, 35 µL de la muestra previamente diluida o 35µL de tampón fosfato (50mM) para los controles y para finalizar 55µL de xantina (3mM). La absorbancia se midió durante 15 minutos a 492nm y 25°C haciendo una lectura de la placa por minuto.

La determinación de la actividad enzimática de SOD-Mn se realizó con el mismo protocolo (Ukeda y col., 1997) con la diferencia de que las muestras previamente

fueron tratadas con cianuro de potasio (KCN) 120mM durante 30 minutos en hielo (concentración final de KCN 4.8mM).

La determinación de la actividad de SOD-CuZn se obtuvo por la diferencia entre actividad enzimática de SOD total y actividad enzimática de SOD-Mn.

Se define que una unidad de actividad enzimática es igual a la enzima necesaria para inhibir el 50% de la reducción de XTT. Los valores de la actividad se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula y los resultados fueron expresados en unidades de actividad antioxidante (UAA) / mg de proteína.

$$\% \text{ de inhibición} = ((A_0 - A_i) / A_i) \times 100$$

- A_0 = actividad del control.
- A_i = actividad de la muestra.

3.12 Actividad enzimática glutatión peroxidasa

La determinación de esta enzima se realizó por el método descrito por Lawrence y col., (1974) con mínimas modificaciones. La técnica se basa en la oxidación de nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADPH) por medio de la enzima glutatión reductasa, la velocidad de reducción está relacionada con la actividad enzimática del glutatión peroxidasa de cada una de las muestras.

Para realizar esta determinación, se realizaron paralelamente reacciones catalizadas y no catalizadas (todas por cuadruplicado).

Para las reacciones no catalizadas se añadió a cada pocillo de la placa los siguientes reactivos:

- 240µL de NADPH 2Mm de tampón fosfato 50mM
- 1mM de ácido etil - diamino - tetra - acético (EDTA) (pH:7.4)
- 20µL de homogenizado de riñón
- 10 µL una solución de cumeno hidroperóxido (22mM)

Para las reacciones catalizadas se añadió a cada pocillo de la placa los siguientes reactivos:

- 240µL de mezcla de reacción también en tampón fosfato 50 mM
- 1mM de EDTA (pH:7.4) adicionada de azida sódica 4.3 mM
- 4.3mM glutatión reducido
- NADPH 2mM
- 10µL de homogeneizado de riñón
- 4.5µL de glutatión reductasa de una solución de 0.04 mU/mL
- 10µL de cumeno hidroperóxido

Se utilizó un Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China para la lectura de la placa a 340nm, durante 4 minutos a 37°C. Se realizó una lectura cada 15 segundos. Los resultados de la actividad enzimática se obtuvieron utilizando la siguiente ecuación y los resultados fueron expresados como nmol NADPH/min/mL.

$$\text{nmol NADPH/min} \times \text{mg proteína} = \frac{(\Delta \text{ Absorbancia reacción catalizada} - \Delta \text{ Absorbancia reacción no catalizada}) / 0.0062 \times (\text{volumen total pocillo/volumen muestra})}{(\text{mg proteína/mL})}$$

3.13 Actividad enzimática catalasa

La determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se determinó por el método descrito por Gerald Cohen y col., (1996) con mínimas modificaciones descritas brevemente. La enzima CAT cataliza el H₂O₂ en una cinética a lo largo de 4 minutos, seguido de una coloración rojiza – ocre con absorbancia medible a 450nm. Para llevar a cabo la reacción se prepararon dos baterías de tubos unos de muestreo y los segundos de reacción descritos a continuación:

1)Tubos de muestreo:

- 2mL de H₂SO₄ (0.6N)
- 500µL de FeSO₄ (10mM)

2) Tubos de reacción:

- 1650µL de tampón fosfato (10mM)
- 100µL de agua bidestilada
- 50µL de la muestra diluida

Para iniciar la reacción se añadieron 200µL de H₂O₂ a cada tubo. Transcurrido 1 minuto se tomaron 50µL del tubo de reacción y se añadió al tubo de muestreo agitando nuevamente en vórtex. Transcurridos 4 minutos más, se tomaron nuevamente 50µL del tubo de reacción y se añadieron al tubo de muestreo agitando con el vórtex. Para activar la coloración rojo – ocre a cada tubo de muestreo se añadió 200µL de KSCN 2.5M, permaneciendo en oscuridad por 3 minutos.

La lectura de absorbancias se realizó en un lector de placas a 460nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer Thermo Fisher Scientific. Shanghai – China).

$$\text{Unidades enzimáticas} = [\ln (A_1/A_2) / t] / \text{proteína}$$

- \ln = log neperiano
- A_1 y A_2 = absorbancias medias de los 2 tiempos seleccionados (tiempo 1 y 4)
- t = diferencia de tiempo entre los 2 puntos

3.14 Peroxidación lipídica (TBARS) en hígado y riñón

La peroxidación lipídica (TBARS) se determinó en los homogeneizados renales y hepáticos previamente preparados para medir actividad enzimática antioxidante utilizando la metodología descrita por Ohkawa y col., (1979) con pequeñas modificaciones.

Se añadió a cada tubo los siguientes reactivos hasta llegar a un volumen final de 2mL.

- 100 µL de homogeneizado de tejido (o 100 µL de solución estándar)
- 100 µL de SDS al 8,1 % (p/v)
- 750 µL de ácido acético al 20 % (pH 3.5)
- 750 µL de TBA al 0,8 % (p/v)
- 300 µL de agua tipo I

Las muestras se calentaron 95°C durante 60 minutos, se enfriaron y se añadió 1.5mL de mezcla orgánica compuesta de butanol/piridina 15:1 respectivamente. Las muestras se agitaron y se pasaron por centrifuga (4.000rpm) durante 10 minutos. Las Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), se midieron espectrofotométricamente a 532 nm de la capa orgánica formada. Los resultados se expresaron como nmol MDA / mg de proteína (nmol / mg). Para todas las muestras se realizaron 4 réplicas.

3.15 Extracción de RNA y RTq-PCR

El ARN total se aisló del tejido. Aproximadamente 100 mg de tejido fueron introducidos en tubos especiales con una matriz de lisis (Lysing Matrix SS – 116921100, MP BIOMEDICALS) donde se añadió 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma, Aldrich), que contenía guanidina isotiocianato, fenol y un agente solubilizante para disolver el ADN, ARN y las proteínas de las muestras lisadas. Los tejidos fueron homogeneizados utilizando un homogeneizador FastPrep®-24 (Modelo 116004500 MP Biomedicals, EEUU). La muestra anteriormente homogeneizada fue transferida a un tubo libre de ribonucleasas (RNAsas) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadió a cada muestra 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. Las muestras se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugaron a 15.000 a 4 °C. La mezcla se separó en tres fases: una fase acuosa superior que contenía el ARN, otra interfase que contenía el ADN y por último una fase orgánica que contenía las proteínas. La parte acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le añadió 500µL de isopropanol, las muestras se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente de 5–10 minutos centrifugando después a 15.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet formado se disolvió en un volumen de 50 - 200 µL con agua libre de RNAsas (Sigma, Aldrich) dependiendo del tamaño del pellet formado y por tanto del material genético extraído.

Posteriormente, las muestras fueron tratadas con DNAsas (Ambion turboDNA-free™ kit, AM1907) para eliminar cualquier ADN presente y el ARN fue transferido a tubos libres de RNAsas para determinar la concentración y calidad del ácido nucleico mediante el índice de A=260/A=280 que se estableció entre 1.90 a 2.00 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Para realizar la transcripción reversa de ARN a ADNc, a un total de 1 – 500ng de ARN se le añadieron: agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 13.75µL y 1µL de hexadeoxinucleótidos (Random Hexamer, Promega C1181), las muestras se introdujeron en un termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research, Waltham, MA, USA) durante 5 minutos a 65°C para desnaturalizar el ARN molde. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 2 min. A cada muestra se añadió 0,625 µL de nucleasa (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Life Technologies); 0,5 µL de desoxinucleótidos trifosfato 25 mM (dNTPs, Promega); 1,25 µL de retrotranscriptasa inversa, 5 µL de First Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) y 2,5 µL de DTT 100 mM (SuperScript® II Reverse Transcriptase, Invitrogen™). La mezcla de reacción se llevó hasta un volumen final de 25 µL con agua libre de RNAsas; se estableció el programa en el termociclador para llevar a cabo la reacción: 10 min a 25°C, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C.

A partir del cADN obtenido, la PCR cuantitativa se llevó a cabo en el sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando cebadores/sondas (Life Technologies™) para: glp-1r (Rn00562406_m1). A cada reacción (o muestra) se le añadieron 6,25 µL de Taqman Master Mix (2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG), que contiene la ADN polimerasa, 4,5 µL de agua libre de RNAsas; 0,5 µL del ADNc de la muestra correspondiente y 1,25 µL del cebador o primer. La reacción se llevó a cabo durante 40 ciclos y siguiendo los siguientes parámetros para cada ciclo: 95°C/20segundos para activar la ADN polimerasa; 95 °C/1 segundo para desnaturalizar las hebras de ADN y 60 °C/20segundos para permitir la alineación y extensión de los cebadores. La expresión de cada gen fue comparada con la expresión de βeta-actina determinada en la misma muestra. Se calculó la diferencia CT para la βeta-actina menos el gen testado. Media, desviación estándar y error estándar de la media se calcularon desde ΔCT.

3.15 Tratamiento estadístico

Se realizaron diferentes tratamientos estadísticos según el diseño experimental de cada fase de trabajo y en todos los casos utilizando el programa estadístico IBM SPSS, versión 20.0.

Las diferencias significativas en la capacidad aeróbica, el perfil glucémico, los parámetros e índices bioquímicos plasmáticos y urinarios, los parámetros electrocardiográficos, los datos de expresión génica y los datos de la actividad de las enzimas antioxidante renal y hepática entre los grupos con dieta estándar y dieta alta en grasas saturadas se analizaron mediante la prueba t de student al final de la etapa de inducción a la obesidad mediante dieta hipercalórica (12 semanas). Al final de las etapas de pérdida de peso (PP, 13-15 semanas) y mantenimiento de peso (PM, 16-21 semanas), se analizaron las diferencias significativas mediante ANOVA de una vía entre todos los grupos experimentales en cada etapa. Se utilizó la prueba de Tukey para detectar diferencias entre las medias de los tratamientos. El análisis estadístico se realizó con Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS para Windows, versión 22.0, Armonk, NY) y el nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

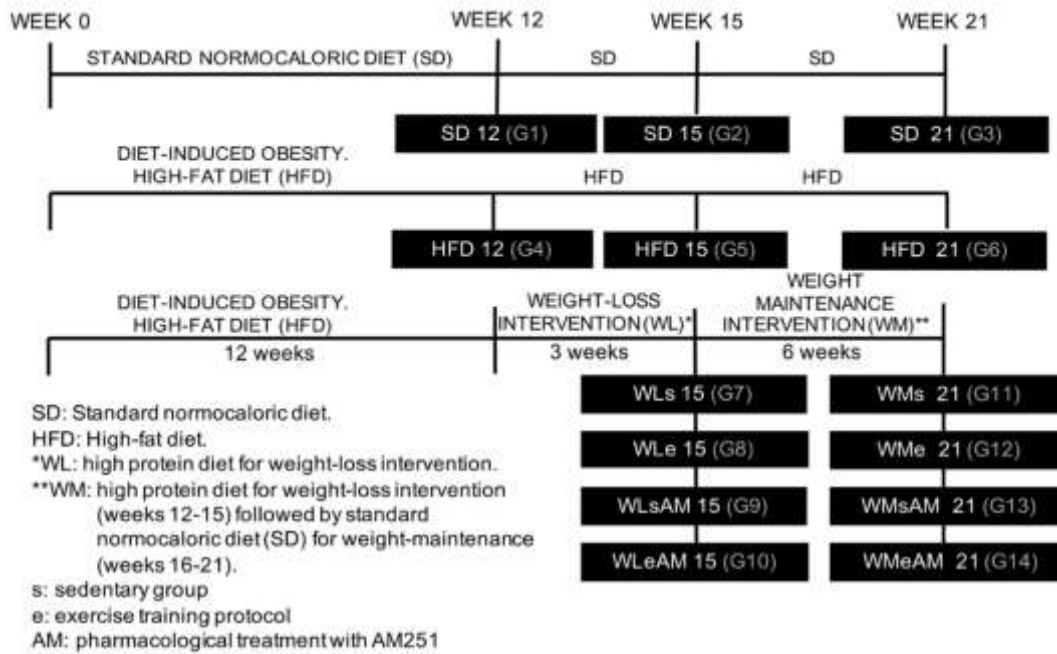
4.1 Ingesta calórica y peso corporal

Los efectos de la obesidad inducida por el consumo de una dieta rica en grasa mayoritariamente saturada (HFD) y las diferentes intervenciones de pérdida de peso y mantenimiento del peso perdido sobre la ingesta calórica diaria y el peso corporal al final de las diferentes fases experimentales se muestran en la figura 11A – D. Para una descripción más precisa de los datos, el período experimental se dividirá en tres fases diferentes: 1) inducción de la obesidad durante las semanas 0-12, 2) intervenciones de pérdida de peso individual o combinada: dieta (restricción calórica), estilo de vida (protocolo de entrenamiento de ejercicio mixto) e intervención farmacológica (agonista inverso del receptor CB1, AM251, tres días a la semana) durante las semanas 13-15, y 3) mantenimiento de la pérdida de peso con dieta normocalórica combinada o no con un protocolo de entrenamiento y administración de AM251 una vez una semana durante las semanas 16-21.

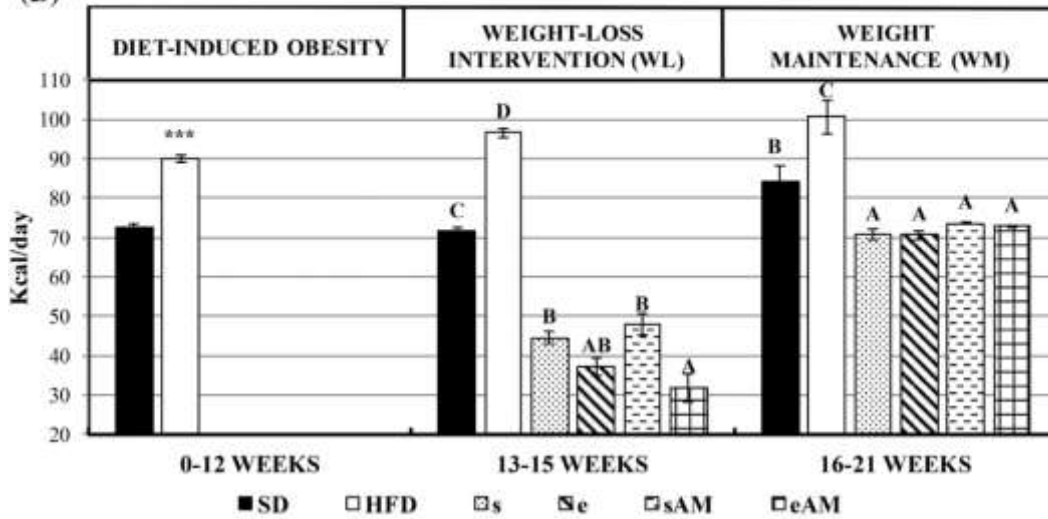
A lo largo de todo el período experimental, y debido al mayor contenido calórico de la dieta HFD, las ratas tratadas con dicha dieta exhibieron una ingesta calórica significativamente mayor en comparación con sus controles normocalóricos, lo que dio lugar a un peso corporal significativamente más elevado en el grupo de animales obesos. Durante el período de intervención de pérdida de peso de la semana 12-15 del período experimental, la acción individual de la restricción calórica, el ejercicio físico y la administración de AM251 causó una disminución en la ingesta calórica que condujo a una disminución concomitante en el peso corporal de las ratas tratadas. Sin embargo, se observaron efectos más fuertes cuando se combinaron las tres intervenciones.

(A)

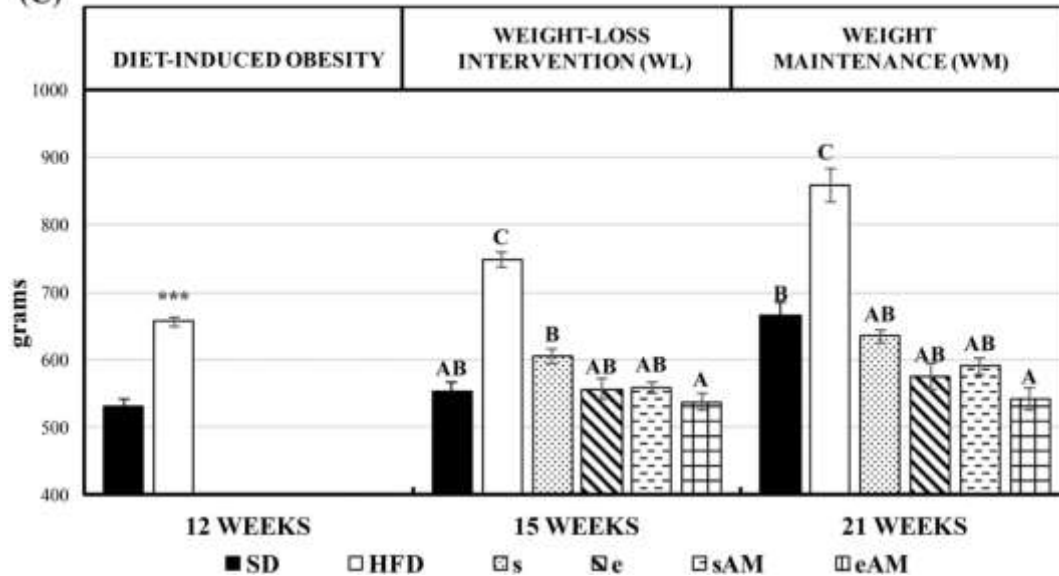
EXPERIMENTAL DESIGN



(B)



(C)



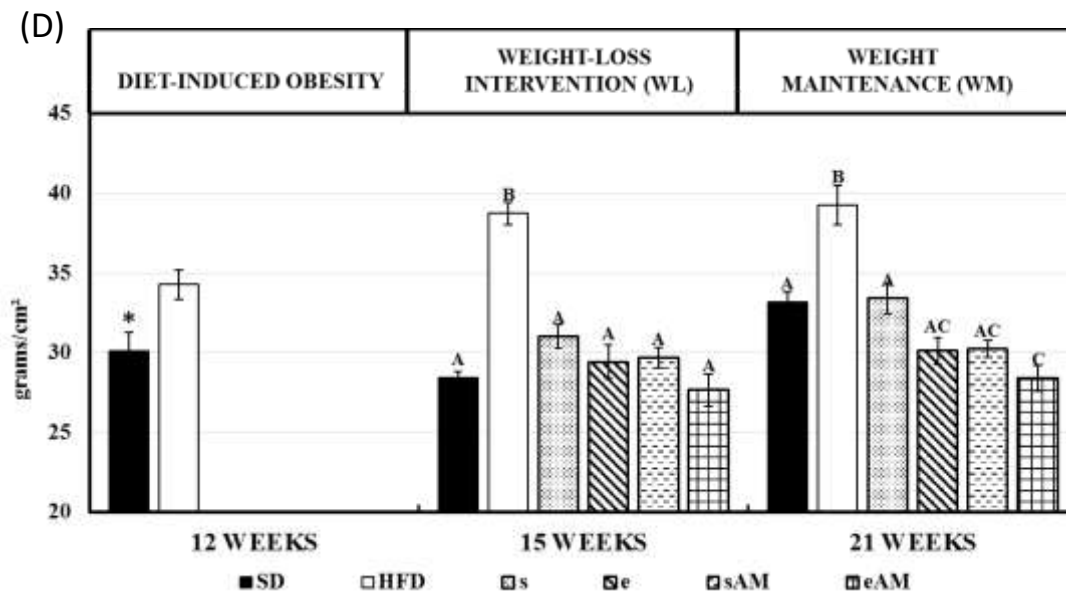


Figura 11.- Efectos de la obesidad inducida por la dieta e intervenciones de control de peso sobre la ingesta calórica, el peso corporal y la relación peso corporal / longitud del fémur. Se llevaron a cabo seis experimentos de control durante 21 semanas utilizando una dieta normocalórica estándar para ratas (SD12, SD15 y SD21) o una dieta alta en grasa (60% Kcal en forma de grasa) para inducir obesidad (HFD12, HFD15 y HFD21). Para los experimentos de intervención, las ratas se dividieron en 8 grupos que fueron alimentados con la dieta hipercalórica para inducir la obesidad durante 12 semanas, seguidas de tres semanas de intervención con restricción calórica para perder peso (WL15) combinada o no con el protocolo de entrenamiento (e ó s, respectivamente) y el tratamiento farmacológico con el fármaco bloqueante del receptor CB1 (AM). El período de intervención fue seguido por un período adicional de mantenimiento de peso de 6 semanas de tratamiento dietético con una dieta normocalórica estándar para ratas (WM21) combinada o no con el protocolo de entrenamiento (e ó s, respectivamente) y el tratamiento farmacológico (AM) para mantener el peso perdido durante el período de intervención anterior de tres semanas. (A) Diseño experimental, (B) ingesta calórica diaria promedio (kcal/día) a lo largo de las diferentes etapas experimentales (inducción de la obesidad, intervención de adelgazamiento y mantenimiento de peso), (C) peso corporal promedio al final de las diferentes etapas experimentales, (D) relación peso corporal/longitud del fémur (g/cm²) al final de las diferentes etapas experimentales. Los resultados son medias de ocho ratas \pm EEM representado por barras verticales. *** P <0,001 en la prueba t (12 semanas). A,B,C, medias con letras diferentes son significativamente diferentes (tratamiento ANOVA, P <0,05; 15 y 21 semanas).

A lo largo de la etapa de mantenimiento de peso, se logró una estabilización de la ingesta calórica y el mantenimiento del peso corporal entre los diferentes grupos de intervención por debajo de los valores mostrados por los controles SD y HFD. Además, el protocolo de entrenamiento y la administración del supresor del apetito jugaron un papel importante para evitar el efecto rebote en dicho parámetro. Estas acciones beneficiosas sobre el peso corporal se reflejaron en una tendencia similar en la relación peso corporal / longitud del fémur en las diferentes etapas experimentales, especialmente cuando el ejercicio se combinó con la administración de AM251. Dicha relación se ha considerado representativa del índice de masa

corporal y adecuada para establecer el grado de obesidad y evolución de las ratas en un período experimental de larga duración.

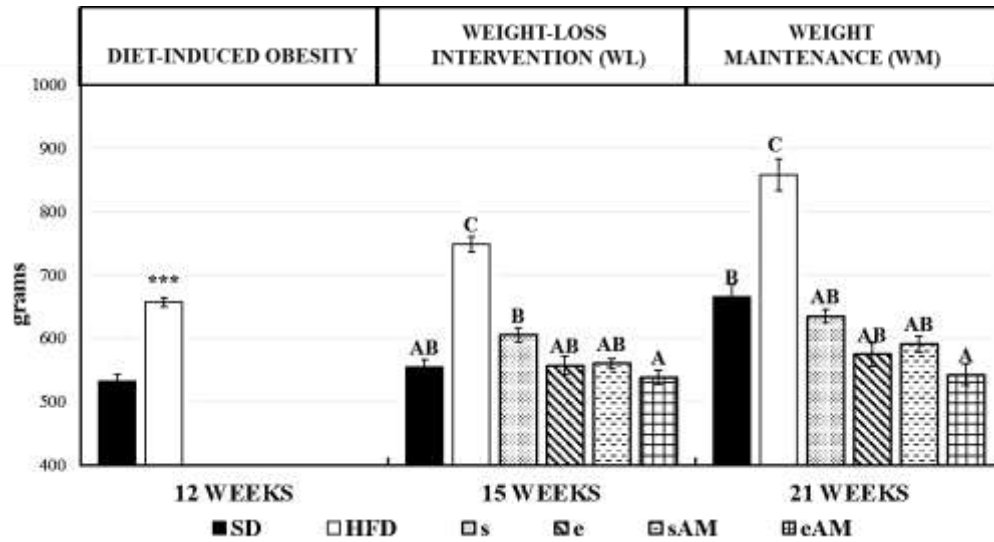
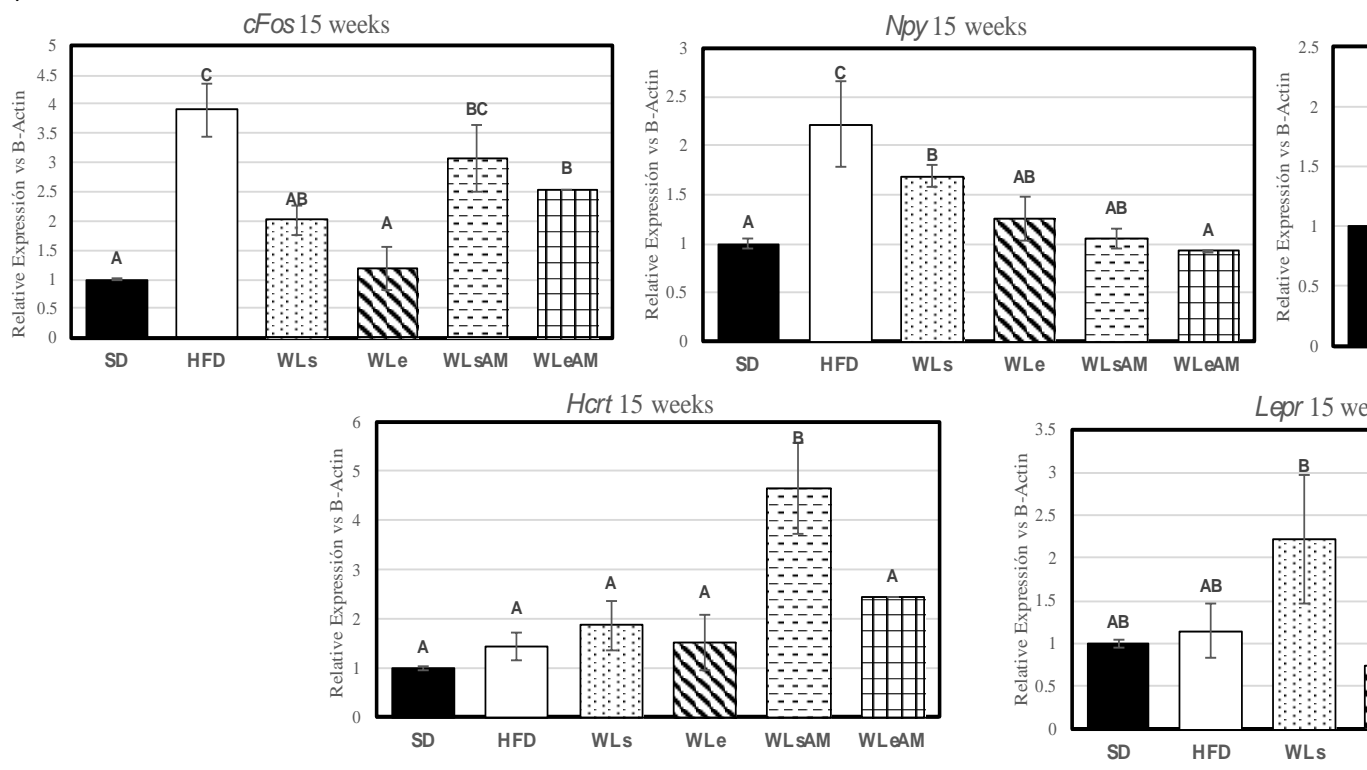


Figura 12.- Evolución del peso corporal de los distintos grupos de estudio. (CNOR), Control Normocalórico (CHC) Control Hipercalórico, (HPSED) dieta Hipocalórica y Sedentarismo, (HPEXE) dieta Hipocalórica y Ejercicio físico, (HPSEDAM) dieta Hipocalórica y Sedentarismo con fármaco AM251 y (HPEXEAM) dieta Hipocalórica y Ejercicio físico y el fármaco AM251, a lo largo del periodo experimental medida en g/día, en el eje de las abscisas se encuentra representada la semana del periodo experimental y en el eje de las ordenadas se encuentra presente los gramos consumidos al día.

4.2 Expresión génica en el hipotálamo de transcritos relacionados con la ingesta de alimento y balance energético

El efecto de la obesidad inducida por la dieta y las diferentes intervenciones de control de peso ensayadas sobre la expresión génica en el hipotálamo de transcritos relacionados con el control de la ingesta de alimento y el gasto energético (*cFos*, *Npy*, *Lepr*, *Cnr1*, *Hcrt*) se muestra en la Figura 13.

(A)



(B)

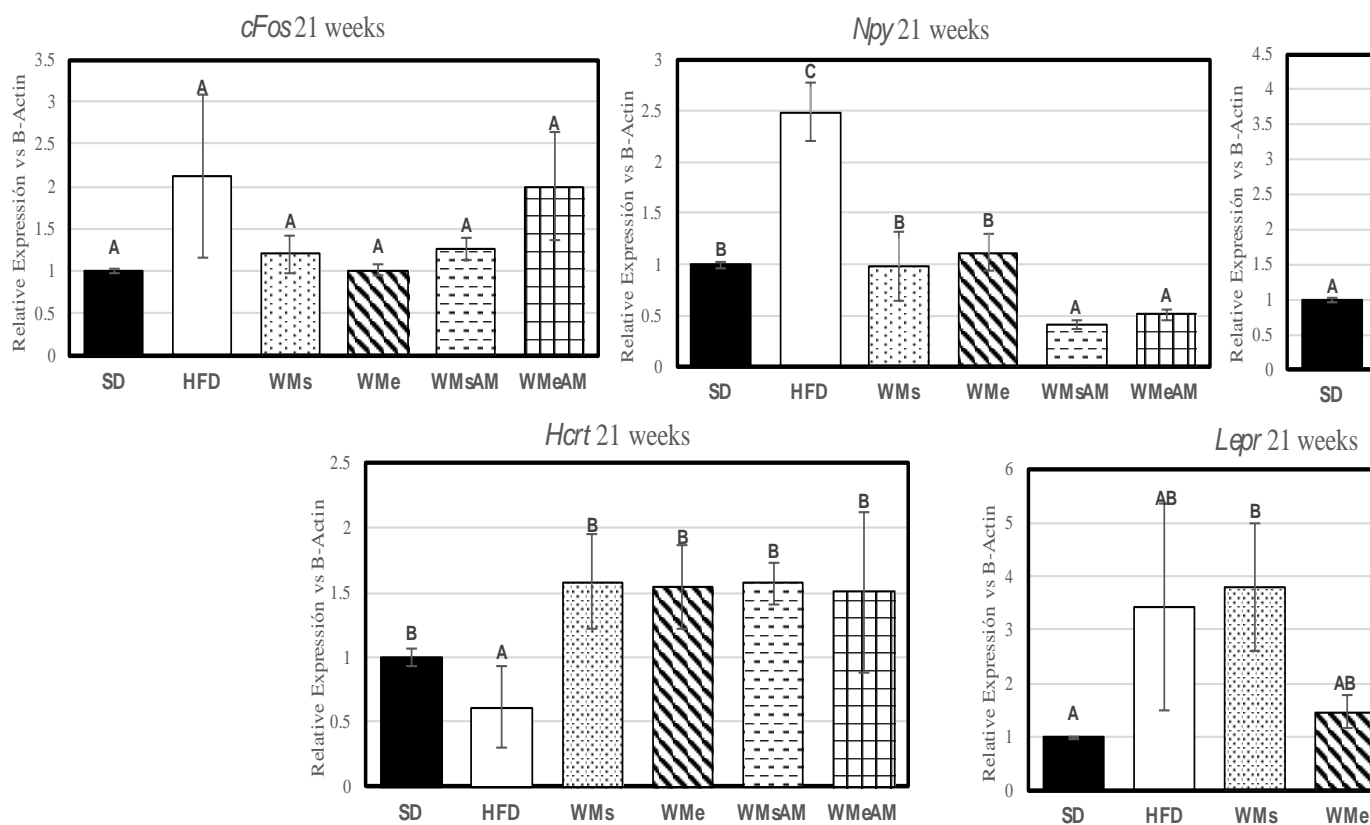


Figura 13.- Efectos de la obesidad inducida por la dieta y diferentes intervenciones de control de peso sobre la expresión génica hipotalámica de transcriptos de alimentos y el equilibrio energético al final de las etapas de intervención de pérdida de peso y mantenimiento del peso perdido. SD, control normocalórico; pérdida de peso con restricción calórica (sem 12-15), WLe, intervención de pérdida de peso con restricción calórica y ejercicio físico (sem 12-15), WLSA, pérdida de peso con restricción calórica y bloqueante de los receptores CB1 (sem 12-15), WLeAM, intervención de pérdida de peso con restricción calórica, ejercicio físico y bloqueante de los receptores CB1 (sem 12-15), WMe, mantenimiento de peso perdido con dieta normocalórica y ejercicio físico (sem 15-21), WMs, mantenimiento de peso perdido con dieta normocalórica y bloqueante de los receptores CB1 (sem 15-21), WMeAM, mantenimiento de peso perdido con dieta normocalórica, ejercicio físico y bloqueante de los receptores CB1 (sem 15-21). Los resultados son medias de ocho ratas \pm SEM representado por barras verticales. A,B,C, medias con letras distintas son significativamente diferentes (tratamiento vs control). *Npy*, neuropéptido Y, *Lepr*, receptor de leptina, *Hcr*, orexina A, *Cnr1*, receptor cannabinoide 1.

La expresión de c-fos y Npy aumentó en los animales alimentados con HFD en las semanas 15 y 21 en comparación con el grupo de SD, y disminuyó como resultado de la pérdida de peso corporal. Tal disminución solo fue observable en Npy durante la etapa de mantenimiento del peso perdido. Por otra parte, la administración del fármaco AM251 dio lugar a una potenciación en el efecto inhibitorio de la expresión de Npy y Cnr1 que mostraron las intervenciones de restricción calórica y ejercicio físico.

4.3 Capacidad aeróbica y parámetros de condición física

En la Figura 14 se muestran los resultados de un test incremental realizado a los distintos grupos experimentales en el momento de finalización del periodo experimental de 21 semanas. Dicho test valoró la capacidad aeróbica de los grupos experimentales además de la distancia recorrida y la velocidad máxima obtenida, estos dos últimos parámetros pueden darnos idea de la condición física del animal, además de su relación con la capacidad aeróbica.

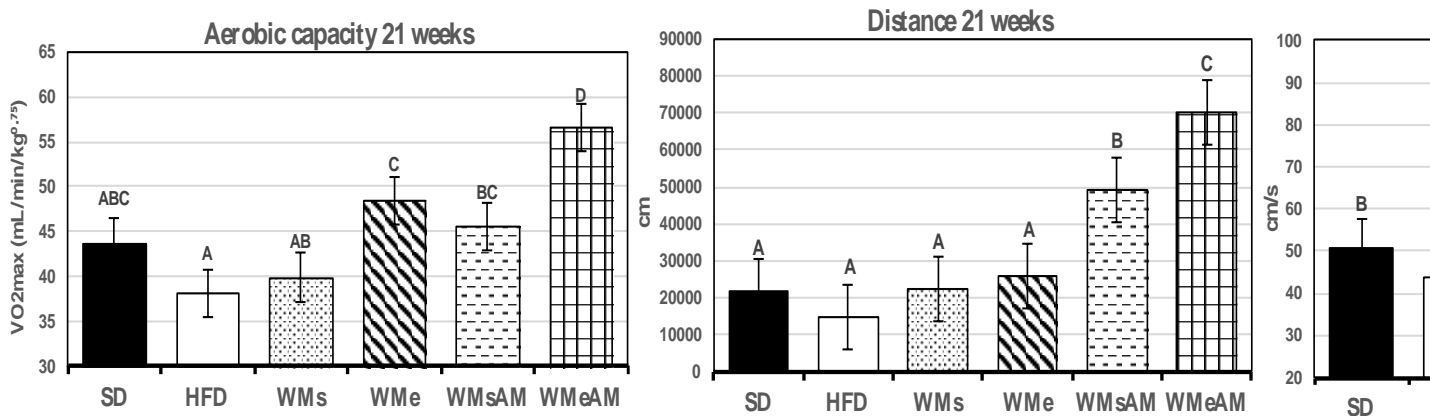


Figura 14.- Efectos de la obesidad inducida por la dieta y diferentes intervenciones de control de peso sobre la capacidad aeróbica y parámetro de velocidad durante el periodo experimental. SD, control normocalórico, HFD, control hipercalórico, WMs, mantenimiento de peso perdido con dieta normocalórica y ejercicio físico (sem 15-21), WMsAM, mantenimiento de peso perdido con dieta normocalórica y bloqueante de los receptores CB1 (sem 15-21), WMeAM, mantenimiento de peso perdido con dieta normocalórica, ejercicio físico y bloqueante de los receptores CB1 (sem 15-21). Los datos están representados por barras verticales. A,B,C, medias con letras distintas son significativamente diferentes (tratamiento ANOVA, $P < 0,05$).

4.4 Perfil glucémico y área bajo la curva

Los resultados del test de O'Sullivan (área bajo la curva tras la administración de una sobrecarga oral de glucosa) realizado a la 12, 15 y 21 semanas del periodo experimental en los grupos control e intervención se muestra en la Figura 15. Tras el periodo de inducción de la obesidad de 12 semanas, el grupo de animales que consumió la dieta hipercalórica, mostró un aumento en el pico de glucemia a los 30 minutos tras la administración de la sobrecarga oral, así como unas cifras elevadas de glucemia durante un tiempo más prolongado en comparación con los animales pertenecientes al grupo SD. Además, el área bajo la curva para el grupo obeso fue más del doble en superficie que el grupo control.

Tras el periodo de 12 a 15 semanas en el cual se implantaron las distintas intervenciones de control de peso, se volvió a observar en el grupo HFD un perfil glucémico claramente diferenciado y característico de una situación de resistencia a la insulina, así como un área bajo la curva significativamente superior al grupo SD. Las diferentes intervenciones dieron lugar a una mejora significativa en estos parámetros los cuales volvieron a valores parecidos al del grupo control normocalórico. Similares resultados se observaron tras 21 semanas en el cual predominó el objetivo del mantenimiento del peso perdido ingiriendo dieta normocalórica en combinación a las distintas intervenciones descritas. Cabe destacar el efecto del ejercicio físico junto a dieta normocalórica donde a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás grupos si se pudo apreciar un mejor control glucídico. Estos datos apuntan a una situación de resistencia a la insulina, que se revirtió con las intervenciones de control de peso ensayadas.

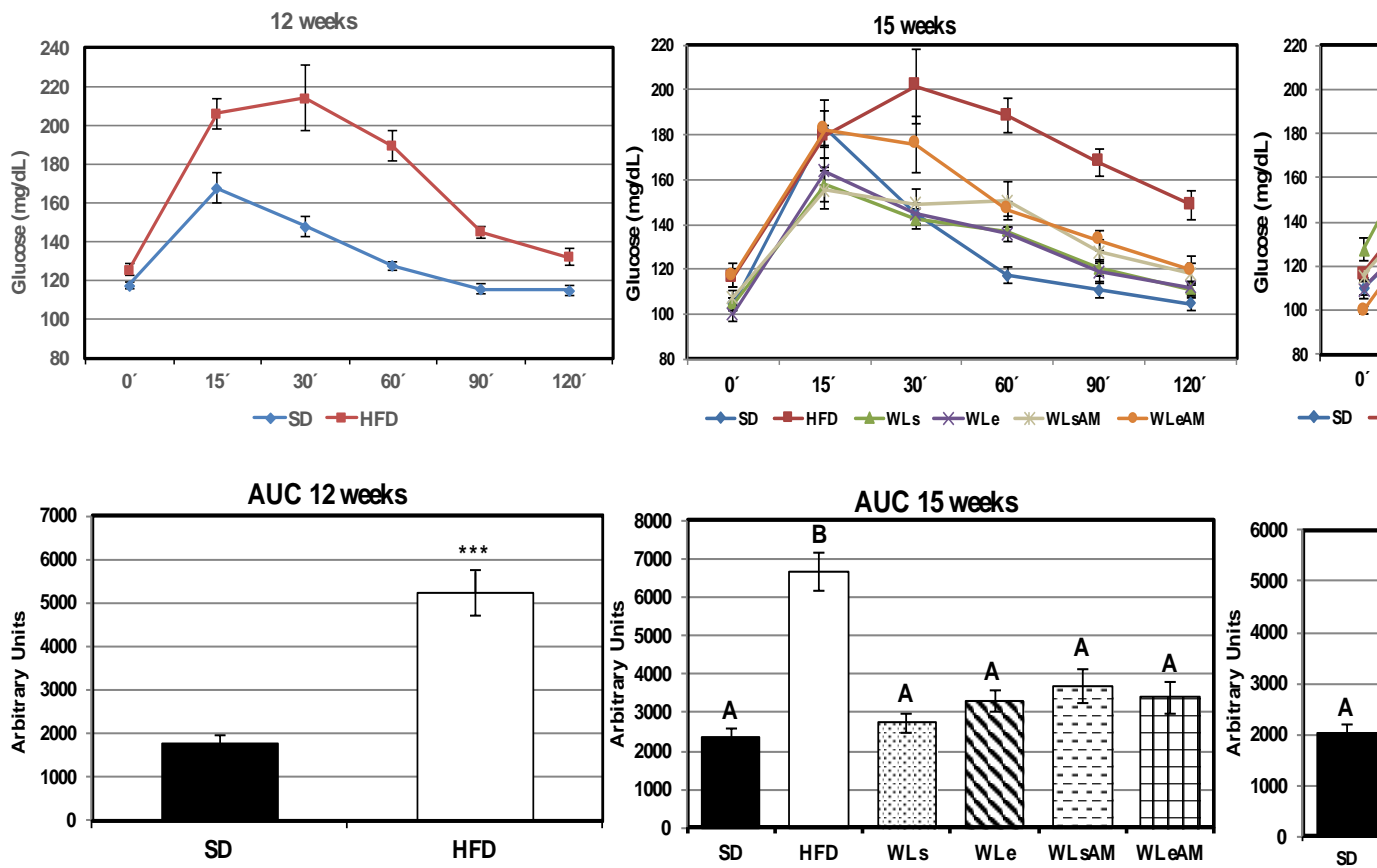


Figura 15.- Efectos de la obesidad inducida por la dieta y diferentes intervenciones de control de peso sobre el perfil glucémico y área glucosa oral medido a las 12, 15 o 21 semanas del período experimental. SD, grupo de dieta estándar normocalórica, HFD, grupo tratado con dieta alta en grasas para la pérdida de peso (WL) en las semanas 13-15: WLs, ratas obesas tratadas con restricción calórica y sin ejercicio, WLe, ratas obesas tratadas con ejercicio físico, WLsAM, ratas obesas tratadas con restricción calórica en combinación con la administración de AM251 y sin ejercicio, WLeAM, ratas obesas tratadas con restricción calórica en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso (WM) en las semanas 16-21: WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMsAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con restricción calórica y administración de AM251, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. Los resultados son medias de ocho ratas por grupo. *** P < 0,05 en la prueba t (12 semanas). A,B,C tratamientos con letras distintas son significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05; 15 y 21 semanas). (unidades arbitrarias).

4.5 Peso del hígado, contenido de grasa hepática, perfil de ácidos grasos y expresión génica de enzimas lipogénicas y lipolíticas

4.5.1 Peso del hígado y contenido de grasa hepática

La inducción dietética de la obesidad mediante una dieta alta en grasa resultó en incrementos significativos en el peso del hígado y en el contenido de grasa hepática a las 12 o 15 semanas del período experimental, mientras que en la semana 21 se observó un aumento significativo en el contenido de grasa hepática pero no en el peso del hígado con respecto a la fase anterior del periodo experimental (Figura 16). Todas las intervenciones ensayadas revirtieron eficazmente la hepatomegalia y la esteatosis inducida por la obesidad. De hecho, solo la restricción calórica de la dieta durante el período de intervención y el cambio posterior a una dieta normocalórica fue suficiente para revertirlos. Sin embargo, el protocolo de entrenamiento mixto mostró una tendencia hacia disminuciones más consistentes en el peso del hígado, con una acción especialmente pronunciada en el grupo al que se administró AM251 a las 21 semanas. Con respecto a las comparaciones entre los controles normo e hipercalóricos dentro del grupo entre las semanas 15 y 21, se observó una pequeña disminución en el peso del hígado y el contenido de grasa en el grupo HFD, mientras que esta última aumentó en el grupo SD. En cuanto a los grupos de intervención, se observó un pequeño aumento en el peso del hígado en los animales WM y WMe al final del período posterior a la intervención (21 semanas) en comparación con WL y WLe las 15 semanas, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en relación al contenido de grasa hepática, lo que indica un mantenimiento general de los efectos beneficiosos logrados por los tratamientos de pérdida de peso después de las 6 semanas posteriores a la intervención.

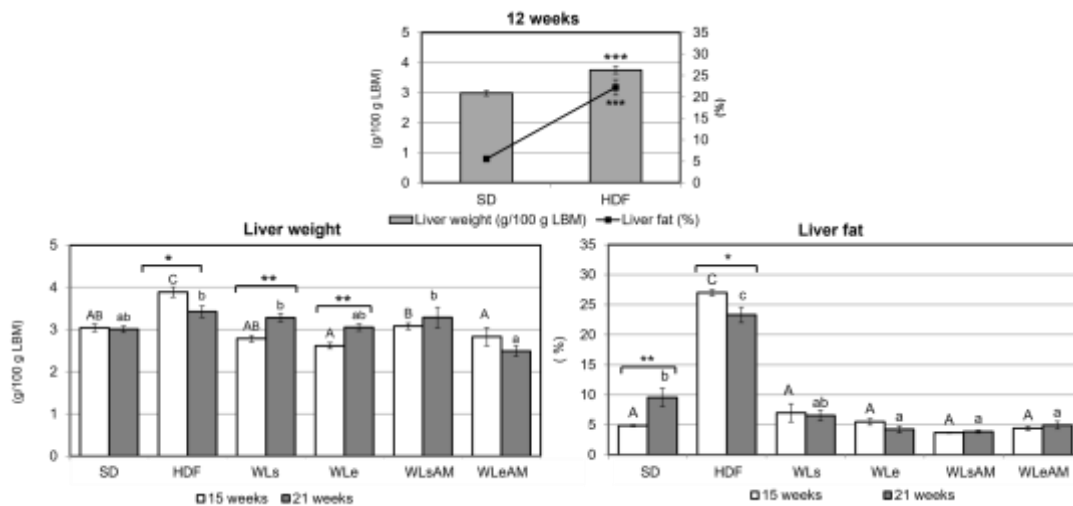


Figura 16.- Efectos de la obesidad inducida por la dieta y diferentes intervenciones de control de peso sobre el peso del hígado y el contenido de grasa hepática a las 12, 15 o 21 semanas del período experimental. SD, grupo de dieta estándar normocalórica, HDF, grupo tratado con dieta hipercalórica y fructosa. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) en las semanas 13-15: WLS, ratas obesas tratadas con restricción calórica y sin ejercicio, WLe, ratas obesas tratadas con restricción calórica en combinación con ejercicio físico, WLSAM, ratas obesas tratadas con restricción calórica en combinación con la administración de AM251 y sin ejercicio, WLeAM, ratas obesas tratadas con restricción calórica en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso (WM) en las semanas 16-21: WMs, ratas tratadas con dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMSAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con administración de AM251 y sin ejercicio, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. Los resultados son medias de ocho ratas \pm SEM representado por barras verticales. *, **, $P < 0,05$ o $0,01$ en la prueba t al comparar un mismo grupo experimental entre 15 y 21 semanas. ***, $P < 0,001$ en la prueba t a las 12 semanas. A,B,C/a,b,c, tratamientos con letras distintas en la misma fase del periodo experimental son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$; 15 y 21 semanas).

4.5.2 Perfil hepático de ácidos grasos

El efecto de la obesidad y las diferentes intervenciones de pérdida de peso sobre el perfil de ácidos grasos hepáticos se presenta en la Tabla 11. Los animales obesos mostraron una disminución en el porcentaje de ácidos grasos saturados y poliinsaturados totales que fue especialmente evidente para el esteárico, araquidónico o docosahexaenoico (DHA). De acuerdo con estos cambios, el índice de actividad Δ longasa/desaturasa (ácido araquidónico/ácido linoleico) fue significativamente menor en estas ratas. Por el contrario, se encontró un aumento significativo en los ácidos grasos monoinsaturados que fue especialmente pronunciado en el ácido oleico y se observó un aumento significativo correspondiente en el índice de actividad Oleoil-CoA (relación ácido oleico/ácido esteárico).

Al final del período de intervención de tres semanas (semana 15), las modificaciones inducidas por la obesidad en los ácidos grasos saturados, mono y poliinsaturados totales, así como en los ácidos grasos esteáricos, oleicos, linoleico, araquidónico y DHA fueron

revertidas por la restricción calórica. El ácido palmítico alcanzó valores significativamente inferiores en los grupos de intervención no solo en comparación al grupo HFD, sino también al SD. Además, el protocolo de entrenamiento mantuvo los cambios debidos a la restricción calórica. La administración de AM251 potenció los efectos de la restricción calórica y el ejercicio físico sobre los ácidos grasos mono y poliinsaturados, específicamente sobre el oleico, linoleico, araquidónico y DHA, disminuyendo el contenido de ácido palmítico. Los cambios inducidos por la obesidad en el índice de relación Δ elongasa/desaturasa y la actividad Oleoil-CoA también fueron revertidos por la restricción calórica y el ejercicio y potenciados por AM251.

Después del período de mantenimiento postintervención de 6 semanas (semana 21), se observaron los siguientes cambios en el perfil de ácidos grasos hepáticos en comparación con el grupo de HFD derivados del mantenimiento de la ingesta calórica en niveles adecuados en asociación con el ejercicio físico y potenciados por la administración de AM251: Un aumento en el porcentaje del total de ácidos grasos saturados y poliinsaturados que fue especialmente evidente para el esteárico, araquidónico o DHA, una mayor relación Δ elongasa/desaturasa y una disminución significativa en los ácidos grasos monoinsaturados que fue especialmente pronunciada en el ácido oleico y causó una disminución análoga en la actividad de Oleoil-CoA.

4.5.3 Expresión de genes hepáticos de enzimas lipogénicas y lipolíticas

La inducción de la obesidad y diferentes intervenciones de pérdida de peso afectaron críticamente la expresión génica hepática de enzimas relacionadas con la lipogénesis (Fasn, G6pd, Scd-1, Ldlr, Gpat2, Hmgcr) y la lipólisis (Cpt1a, Lpl, Lipc, Cyp7a1, Acox1, Ucp2), aunque Los efectos sobre los factores de transcripción Srebf1 y Ppara, conocidos por controlar la expresión de las primeras enzimas, no fueron significativos y solo se observaron tendencias para disminuir la expresión de Srebf1 y aumentar la de Ppara por el HFD (Figura 17 y Tabla 12). En cuanto a las enzimas lipogénicas y lipolíticas individuales estudiadas, se observó una acción inhibidora general del consumo de dieta HFD sobre la expresión de las enzimas lipogénicas a lo largo del período experimental (12, 15 y 21 semanas). Dicha acción inhibidora fue neutralizada parcial o completamente por las diferentes intervenciones de pérdida de peso con la excepción de G6pd en la semana 15. En general, los efectos derivados

de la intervención fueron más pronunciados a las 21 semanas en comparación con las 15 semanas del período experimental.

Tabla 11.- Perfil de ácidos grasos hepáticos (%) de ratas Sprague Dawley en diferentes etapas del período experimental

	Palmitico (C16:0)	Palmitoleico (C16:1)	Esteárica (C18:0)	Oleico (C18:1n9)	Linoleico (C18:2n6)	Linolenico (C18:3n3)	Araquidónico (C20:4n6)	DHA (C22:6n3)	Octadecenoico (C18:1n7)	Δ ⁵ d
12 SEMANAS										
SD	22.0	0.92 (0.17)	14.2	8.66	25.6	nd	21.9	2.60	3.76	
HFD	23.3	Nd	8.55***	29.88***	27.6	nd	7.72***	1.26**	1.73***	
SEM	1.45	-	1.18	1.18	1.29	-	2.04	0.41	0.19	
15 SEMANAS										
SD	20.9b	1.18	13.6b	7.07a	23.4b	0.04 (0.03)	26.1b	3.56b	4.09a	
HFD	21.1b	Nd	5.42a	30.99d	32.2c	nd	6.65 a	1.31a	2.32b	
WLS	16.9 ^a	Nd	17.3b	18.31bc	18.4ab	nd	23.6b	3.31b	2.86a	
WLe	16.8 ^a	Nd	14.7b	21.09c	21.9b	nd	20.5b	3.45b	1.64b	
WLSAM	14.3 ^a	0.39 ^a	18.3b	11.13ab	14.7a	nd	34.2c	5.08b	2.03a	
WLeAM	14.7 ^a	0.01 ^a	15.8b	13.68abc	19.4ab	nd	29.6bc	4.66b	1.87a	
SEM	1.27	0.186	1.64	3.18	1.93	-	3.11	0.74	0.26	
21 SEMANAS										
SD	22.9c	1.91bc	10.8ab	11.40ab	29.8c	0.40	17.0ab	2.18ab	3.55bc	
HFD	19.9abc	Nd	7.98a	30.15c	27.2bc	0.11	10.1a	2.08a	1.51a	
WMS	21.3bc	2.04bc	11.0ab	17.52b	21.7ab	nd	19.3b	3.17abc	4.01c	
WMe	18.9ab	2.51c	13.7bc	8.44a	19.9a	nd	29.4c	3.43abc	3.69c	
WMSAM	17.9ab	0.92ab	15.0bc	7.70a	19.7a	nd	32.0c	3.93bc	2.88bc	
WMeAM	16.7 ^a	0.57 ^a	15.6c	8.48a	21.9ab	nd	30.0c	4.38c	2.40ab	
SEM	1.47	0.42	1.43	2.24	1.83	0.103	2.86	0.57	0.40	

SD, control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) hiperproteica, WLe, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLSAM, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico hiperproteico con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WM) en dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMSAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. DHA, docosahexaenoico; Re, base de la relación de ácido araquidónico/ácido linoleico; Actividad oleoil-coA (SCD) calculada usando la relación ácido oleico/ácido esteárico como se describe en el texto; MON, ácidos grasos monoinsaturados totales; POL, ácidos grasos poliinsaturados totales. Los resultados son la media de 8 ratas por grupo. *P < 0,001 en la prueba t a las 12 semanas; nd: no detectado; a,b,c,d, medias dentro de la misma columna en cada etapa del período experimental que difieren significativamente (ANOVA, P < 0,05; 15 y 21 semanas).

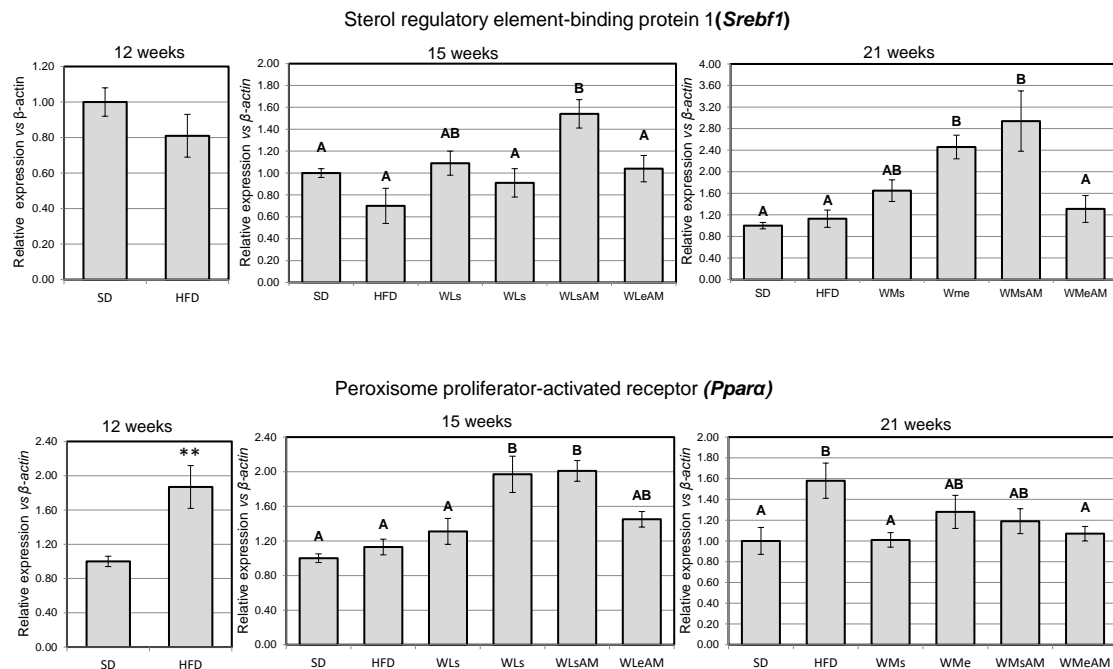


Figura 17.- Efectos de la obesidad inducida por la dieta e intervenciones de control de peso sobre la expresión de los transcritos *Srebf1* y *Ppara*. Se llevaron a cabo seis experimentos de control durante 21 semanas utilizando una dieta normocalórica estándar para ratas (SD12, SD15 y SD21) o una dieta alta en grasa (60% Kcal en forma de grasa) para inducir obesidad (HFD12, HFD15 y HFD21). Para los experimentos de intervención, las ratas se dividieron en 8 grupos que fueron alimentados con la dieta hipercalórica para inducir la obesidad durante 12 semanas, seguidas de tres semanas de intervención con restricción calórica para perder peso (WL15) combinada o no con el protocolo de entrenamiento (e ó s, respectivamente) y el tratamiento farmacológico con el fármaco bloqueante del receptor CB1 (AM). El período de intervención fue seguido por un período adicional de mantenimiento de peso de 6 semanas de tratamiento dietético con una dieta normocalórica estándar para ratas (WM21) combinada o no con el protocolo de entrenamiento (e ó s, respectivamente) y el tratamiento farmacológico (AM) para mantener el peso perdido durante el período de intervención anterior de tres semanas. (A) Diseño experimental, (B) ingesta calórica diaria promedio (kcal/día) a lo largo de las diferentes etapas experimentales (inducción de la obesidad, intervención de adelgazamiento y mantenimiento de peso), (C) peso corporal promedio al final de las diferentes etapas experimentales, (D) relación peso corporal/longitud del fémur (g/cm^2) al final de las diferentes etapas experimentales. Los resultados son medias de ocho ratas \pm EEM representado por barras verticales. *** $P < 0,001$ en la prueba t (12 semanas). A,B,C, medias con letras diferentes son significativamente diferentes (tratamiento ANOVA, $P < 0,05$; 15 y 21 semanas).

Tabla 12.- Expresión génica hepática de transcritos que codifican enzimas lipogénicas y lipolíticas.

		Fasn	Ldlr	G6pd	Scd1	Gpat2	Hmgcr
12 S	SD	1.00 (0.05)	1.00 (0.05)	1.00 (0.01)	1.00 (0.28)	1.00 (0.01)	1.00 (0.04)
	HFD	0.29 (0.06)***	0.65 (0.09)*	0.39 (0.04)***	0.41 (0.11)	0.49 (0.09)*	0.36 (0.08)***
15 S	SD	1.00 (0.09) b	1.00 (0.09) d	1.00 (0.02) c	1.00 (9.88) a	1.00 (0.01) abc	1.00 (0.05) ab
	HFD	0.12 (0.01) a	0.20 (0.02) a	0.13 (0.02) ab	0.07 (0.02) a	0.67 (0.08) a	0.12 (0.02) a
	WLS	1.05 (0.17) b	0.48 (0.02) bc	0.12 (0.01) ab	0.29 (0.10) a	0.75 (0.08) ab	2.92 (0.54) c
	WLe	0.60 (0.10) b	0.42 (0.07) abc	0.08 (0.01) a	0.07 (0.02) a	0.78 (0.09) ab	2.14 (0.26) bc
	WLSAM	0.95 (0.14) b	0.65 (0.07) c	0.17 (0.02) b	5.92 (2.33) a	1.28 (0.27) bc	1.68 (0.47) abc
	WLeAM	0.66 (0.09) b	0.36 (0.03) ab	0.11 (0.01) ab	2.27 (0.88) a	1.32 (0.27) c	2.63 (0.63) c
21 S	SD	1.00(0.08) a	1.00 (0.09) b	1.00 (0.02) ab	1.00 (0.75) ab	1.00 (0.01) ab	1.00 (0.04) ab
	HFD	0.20 (0.04) a	0.30 (0.05) a	0.51 (0.02) a	0.06 (0.01) a	0.33 (0.05) a	0.33 (0.06) a
	WMS	1.61 (0.20) bc	1.21 (0.18) b	1.18 (0.31) ab	4.74 (0.82) b	1.18 (0.09) ab	2.77 (0.36) bc
	WMe	6.06 (0.62) d	1.07 (0.12) b	1.32 (0.14) b	11.61 (1.79) c	1.41 (0.19) b	4.90 (0.42) cd
	WMSAM	2.62 (0.05) c	0.94 (0.11) b	0.77 (0.08) ab	3.71 (1.26) ab	1.39 (0.32) b	4.11 (0.43) cd
	WMeAM	1.14 (0.22) ab	0.77 (0.08) b	1.00 (0.14) ab	2.19 (0.37) ab	3.00 (0.44) c	5.56 (1.04) d
		Cpt1a	Lpl	Lipc	Cyp7a1	Acox	Ucp2
12 S	SD	1.00 (0.09)	1.00 (0.01)	1.00 (0.11)	1.00 (0.04)	1.00 (0.32)	1.00 (0.02)
	HFD	0.93 (0.08)	0.42 (0.10)***	0.48 (0.06)*	2.75 (0.40)***	1.57 (0.22)	2.42 (0.25)**
15 S	SD	1.00 (0.15) a	1.00 (0.02) a	1.00 (0.13) ab	1.00 (0.17) a	1.00 (0.15) a	1.00 (0.02) a
	HFD	0.98 (0.08) a	1.00 (0.11) a	0.79 (0.05) ab	2.51 (0.30) a	1.17 (0.12) a	0.56 (0.06) a
	WLS	1.21 (0.14) a	0.95 (0.14) a	0.80 (0.08) ab	6.47 (0.85) c	1.06 (0.11) a	1.03 (0.15) a
	WLe	1.00 (0.14) a	1.11 (0.12) a	0.90 (0.12) ab	2.86 (0.44) ab	1.05 (0.09) a	0.86 (0.08) a
	WLSAM	0.92 (0.22) a	2.84 (0.69) a	0.52 (0.12) a	2.48 (0.46) a	1.55 (0.60) a	0.91 (0.17) a
	WLeAM	1.66 (0.38) a	4.61 (1.05) b	1.35 (0.25) b	6.30 (1.73) bc	3.25 (0.53) b	1.91 (0.37) b
21 S	SD	1.00 (0.10) a	1.00 (0.02) ab	1.00 (0.04) a	1.00 (0.06) a	1.00 (0.14) a	1.00 (0.01) a
	HFD	0.63 (0.07) a	0.53 (0.08) a	0.59 (0.05) a	2.95 (0.36) ab	0.67 (0.08) a	0.62 (0.09) a
	WMS	0.84 (0.13) a	0.60 (0.10) ab	1.27 (0.12) a	4.87 (0.99) ab	0.58 (0.03) a	0.80 (0.09) a
	WMe	0.79 (0.05) a	0.66 (0.08) ab	1.53 (0.16) a	8.74 (1.35) ab	0.95 (0.04) a	1.28 (0.11) a
	WMSAM	1.55 (0.21) a	1.66 (0.37) b	1.50 (0.18) a	12.43 (4.56) b	2.23 (0.36) a	3.05 (0.33) b
	WMeAM	4.62 (1.09) b	3.20 (0.41) c	2.82 (0.62) b	12.79 (3.63) b	5.13 (1.14) b	6.29 (0.89) c

SD, dieta control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) en las semanas 12-15. WLS, dieta de intervención hiperproteica, WLe, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLSAM, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251, WLeAM, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WM) en las semanas 16-21: WMS, ratas tratadas con dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMSAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con administración de AM251 y sin ejercicio, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. Los datos de expresión génica se expresan relativamente frente a la β -actina para Fasn, ácido graso sintasa, Ldlr, receptor de lipoproteínas de baja densidad, G6pd, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, Scd1, estearoil-CoA desaturasa-1, Gpat2, glicerol-3-fosfato acil transferasa 2, Hmgcr, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, Cpt1a, carnitina palmitoil transferasa-1, Lpl, lipoprotein lipasa, Lipc, triacilglicerol lipasa hepática, Cyp7a1, colesterol 7 α -hidroxilasa, Acox1, acil-CoA oxidasa peroxisomal, Ucp2, proteína desacopladora 2. Los Resultados son media de 8 ratas. SEM, error estándar de la media. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 en la prueba t a las 12 semanas.; nd: no detectado; a,b,c,d, medias dentro de la misma columna en cada etapa del período experimental (15 o 21 semanas) con letras distintas difieren significativamente (ANOVA, P <0,05; 15 y 21 semanas).

La inducción de la obesidad dio lugar a una disminución en la expresión de Lipc a lo largo de todo el período experimental, al tiempo que causó un aumento de la expresión de Cyp7a1 a cargo de la síntesis de ácidos biliares. Para el resto de enzimas lipolíticas, los cambios inducidos por la obesidad variaron dentro de los diferentes períodos experimentales, tales como la disminución de la expresión de Lpl en las semanas 12 y 21 sin observarse cambios en la semana 15 o el incremento de Ucp2 solo en la semana 12. Aunque los efectos inductores de la obesidad sobre la expresión de las enzimas lipolíticas fueron complejas y no siguieron una tendencia uniforme, las intervenciones de adelgazamiento, especialmente el protocolo de entrenamiento, mostraron una tendencia a incrementar la expresión de los transcritos que codifican enzimas lipolíticas. No obstante, dicho efecto fue más pronunciado en la semana 21 (Lpl, Lipc, Cyp7a1, Acox1, Ucp2) en comparación con la semana 15 (Lpl, Lipc). Curiosamente, los efectos activadores del ejercicio se potenciaron considerablemente con la administración de AM251 en cualquiera de los puntos de tiempo mencionados anteriormente. Además, se observó un efecto inductor específico de AM251 sobre la expresión de Lpl, Acox y Ucp2 en la semana 15, y de todas las enzimas lipolíticas en la semana 21. Todos estos hallazgos apuntan al hecho de que los efectos de las intervenciones de pérdida de peso sobre la expresión génica de las enzimas lipogénicas y lipolíticas se mantuvieron y, en algunos casos, aumentaron durante las 6 semanas posteriores a la intervención.

4.6 Funcionalidad cardiovascular: ECG y Expresión génica en aorta

Los efectos de la obesidad y las distintas intervenciones de control de peso corporal (Restricción calórica ejercicio físico y agonista inverso de los receptores CB1) sobre parámetros electrocardiográficos auriculares y ventriculares de ratas SD a lo largo de las 3 fases del periodo experimental (12 semanas periodo de inducción de la obesidad, 15 semanas intervención de pérdida de peso y 21 semanas mantenimiento del peso perdido) se muestran en la (Tabla 13).

Tabla 13.- Efectos de las intervenciones de la obesidad y las intervenciones de control de peso sobre parámetros de función

	Bodyweight (g)	Heart weight (g)	Heart rate (bpm)	P wavelengt h (s)	P wave amplitude (mV)	PR Interval (s)	QRS length (s)	QRS amplitude (mV)
12 weeks								
SD	516.9	1.53	293.7	0.019	0.105	0.027	0.019	1.35
HFD	648.7***	1.65	290.0	0.020	0.134*	0.025	0.020	1.69*
SEM	19.7	0.045	7.3	0.002	0.010	0.002	0.003	0.075
15 weeks								
SD	503.3b	1.41 ^a	263.5a	0.029b	0.112a	0.059b	0.021 ^a	1.15a
HFD	704.1 ^a	1.96b	242.4a	0.022b	0.066a	0.055b	0.021 ^a	1.76b
WLs	566.7c	1.54 ^a	265.3a	0.024ab	0.117a	0.064b	0.021 ^a	0.911a
WLe	552.5bc	1.50 ^a	260.9a	0.020b	0.130a	0.030a	0.021 ^a	1.15a
WLsAM	544.2bc	1.55 ^a	268.0a	0.025ab	0.119a	0.065b	0.020 ^a	0.885a
WLeAM	511.5bc	1.45 ^a	254.4a	0.019b	0.106a	0.059b	0.020 ^a	1.12a
SEM	21.2	0.09	7.8	0.002	0.041	0.003	0.001	0.105
21 weeks								
SD	631.7a	1.69 ^a	267.9a	0.021ab	0.089a	0.061ab	0.023ab	1.64b
HFD	803.8b	2.02b	274.5a	0.023b	0.129b	0.063ab	0.021 ^a	1.97c
WMs	634.2a	1.73 ^a	263.7a	0.020ab	0.103ab	0.061ab	0.021 ^a	1.09a
WMe	574.4a	1.64 ^a	255.9a	0.020ab	0.127a	0.067b	0.027b	1.14a
WMsAM	546.4a	1.72 ^a	257.1a	0.022b	0.076a	0.057a	0.022ab	1.32a
WMeAM	590.9a	1.64 ^a	273.9a	0.017c	0.095b	0.054a	0.021 ^a	1.28a
SEM	41.8	0.093	6.5	0.001	0.010	0.002	0.002	0.102

SD, dieta control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) en las semanas 16-21: WLs, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLe, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251, WLeAM, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WM) en las semanas 16-21: WMs, ratas tratadas con dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD y ejercicio físico, WMsAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con administración de AM251 y sin ejercicio, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Los Resultados son media de 8 ratas. SEM, error estándar de la media. * P <0,05 en la prueba t a las 12 semanas. a,b,c, medias dentro de la misma columna con letras distintas difieren significativamente (ANOVA, P <0,05; 15 y 21 semanas).

El aumento del peso corporal relacionado con la obesidad dio lugar a un corazón hipertrofiado, mientras que las intervenciones para bajar de peso redujeron el peso del corazón a valores similares a los encontrados en el grupo SD en todas las fases del periodo experimental (Tabla 13). De igual forma, los parámetros electrocardiográficos ventriculares se vieron fuertemente afectados en los grupos de HFD que mostraron un aumento significativo en las amplitudes del complejo QRS y la onda T. El aumento de amplitudes se revirtió con la pérdida de peso corporal lograda por las diferentes intervenciones ensayadas, alcanzando valores iguales o incluso inferiores a los del grupo SD. En cuanto al intervalo QTc, se incrementó con la obesidad y tendió a disminuir con la restricción calórica y el ejercicio físico excepto para el grupo WMeAM en la semana 21. No se observaron cambios relevantes en ninguno de los parámetros relacionados con la funcionalidad auricular. La actividad plasmática de CK-MB aumentó en animales que consumieron la dieta de inducción de la obesidad en las semanas 15 y 21 y disminuyó por las diferentes intervenciones de pérdida de peso en estas fases del periodo experimental (Tabla 14). Sin embargo, el desarrollo de la obesidad no condujo a modificaciones apreciables en la medida de presión arterial (datos no mostrados) o en los niveles plasmáticos de enzima convertidora de angiotensina.

Tabla 14.- Influencia de la obesidad y las intervenciones de control de peso sobre parámetros plasmáticos de funcionalidad cardíaca y renal.

	CK-MB (U/dL)	ACE (U/dL)	Proteínas totales (g/dL)	Albumina (g/dL)	Urea (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)	Craeatinina (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)
12 week								
SD	395.6	69.1	5.87	2.66	28.0	0.95	0.57	6.08
HFD	292.4	81.8	6.17*	2.92	32.7*	0.69	0.11	5.95
SEM	0.16	0.67	0.14	0.15	0.16	0.16	0.08	0.41
15 week								
SD	358.9a	73.4a	6.22c	3.33b	28.2a	0.94ab	0.71bc	6.13b
HFD	987.0b	73.6a	6.51c	3.08ab	31.0a	0.90ab	0.15a	5.40ab
WLS	335.6a	57.5b	5.57a	2.88ab	28.0a	0.72a	0.49abc	4.93a
WLe	362.1a	77.3a	5.85ab	2.86ab	29.7a	0.92ab	0.81c	5.45ab
WLSAM	213.6a	72.3a	5.34a	2.61a	34.0a	1.02ab	0.40ab	5.41ab
WLeAM	196.1a	79.8a	5.42a	2.73ab	26.2a	1.19b	0.40ab	6.16b
SEM	154.0	9.42	0.18	0.21	3.10	0.15	0.13	0.30
21 week								
SD	166.7a	65.0a	6.39a	2.92ab	32.3b	0.78a	0.054a	6.28a
HFD	571.7b	70.8b	6.07a	2.94ab	24.3ab	1.07a	0.046a	5.93a
WMS	206.4a	85.7bc	6.24a	3.09ab	24.0a	1.29ab	0.47a	5.59a
WMe	207.6a	96.7d	6.09a	3.37b	26.6ab	0.86a	0.55a	5.99a
WMSAM	283.0a	72.5b	6.00a	2.60a	25.6ab	1.29ab	0.54a	5.85a
WMeAM	254.0a	75.4b	5.74a	3.09ab	40.6c	1.24ab	0.55a	5.63a
SEM	307.4	11.8	0.23	0.22	2.70	0.24	0.67	0.57

SD, dieta control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) en las semanas 12-15. WLS, dieta de intervención hiperproteica, WLe, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLSAM, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251, WLeAM, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WM) en las semanas 16-21: WMS, ratas tratadas con dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMSAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con administración de AM251 y sin ejercicio, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. CK-MB, creatina quinasa MB. Los Resultados son media de 8 ratas. SEM, error estándar de la media. * P <0,05, *** P <0,001 en la prueba t a las 12 semanas. a,b,c, medias dentro de la misma columna en cada etapa del período experimental (15 o 21 semanas) con letras distintas difieren significativamente (ANOVA, P <0,05; 15 y 21 semanas).

La influencia de la obesidad y los tratamientos de control de peso sobre la expresión génica de transcriptos relacionados con adhesión (Vcam, Sele y Vegfa) e inflamación vascular a nivel de aorta (Nos2 y Ptgs2) a las 21 semanas de periodo experimental, y sobre el índice aterogénico a lo largo de todo el periodo experimental se muestra en la (Figura18).

La expresión génica de transcritos relacionados con la adhesión vascular y la angiogénesis (Vcam, Sele, Vegfa) fue mayor en la aorta de los controles HFD en comparación a SD después de 21 semanas del período experimental (Figura 19). Por el contrario, las diferentes intervenciones de pérdida de peso y mantenimiento provocaron una disminución significativa de los niveles de expresión a valores incluso inferiores a los observados en el grupo alimentado con dieta estándar normocalórica. Dichos cambios se correspondieron con mejoras significativas en el índice aterogénico del plasma (Figura 18). De igual forma, la expresión génica de Nos2, relacionada con el estado inflamatorio, fue mayor en la aorta de los animales alimentados con HFD y este incremento se revirtió mediante intervenciones de control de peso que también regularon negativamente la expresión de Ptgs2.

4.7 Parámetros plasmáticos de funcionalidad cardiaca y renal

La influencia de la obesidad inducida por la dieta y las diferentes intervenciones de control de peso en las 3 etapas diferenciadas del periodo experimental sobre parámetros plasmáticos relacionados con la funcionalidad metabólica y renal se muestra en la tabla 14. A nivel metabólico se observó un aumento en los niveles de calcio plasmático en los grupos de animales obesos y en aquellos administrados con AM251, que no se correlacionó con valores elevados de fósforo albumina o proteínas plasmáticas totales. Por otra parte, parecen de especial relevancia bajo nuestras condiciones experimentales, los cambios inducidos por la administración del agonista inverso de los receptores endocannabinoides en parámetros como en bilirrubina total y ácido úrico que aumentaron considerablemente.

En referencia a posibles índices de funcionalidad renal como el contenido de urea o creatinina en plasma, el primero aumentó como consecuencia de la obesidad inducida por la dieta, aunque el ascenso no fue consistente a lo largo de todo el periodo experimental, así como tampoco lo fue el efecto de las intervenciones ensayadas. Por contra, el contenido plasmático de creatinina disminuyó significativamente en los animales alimentados con dieta HFD, durante las tres fases del periodo experimental, revirtiéndose este descenso por las diferentes intervenciones ensayadas.

4.8 Parámetros urinarios de funcionalidad renal

La influencia de la obesidad inducida por la dieta y las distintas intervenciones de control de peso sobre parámetros urinarios de funcionalidad renal, se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15.- Efectos de las intervenciones de control de peso y DIO sobre los parámetros urinarios de la funcionalidad renal.

	Urinary Volume (mL)	Urinary pH	Phosphorus (mg/dL)	Calcium (mg/dL)	Albumin (g/dL)	Creatinine (mg/dL)	Renal Clearance (ml/min)
12 weeks							
SD	6.25	7.86	2.22	12.08	0.081	89.7	1.53
HFD	4.33	6.10	88.9***	3.15***	0.062	94.2	3.76*
SEM	0.78	0.160	0.048	0.232	0.014	3.69	0.53
15 weeks							
SD	5.99a	8.33c	2.31a	16.8b	0.077bc	79.50a	1.33ab
HFD	4.15a	6.73abc	88.8c	2.51a	0.112c	103.3b	2.55bc
WLS	5.37a	7.58bc	63.2bc	1.56a	0.061abc	88.4ab	1.41ab
WLe	5.26a	7.35bc	45.7b	2.43a	0.042ab	92.4ab	0.932a
WLSAM	13.2b	6.38ab	8.32a	8.95ab	0.012a	89.1ab	4.49d
WLeAM	12.1b	5.21a	3.60a	16.2b	0.034ab	77.6a	3.84cd
SEM	1.11	0.838	10.32	2.711	0.017	7.07	0.47
21 weeks							
SD	7.06b	6.79ab	81.2c	1.73a	0.042a	95.1a	3.90a
HFD	4.20a	6.45a	95.9c	4.89ab	0.168b	101.5a	3.60a
WMS	8.07b	7.98b	2.46a	13.5c	0.043a	88.1a	1.77a
WMe	7.83b	8.26b	2.48a	7.09abc	0.071ab	94.9a	1.94a
WMSAM	14.9c	8.20b	4.32a	10.9bc	0.057a	91.7a	3.65a
WMeAM	13.2c	6.42a	64.3b	9.54abc	0.062a	93.7a	4.10a
SEM	1.34	0.550	5.41	2.78	0.322	6.58	0.841

SD, dieta control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) en las semanas 12-15. WLS, dieta de intervención hiperproteica, WLe, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLSAM, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251, WLeAM, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WM) en las semanas 16-21: WMS, ratas tratadas con dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMSAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con administración de AM251 y sin ejercicio, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. CK-MB, creatina quinasa MB. Los Resultados son media de 8 ratas. SEM, error estándar de la media. * P <0,05, *** P <0,001 en la prueba t a las 12 semanas. a,b,c,d, medias dentro de la misma columna en cada etapa del período experimental (15 o 21 semanas) con letras distintas difieren significativamente (ANOVA, P <0,05; 15 y 21 semanas).

La proporción de aclaramiento de creatinina aumentó significativamente en nuestras condiciones experimentales como consecuencia del desarrollo de la obesidad y de la administración de AM251 durante las 2 primeras etapas del período experimental (Tabla 15). Además, el aumento relacionado con la obesidad se asoció con una albuminuria incipiente a las 15 semanas que se volvió significativa a las 21 semanas (HFD vs SD). Este no fue el caso de la administración de AM251 en la que no se detectó albuminuria. La relación de aclaramiento de creatinina también pareció verse afectada por la edad de los animales y aumentó en las ratas SD a las 21 frente a las 12 o 15 semanas. Por el contrario, la restricción calórica y el ejercicio físico tendieron a normalizar todos los marcadores anteriores de funcionalidad renal alterada, aunque los resultados no alcanzaron significación estadística en todos los casos. En cuanto al volumen urinario y los parámetros relacionados con la formación de cálculos renales, la inducción de la obesidad provocó una disminución considerable del volumen urinario y del pH, así como un aumento de la fosfaturia en las semanas 12 y 15, que corren en paralelo a una disminución de la calciuria y un aumento de la calcemia (tabla 15). El estado metabólico de ambos minerales tendió a normalizarse mediante las estrategias de control de peso implementadas. La funcionalidad renal también se vio afectada por la edad de los animales, y fueron evidentes cambios considerables en el pH urinario, fosfaturia, calciuria y aclaramiento renal en las ratas alimentadas con la dieta SD en la semana 21 en comparación con las semanas 12 y 15.

4.9 Capacidad antioxidante en hígado y riñón

Con objeto de evaluar si los cambios inducidos por la obesidad en la funcionalidad hepática y renal podrían estar mediados por un mayor estrés oxidativo, se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, así como la peroxidación lipídica en ambos órganos (Tabla 16 y 17).

✓ **Hígado**

Los marcadores plasmáticos de daño hepático seleccionados (actividades de ALT y AST) aumentaron significativamente con el tratamiento de inducción de la obesidad a lo largo de las 12, 15 y 21 semanas del período experimental (Tabla 16), y disminuyeron como resultado de las intervenciones de pérdida de peso de restricción calórica y su combinación con Administración de AM251 en la semana 15, pero no en respuesta al protocolo de entrenamiento. En la semana 21 se observó una tendencia similar hacia la disminución de las actividades plasmáticas de ALT y AST en respuesta a las estrategias de mantenimiento del peso perdido.

La expresión génica de Nfe2l2 disminuyó significativamente en los animales obesos en las semanas 12 y 21, pero no en la semana 15, mientras que los efectos diferenciales de pérdida de peso resultaron en un mantenimiento del mismo postintervención, observándose un ligero aumento de la expresión de Nfe2l2 provocado por la combinación de restricción calórica y el protocolo de entrenamiento solo en los animales a los que no se les administró AM251. La actividad catalasa se redujo en casi un 50% después de 15 o 21 semanas de tratamiento con la dieta HFD, revirtiéndose dicha disminución como consecuencia de la intervención de la restricción calórica asociada o no al ejercicio físico. Sin embargo, el mayor impacto en la actividad de la catalasa se presentó con la administración de AM251 a animales sedentarios, lo que provocó un aumento del 60-63% en comparación con los grupos SD. Curiosamente, la implementación de un protocolo de entrenamiento mixto en los animales a los que se administró AM251 condujo a una disminución significativa en la actividad de la catalasa frente a sus contrapartes sedentarias y dio como resultado valores cercanos a los grupos normocalóricos de control.

La peroxidación lipídica evaluada mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico tendió a incrementarse por la inducción dietética de obesidad, pero los resultados solo fueron significativos en la semana 15 del período experimental. Todas las intervenciones de pérdida de peso tuvieron un efecto reductor sobre este parámetro, pero la más eficiente pareció ser la combinación de restricción calórica, protocolo de entrenamiento y administración de AM251.

Table 16. Marcadores de daño hepático y enzimas antioxidantes.

	AST (UAA/mg/p roteína)	ALT (UAA/mg/p roteína)	γ-GT (UAA/mg/p roteína)	ALP (UAA/mg/p roteína)	Mn-SOD (UAA/mg/p roteína)	Cu/Zn-SOD (UAA/mg/pro teína)	CAT (UAA/mg/p roteína)	GPX (UAA/mg/p roteína)
12 semanas								
SD	69.0	20.2	2.72	109.0	29.5	555.7	16.8	12.7
HFD	92.1*	31.6*	0.58**	133.1	33.0	501.7	15.7	10.3
SEM	9.60	4.58	0.68	13.1	7.04	90.5	1.67	2.15
15 semanas								
SD	58.3a	30.5a	5.08d	88.4b	35.7ab	548.8bc	17.2b	5.78a
HFD	178.9b	74.6b	0.15a	78.8ab	39.5bc	416.8a	10.6a	11.2c
WLS	86.1a	48.5ab	2.46ab	78.0ab	29.2a	624.6c	21.5b	6.15a
WLe	94.9a	41.6a	2.62bc	51.6a	41.7bc	524.0b	19.9b	10.3bc
WLSAM	63.9a	35.6a	4.83cd	90.0b	47.8c	475.8ab	28.4c	7.91ab
WLeAM	66.6a	34.7a	4.96d	87.7b	40.2bc	452.0ab	20.9b	10.1bc
SEM	15.4	9.27	0.77	12.5	3.23	33.2	2.03	0.93
21semanas								
SD	146.2ab	38.9a	0.43a	117.2ab	27.5a	367.4ab	15.9ab	6.94a
HFD	181.9b	50.5b	0.74a	130.3b	26.4a	386.4ab	8.82a	3.36a
WLS	64.7a	31.9a	2.59b	96.6ab	47.3bc	592.1c	21.6b	17.8c
WLe	89.6ab	27.8a	4.32bc	77.1a	39.7b	626.7c	22.9b	16.8c
WLSAM	99.8ab	31.8a	4.67c	82.2a	52.0cd	456.6b	33.4c	13.0b
WLeAM	56.4a	27.6a	4.87c	79.1 ^a	58.0d	342.0a	17.9b	11.3b
SEM	33.0	3.90	0.62	15.0	2.75	30.5	2.63	1.16

SD, dieta control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso: WLe, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLSAM, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WLS, WLe, WLSAM, WLeAM), dietas de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WMe, WMsAM), dietas de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251. AST, aspartato amino transferasa; ALT, alanina amino transferase; γ-GT, γ-glutamato transaminasa; ALP, fosfatasa alcalina; Mn-SOD, superóxido dismutasa; Cu/Zn-SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPX, glutatión peroxidasa; TBARS, sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico. Los Resultados son media de tres repeticiones y **P <0,01 en la prueba t a las 12 semanas. a,b,c,d, medias dentro de la misma columna en cada etapa del período experimental (15 o 21 semanas) con P <0,05; 15 y 21 semanas).

✓ **Riñón**

En general los resultados de capacidad antioxidante renal fueron complejos y se observaron diversas interacciones entre el desarrollo de la obesidad y las intervenciones de control de peso que dificultan su interpretación. La inducción de la obesidad generó un aumento del estrés oxidativo que se ve reflejado en cambios en la actividad de Mn-SOD y GPX, las cuales aumentaron en todas las fases del periodo experimental, mientras que para la actividad de la Cu/Zn-SOD se observó un aumento como consecuencia del consumo de dieta HFD a las 15 semanas y un descenso a las 21 semanas. A diferencia de lo anteriormente descrito, la actividad catalasa tiende a subir en las semanas 12 y 15. El efecto de las intervenciones difiere en base a que el estudio se haga durante las tres semanas de pérdida de peso o tras las 6 semanas de mantenimiento de peso perdido. En la fase de pérdida de peso es destacable el aumento adicional en la actividad Mn-SOD y Catalasa como consecuencia de las intervenciones, así como el efecto diferencial del ejercicio que en un caso conduce a elevación en actividad antioxidante (Mn-SOD) y en otro la disminución (Catalasa). En la fase de mantenimiento del peso perdido (21 semanas), el ejercicio tuvo un claro efecto inhibitor sobre Cu/Zn SOD y GPX, mientras que su efecto sobre Mn-SOD y Catalasa se vió claramente modulado por la administración de AM251.

Tabla 17.- Efectos de las intervenciones de DIO y control de peso sobre las actividades antioxidantes renales y la peroxidación lipídica.

	Mn-SOD (UAA/mg/proteína)	Cu/Zn-SOD (UAA/mg/proteína)	CAT (U/mg/proteína)	GPX (nmol NADPH/ min/mg proteína)	TBARs (nmol MDA/mg proteína)
12 weeks					
SD	72.9	583.4	18.1	22.7	1.63
HFD	89.8**	581.3	20.9	26.4	1.24**
SEM	4.75	35.3	4.21	4.23	0.42
15 weeks					
SD	35.1a	547.1b	13.9a	22.1a	0.71a
HFD	50.6b	785.1c	15.7ab	23.9a	1.33bc
WLS	56.6bc	569.4b	18.7bc	27.1ab	1.66c
WLe	61.2bcd	465.2ab	16.4abc	21.7a	1.47bc
WLSAM	65.7cd	427.1 ^a	19.8c	31.7b	1.42bc
WLeAM	71.1d	531.6ab	16.3abc	33.7b	0.99ab
SEM	4.20	37.1	1.28	2.32	0.07
21 weeks					
SD	55.5a	449.5ab	26.1c	24.1a	0.902a
HFD	85.6cd	353.1 ^a	19.6abc	36.7c	1.15a
WMS	69.1abc	433.5ab	24.7c	31.5bc	0.984a
WMe	98.4d	374.4ab	20.7bc	30.1b	1.39a
WMSAM	81.5bcd	419.3ab	12.9a	24.1a	1.36a
WMeAM	63.5ab	374.4ab	14.7ab	18.9a	0.913a
SEM	6.34	33.1	2.42	1.95	0.17

SD, dieta control estándar normocalórica, HFD, dieta control hipercalórica para la inducción dietética de la obesidad. Intervenciones para la pérdida de peso (WL) en las semanas 12-15. WLS, dieta de intervención hiperproteica, WLe, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico, WLSAM, dieta de intervención hiperproteica y tratamiento farmacológico con AM251, WLeAM, dieta de intervención hiperproteica con protocolo de ejercicio físico y tratamiento farmacológico con AM251. Intervenciones de mantenimiento de peso perdido (WM) en las semanas 16-21: WMS, ratas tratadas con dieta SD y sin ejercicio, WMe, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico, WMSAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con administración de AM251 y sin ejercicio, WMeAM, ratas tratadas con dieta SD en combinación con ejercicio físico y administración de AM251. SOD superóxido dismutasa (Unidades / mg de proteína), CAT catalasa (Unidades / mg de proteína), GPX glutatión peroxidasa (nmol NADPH / min / mg de proteína), sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico TBARS (nmol MDA / mg de proteína). Los Resultados son media de 8 ratas. SEM, error estándar de la media. ** P <0,01 en la prueba t a las 12 semanas. a,b,c,d, medias dentro de la misma columna en cada etapa del período experimental (15 o 21 semanas) con letras distintas difieren significativamente (ANOVA, P <0,05; 15 y 21 semanas).

5. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad en expansión relacionada con alteraciones metabólicas como la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina, alteraciones cardiovasculares, renales o el desarrollo de NAFLD, que además genera un estado proinflamatorio y alteraciones en el estado antioxidante. Es conocido el empleo de distintas intervenciones relacionadas con el estilo de vida además de terapias farmacológicas para lograr una pérdida de peso más eficiente y evitar los efectos de rebote en el peso corporal que son habituales después de muchos tratamientos de control de peso.

El objetivo de este estudio fue comprobar cómo diferentes estrategias de pérdida de peso corporal, la restricción calórica, el ejercicio físico y un tratamiento farmacológico con un bloqueante de los receptores CB1, pueden revertir diferentes alteraciones inducidas por la obesidad en el peso corporal, afectación cardiovascular, función renal y el metabolismo lipídico hepático que conducen al desarrollo de NAFLD, prestando especial atención a los posibles mecanismos moleculares implicados. Además del periodo de intervención para la pérdida de peso, se ensayó una fase de mantenimiento del peso corporal, posterior a la intervención, con el fin de evitar los efectos de rebote posteriores al tratamiento.

5.1 Ingesta calórica y cambios ponderales

En nuestras condiciones experimentales, el consumo de HFD fue eficaz para inducir la obesidad en un modelo experimental de rata Sprague Dawley. La obesidad quedó plenamente establecida a partir de la 5ª semana mediante el consumo de una dieta obesogénica en comparación con los grupos normocalóricos (la diferencia de peso corporal entre los animales alimentados con dieta normocalórica y los alimentados con HFD fue igual o superior a 2 desviaciones estándar). Se han descrito otros modelos de DIO ^{186, 187}. Sin embargo, cabe destacar que esta combinación dietética dio lugar a un aumento de peso más rápido en los animales de experimentación. Una vez establecida la obesidad, se continuó administrando la dieta HFD a lo largo de todas las etapas del periodo experimental para poder mostrar más claramente las

alteraciones relacionadas. Durante el periodo de intervención de 12 a 15 semanas, se aplicaron diferentes estrategias que dieron lugar a una pérdida de peso corporal. Esta disminución puede ser consecuencia de varios factores que interactúan entre sí, como el alto contenido proteico de la dieta por su acción termogénica y sus altos niveles de fibra dietética soluble saciante, la potencial acción anorexigénica del ejercicio físico, la acción inhibidora sobre la ingesta de alimentos de la AM251 en el hipotálamo y la sensibilidad a la leptina que suele inhibirse con el consumo de una dieta rica en grasas ^{176, 188}. En este contexto, se ha demostrado que la administración de AM251 muestra una disminución dependiente de la dosis en la ingesta de alimentos y el aumento de peso, especialmente a dosis de 2-5 mg/kg²⁴. Se ha descrito que los modelos de DIO en roedores presentan una resistencia a la leptina asociada a unos niveles circulantes más elevados de leptina derivados de un exceso de actividad del tejido adiposo ^{189, 190, 191}, y dicha resistencia podría disminuir al finalizar el tratamiento con la HFD, potenciando así la acción anorexigénica de la leptina. Además, Tam et.al, ¹⁹² informaron de que el bloqueo de los receptores CB1 en ratones obesos restablecía la sensibilidad a la leptina endógena, que a su vez desencadenaba la hipofagia a través de la reactivación de la señalización de la melanocortina en el núcleo arqueado del hipotálamo. Por otra parte, la acción inhibidora de AM251 puede potenciarse mediante la coadministración de leptina. Recientemente, se ha descrito una interrelación entre los receptores CB1 y GLP1 que proporciona nuevas terapias para la obesidad ¹⁹³. La coadministración de un inhibidor del receptor CB1 periférico con agonistas de GLP1R de acción prolongada logra una mayor reducción del peso corporal y la masa grasa que las monoterapias al promover un balance energético negativo.

No obstante, la acción inhibidora de las diferentes intervenciones sobre la ingesta de alimentos y, en concreto, de la administración de AM251, fue muy intensa durante la primera semana de intervención para la pérdida de peso, pero disminuyó sus efectos durante las dos siguientes. En este sentido, se ha demostrado que la acción anorexigénica del fármaco disminuye tras 2-3 semanas de administración ^{176, 194, 195} y puede atribuirse al desarrollo de tolerancia. Además, otros factores como el estrés inicial inducido por el manejo diario de los animales hasta que se acostumbraron a la administración del fármaco, la toxicidad de este o del vehículo, podrían estar también implicados y constituirían una limitación a nuestro estudio.

Durante las semanas 15-21 se observó que el peso corporal perdido durante la intervención realizada inmediatamente antes no se recuperó. En esta última etapa del experimento, se implementó un patrón dietético normocalórico, disminuyendo ligeramente la cantidad de alimentos consumidos para evitar un efecto rebote. Durante este periodo de mantenimiento, se continuó con el ejercicio físico para implantar un hábito de vida saludable, y se disminuyó la intervención farmacológica a un mínimo de una administración semanal. El protocolo de entrenamiento mixto y, especialmente, la administración de AM251, contribuyeron a mantener el peso corporal mediante la regulación a la baja de los transcriptos hipotalámicos que codifican el NPY. Se ha descrito que la administración de AM251 produce una disminución significativa del número de neuronas que expresan orexina A en el hipotálamo ¹⁹⁶, mientras que la orexina-A inhibe las neuronas POMC inductoras de la saciedad y contribuye a la obesidad mediante la estimulación del sistema endocannabinoide ¹⁹⁷. Por otra parte, Di Marzo et al ¹⁹⁸ han demostrado que la señalización defectuosa de la leptina se asocia con niveles hipotalámicos elevados de endocannabinoides en ratones obesos db/db y ob/ob y en ratas Zucker, mientras que el tratamiento agudo con leptina de ratas normales y ratones ob/ob reduce los endocannabinoides anandamida y 2-araquidonoil.

En definitiva, la aplicación de las tres intervenciones (dos de ellas a una escala inferior en comparación con la etapa de pérdida de peso de 3 semanas) fue eficaz para mantener los beneficios de nuestro programa de pérdida de peso durante un período post-intervención a largo plazo en relación con el peso corporal.

5.2 Resistencia a la insulina y perfil glucémico

La inducción de la obesidad después del consumo de HFD durante 12 semanas resultó en la instauración de resistencia a la insulina, como lo demuestra el AUC más alto después de una sobrecarga de glucosa oral en comparación con los grupos de SD. Sin embargo, esta situación patológica se revirtió con intervenciones de pérdida de peso y el AUC volvió a valores similares a los de los animales SD. Otras estrategias que incluyen ingredientes funcionales derivados de leguminosas y / o ejercicio físico ¹⁹⁹ también han confirmado esta acción beneficiosa. El mantenimiento de la pérdida

de peso mejoró aún más el perfil glucémico de los animales después de la acción combinada del ejercicio físico y la administración de AM251, mejorando las alteraciones metabólicas derivadas de la resistencia a la insulina.

El receptor CB1 se expresa en el sistema nervioso central y periférico, así como en varios tejidos periféricos^{200, 201}. La literatura científica aporta datos que apoyan que los endocannabinoides están directamente involucrados en el control de la ingesta de alimentos y en la utilización de energía al dirigirse a estas dianas a nivel central y periférico y que incluyen el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo²⁰². Los efectos del AM251 sobre el metabolismo de la glucosa se pueden explicar de forma similar a otros agonistas inversos del receptor CB1²⁰³ mediante la acción metabólica "periférica" en el tejido adiposo, además de su conocido efecto "central" sobre la ingesta de alimentos, proporcionando así una estrategia eficaz para mejorar la resistencia a la insulina. La acción beneficiosa observada del AM251 también concuerda con los resultados de Esposito et al.²⁰⁴, quienes concluyeron que la modulación del receptor CB1 regulaba la captación a nivel del sistema de señalización PI3K en las células del músculo esquelético. Por lo tanto, interferir con la señalización de CB1 podría mejorar las funciones glucorreguladoras en los tejidos periféricos. De manera similar, Crespillo et al.²⁰⁵ sugirieron que el bloqueo del receptor CB1 podría desempeñar un papel importante en la restauración del estado metabólico comprometido causado por la ingesta alta de grasas y mejorar los factores de riesgo cardiometabólico. Además, en un estudio reciente, Eid et al.²⁰⁶ han probado los efectos de dos antagonistas del receptor CB1 neutros (nivel central y periférico) con perfiles de seguridad mejorados en un modelo preclínico de resistencia a la insulina. Ambos compuestos mejoraron la resistencia a la insulina a nivel periférico y ejercieron efectos similares en ratas con síndrome metabólico. También mostraron efectos antidislipídicos, antihiperuricémicos y antiinflamatorios.

5.3 Efecto sobre función cardiovascular

El consumo de una dieta rica en grasas saturadas se ha asociado con cambios en el peso del corazón que van en paralelo al desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina y que pueden provocar específicamente modificaciones ventriculares, aumentando la masa del ventrículo izquierdo que, a su vez, conducirá a alteraciones diastólicas y sistólicas ²⁰⁷. Esos cambios se reflejan en modificaciones electrocardiográficas como el aumento de la amplitud del complejo QRS o del intervalo QTc relacionados con patología cardíaca y arritmia ventricular ²⁰⁸. En nuestras condiciones experimentales, las alteraciones inducidas por la HFD en la funcionalidad cardíaca parecían estar relacionadas principalmente con el grado de hipertrofia cardíaca y se produjeron principalmente a nivel ventricular, lo que resultó en una mayor amplitud del complejo QRS y la onda T, así como en el alargamiento del intervalo QT corregido. La alteración patológica de estos parámetros indica alteraciones en la actividad eléctrica del corazón y, en consecuencia, en la eficiencia del bombeo de sangre. Estos cambios comenzaron a mostrar una tendencia a las 12 semanas y fueron significativos a las 15 semanas. No hemos observado cambios en los parámetros del ECG relacionados con la despolarización y conducción auricular (longitud de onda P, amplitud de onda P o intervalo PR), lo que refuerza la idea de que la obesidad afecta principalmente a la función ventricular. Las modificaciones en el ECG (amplitud del QRS y amplitud de la onda T) se corrigieron después de las intervenciones de pérdida de peso, aunque no se logró ningún efecto adicional al de la restricción calórica con el ejercicio, el bloqueo del receptor CB1 o la combinación de ambas intervenciones. Además, no se encontró ningún efecto significativo del ejercicio en el intervalo QTc de una manera similar a lo que se ha descrito en el modelo de rata Zucker obesa ¹¹⁰.

La mejora en los parámetros de salud cardiovascular lograda por las intervenciones de pérdida de peso y mantenimiento del peso estuvo estrechamente asociada con una capacidad aeróbica significativamente mayor y mejores niveles de marcadores de aptitud física, como la velocidad máxima y la distancia total recorrida durante una prueba incremental. El fármaco AM251 mostró una acción potenciadora muy fuerte de estos parámetros, lo que concuerda con Zhou y Shearman ²⁰⁹, que describieron una acción similar de la administración de AM251 y la actividad física

sobre la pérdida de peso corporal y la capacidad aeróbica. En contraste, Zhou y Kumar ²¹⁰ afirmó que la inhibición de los receptores CB1 podría tener una influencia negativa en la práctica de ejercicio físico. Los beneficios de AM251 se pueden atribuir al papel que desempeñan los receptores CB1 en el metabolismo del músculo esquelético. Se ha descrito que su bloqueo mediante el agonista inverso SR141716 induce una mayor entrada de glucosa del torrente sanguíneo a las células musculares y potencialmente un mayor almacenamiento de energía durante la práctica de ejercicio físico, lo que, a su vez, es consistente con la mejora del AUC de glucosa ²¹¹, que hemos descrito anteriormente.

Otro factor importante a considerar relacionado con la función cardíaca es la funcionalidad vascular. En este sentido, la obesidad, el SM y la falta de actividad física pueden causar disfunción endotelial y envejecimiento vascular precoz ^{212, 213}, por sobreexpresión de moléculas de adhesión vascular asociadas a aterogénesis manifestada antes de necrosis y lesiones coronarias. En nuestro estudio, el aumento de la capacidad aeróbica se asoció con una mejor salud vascular, evaluada por la expresión aórtica de diferentes transcritos relacionados con moléculas de adhesión endotelial (Sele y Vcam) y parámetros de inflamación (Nos, Ptg2, Vegfa) al final del período experimental de 21 semanas. La normalización de la ingesta calórica así como el protocolo de entrenamiento mixto regularon significativamente a la baja su expresión, alcanzando valores incluso inferiores a los del grupo SD, y redujeron el índice aterogénico plasmático, un marcador ampliamente utilizado de dislipidemia, obesidad y enfermedad cardiovascular ^{214, 215}. En conjunto, estos resultados muestran una respuesta muy positiva a nuestras intervenciones de mantenimiento y pérdida de peso a nivel cardiovascular.

5.4 Efecto sobre la función renal

La obesidad también representa un factor de riesgo clave para la enfermedad renal. El consumo de HFD en nuestro estudio provocó un marcado aumento en la tasa de aclaramiento renal, una medida de filtración glomerular. Este aumento se asoció a albuminuria que es un conocido marcador de daño renal. Estos dos marcadores fueron revertidos por las intervenciones de pérdida de peso y mantenimiento de la

restricción calórica y ejercicio físico a valores similares al grupo SD. Se ha descrito que el tratamiento farmacológico con antagonistas específicos del receptor CB1 mejora la estructura y funcionalidad renal en modelos experimentales de enfermedad renal crónica ²¹⁶. Además, un estudio reciente de Udi et al. ²¹⁷ describe la administración de un nuevo antagonista del receptor CB1 / iNOS biodisponible por vía oral, de acción periférica, en un modelo preclínico de enfermedad renal crónica inducida por obesidad. Este inhibidor mejoró los cambios morfológicos y funcionales del riñón inducido por la obesidad mediante la disminución de la inflamación renal, la fibrosis, el estrés oxidativo y la lesión renal. Destaca que algunas de estas características eran independientes del perfil metabólico mejorado inducido por la inhibición de los receptores CB1. Aquí, la administración de AM251 contribuyó en gran medida a la estrategia de pérdida de peso, ayudó a revertir las alteraciones inducidas por la obesidad en el metabolismo de la glucosa y provocó un aumento significativo en la tasa de filtración glomerular y la diuresis. Sin embargo, de forma diferente a lo observado en animales alimentados con HFD, no se correlacionó con la presencia de albuminuria. Jenkin et al. ²¹⁶ han descrito que la administración crónica de AM251 durante 6 semanas con una dosis diaria de 3 mg / kg redujo significativamente el aumento de peso, la presión arterial sistólica, la leptina plasmática, la albuminuria, la creatinina plasmática y el diámetro de la sección transversal tubular en un modelo DIO de ratas Sprague Dawley , mientras que Barutta et al. ²¹⁸ han encontrado que el bloqueo de los receptores CB1 mejora la albuminuria en un modelo experimental de ratones con nefropatía diabética. En nuestras condiciones experimentales, la disminución de la albuminuria también podría deberse a un efecto de dilución asociado con una mayor diuresis en ratas a las que se administró AM251.

El aumento de la tasa de filtración glomerular resultante de la administración de AM251 está de acuerdo con el estudio de Koura et al. ²¹⁹ . Además, Sampaio et al. ²²⁰ han descrito la acción inhibidora de este compuesto en la actividad Na^+ / K^+ -ATPasa de las células tubulares, lo que disminuiría la reabsorción de Na^+ y aumentaría la natriuresis y el volumen urinario. Este mecanismo explicaría nuestros resultados en el grupo de ratas a las que se le administró AM251. Por otro lado, las ratas obesas de nuestro experimento mostraron signos claros relacionados con la activación de la parathormona a las 12 o 15 semanas del período experimental, caracterizados por

un aumento de la fosfaturia y una disminución de la calciuria. La administración de AM251 revirtió estos efectos independientemente de la pérdida de peso después de 3 semanas de tratamiento.

El estudio de la actividad antioxidante en el riñón aportó datos adicionales sobre el efecto de las intervenciones de nuestro estudio. Se sabe que las alteraciones en el estado antioxidante renal inducidas por la obesidad contribuyen al daño renal ²²¹. La DIO resultó en signos claros de estrés oxidativo renal caracterizado por Mn y Cu / Zn-SOD alterados y, en menor grado, actividades de GPX, mientras que los efectos normalizadores de las intervenciones de control de peso solo fueron relevantes en el estado de Cu / Zn-SOD. Se ha demostrado que el bloqueo del receptor CB1 protege contra el daño tubular atenuando el estrés oxidativo renal y la inflamación ²²². En nuestras condiciones experimentales, la administración de AM251 fue eficaz para normalizar el estado de la actividad de Mn-SOD y GPX en la semana 21.

5.5 Efecto sobre el hígado

Un hallazgo interesante de nuestro trabajo de investigación es que la restricción calórica aplicada durante un período de intervención de 3 semanas fue eficaz para revertir no sólo el peso del hígado y la acumulación total de grasa, sino también la mayoría de las alteraciones histológicas hepáticas, específicamente la esteatosis macro y microvesicular, así como el cambio morfológico de los hepatocitos por acumulación de grasa, disminuyendo la posibilidad de desarrollar estatohepatitis no alcohólica (puntuación NAS 1-2). Además, los beneficios de la intervención permanecieron durante el periodo de mantenimiento de la pérdida de peso posterior a la intervención, en el que el índice de puntuación NAS para medir el desarrollo de NAFLD siguió siendo el mismo que el obtenido justo después de la intervención de pérdida de peso, y consistentemente más bajo que el control HFD. La lesión esteatótica inducida por la HFD puede estar fuertemente asociada a la toxicidad de ciertos ácidos grasos. El ácido palmítico ha mostrado una fuerte acción lipotóxica tanto en modelos in vitro de HepG2 o de cultivo de hepatocitos primarios como en la DIO alta en grasas in vivo, causando no sólo la hepatomegalia estándar y alteraciones en la histología hepática, sino también el desarrollo de inflamación,

estrés del retículo endoplásmico y apoptosis ²²³. La dieta hipercalórica utilizada en nuestro estudio para la inducción dietética de la obesidad casi duplicó el porcentaje de ácido palmítico en comparación con su control normocalórico y, por tanto, presentó un mayor potencial lipotóxico. Sin embargo, cuando se compara el perfil de ácidos grasos del hígado, las diferencias entre los grupos normocalóricos e hipercalóricos fueron apenas perceptibles, mientras que los porcentajes de ácido esteárico y oleico se alteraron significativamente. Estos cambios pueden atribuirse a la activación de las vías de la elongasa desaturasa que convierten el ácido palmítico en esteárico, seguido de la desaturación a ácido oleico, como se observa en el marcado aumento de la relación oleico/esteárico paradigmático de la actividad de la Scd1. Dado que el ácido oleico presenta una lipotoxicidad mucho menor ²²³, la activación de su síntesis podría tener una acción protectora sobre la viabilidad hepática, aunque también puede estar asociada a una mayor facilidad de almacenamiento y metabolismo en comparación con los ácidos palmítico o esteárico.

Es muy probable que haya varios mecanismos implicados en los efectos de las diferentes intervenciones sobre el perfil de ácidos grasos hepáticos y que puedan mostrar interesantes sinergias para reforzar la acción global. Por un lado, la restricción calórica puede modificar la expresión hepática de los genes implicados en el metabolismo lipídico para promover la utilización de los lípidos a través de la alteración transcripcional hepática, evitando así la esteatosis hepática ²²⁴. Por otra parte, el protocolo de entrenamiento mixto durante 8 semanas puede ejercer marcados efectos beneficiosos en la alteración de los niveles hepáticos de ácido esteárico, palmítico, oleico y araquidónico a través de la disminución de la Scd-1 y el aumento de las actividades de la 5-elongasa en los animales obesos, tal y como informaron Martínez et al. ²²⁵. En este caso, la combinación de la restricción calórica y el protocolo de entrenamiento mixto tendieron a disminuir la actividad de la Scd-1 y el porcentaje de los ácidos palmítico, oleico y linoleico, mientras que aumentó los de esteárico y araquidónico tanto durante el periodo de pérdida de peso como en el de mantenimiento. Otro hallazgo interesante es el efecto de las intervenciones en la recuperación e incremento de los niveles de DHA, dado que este ácido graso es el precursor de diferentes mediadores que contrarrestan el estado inflamatorio persistente que suele asociarse al desarrollo de la obesidad ²²⁶.

Los conocimientos sobre el efecto de los bloqueadores de los receptores CB1 en el perfil de ácidos grasos del hígado y en la expresión génica de las enzimas lipogénicas/lipolíticas son escasos. Anteriormente, detectamos que la administración diaria de AM251 a una dosis de 3 mg/kg durante un periodo de 21 días disminuía la hepatomegalia, la esteatosis y los niveles plasmáticos de transaminasas, bilirrubina, colesterol total y LDL en ratas Zucker obesas ¹⁹⁴. En el presente estudio, su fuerte acción sobre las actividades de la oleoyl-CoA y de la Δ elongasa/desaturasa, que condujo a cambios significativos en los ácidos grasos mono y poliinsaturados, pareció de especial relevancia. La influencia del sistema endocannabinoide en la vía de la lipogénesis ha sido señalada por diferentes autores ^{227, 228}, que destacaron que la activación endocannabinoide del receptor CB1 inducía intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática y nuevos genes sensibles al CB1. Por el contrario, se ha demostrado que el bloqueo del receptor CB1 provoca una acción inhibitoria de la lipogénesis por parte del hepatocito y del tejido adiposo periférico ^{229, 230}. Además, Vida et al ²³⁰ describieron una inhibición significativa de la expresión de SREBP1c y CHREBP en animales alimentados con una HFD, así como una señalización significativa mediada por CB1 de los genes lipogénicos que fueron regulados a la baja en ratas normocalóricas pero no alimentadas con HFD tras la administración de AM251. Por otra parte, Chen et al. ²³¹ han identificado recientemente los principales cambios proteómicos en el hígado de ratones alimentados con una HFD tras la administración diaria de AM251 durante 7 días a una dosis de 5 mg/kg. Los autores describieron alteraciones en la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa, los lípidos y los xenobióticos, así como en el proceso mitocondrial de síntesis de ATP, y concluyeron que el bloqueo del receptor CB1 puede contribuir a la mejora de la función mitocondrial en la esteatosis hepática. En nuestro experimento, el bloqueo del CB1 contribuyó a la normalización del contenido lipídico hepático y el metabolismo a través de la normalización en la expresión de las enzimas lipogénicas y la significativa regulación al alza de los transcritos lipolíticos. En este sentido, la asociación del ejercicio físico y la administración de AM251 fue especialmente eficaz, en concreto sobre la expresión de Cyp7a1, una enzima implicada en la formación de ácidos

biliares que alcanzó un aumento de 12 veces, o el aumento de 6 veces en la expresión de Ucp2 a las 21 semanas.

Por otra parte, hemos estudiado la actividad antioxidante en el hígado, ya que los modelos de obesidad inducida por dieta se han asociado habitualmente a un aumento de la peroxidación lipídica hepática, a una disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes y a un compromiso del estado de estrés oxidativo ²³², ²³³. En nuestras condiciones experimentales actuales, la obesidad provocó una disminución general de la expresión del factor de transcripción nuclear Nrf2 y de la actividad de las enzimas antioxidantes, especialmente Cu/Zn-SOD, CAT y GPX, con un aumento concomitante del marcador de peroxidación lipídica TBARs. Se ha descrito²³⁴ que la expresión génica y proteica de Nrf2, catalasa, SOD, GPX y GR mejoran significativamente con la intervención de restricción calórica en el modelo de NAFLD en el ratón inducido por HFD.

En nuestro estudio las intervenciones combinadas consiguieron contrarrestar de forma diferencial las alteraciones de la actividad antioxidante hepática relacionadas con la obesidad, aunque cabe destacar varias interacciones en función del periodo experimental (12, 15 o 21 semanas). Entre las más llamativas, encontramos la interacción ejercicio-AM251 sobre la actividad Mn-SOD o catalasa. Lo cual refuerza los efectos positivos de nuestras intervenciones observadas en otros parámetros hepáticos mencionados.

6. CONCLUSIONES

1. El modelo experimental de obesidad inducida por la dieta logró establecer la obesidad desde la semana cinco además de alteraciones cardiovasculares, renales, hepáticas y metabólicas.
2. El peso corporal se redujo en 6.5% en los animales por efecto de la restricción calórica. El efecto se reforzó en un 7% por el ejercicio físico. La administración del fármaco en ausencia de actividad consiguió reducir un 14 % el peso corporal. El mejor resultado en cuanto a pérdida de peso se obtuvo con la combinación de restricción calórica, ejercicio físico y administración de AM251 dando con un descenso del 17% sobre el peso.
3. El mantenimiento del peso perdido se consiguió de forma eficaz cuando se combinó el control de la ingesta calórica y el programa de ejercicio mixto diseñado. El resultado se potenció por la administración del inhibidor de la ingesta AM251 a dosis de 3mg/kg peso/ con pauta de 1 vez por semana.
4. La inducción de la obesidad después del consumo de HFD durante 12 semanas resultó en la instauración de resistencia a la insulina, como lo demuestra el AUC más alto después de una sobrecarga de glucosa oral en comparación con los grupos de SD. La situación se revirtió con la intervención de ejercicio físico asociado a la administración de AM251.
5. La HFD provocó una hipertrofia principalmente ventricular, valorable por una mayor amplitud del complejo QRS y onda T, así como un alargamiento del complejo QT. Por otra parte la restricción calórica logró revertir las modificaciones electrocardiográficas resultantes del aporte de HFD.
6. Se obtuvo una mejora en los parámetros de la salud cardiovascular lograda por las intervenciones de pérdida de peso y el mantenimiento del peso asociada estrechamente con una capacidad aeróbica significativamente mayor y con marcadores de aptitud física.

7. El aumento de la capacidad aeróbica consiguió una mejora en la función vascular, determinada por la expresión génica de los transcritos relacionados con moléculas de adhesión endotelial (Sele y Vcam) y de parámetros de inflamación (Nos2, Ptg2, Vegfa) al final del periodo experimental a las 21 semanas.
8. El consumo de HFD provocó un marcado aumento en la tasa de aclaramiento renal y albuminuria. Ambos marcadores fueron revertidos por las intervenciones de restricción calórica y ejercicio físico. La administración de AM251 mejoró los cambios de la función renal inducidos por la obesidad y fue especialmente eficaz para normalizar el estado de la actividad antioxidante Mn-SOD y GPX en la semana 21.
9. La instauración de la obesidad se asoció a esteatosis hepática, aumento del peso del hígado y el porcentaje en grasa así como la disminución del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. Las tres intervenciones ensayadas consiguieron revertir la esteatosis hepática tras la pérdida de peso y mantuvieron este efecto beneficioso sobre la funcionalidad hepática en el periodo de mantenimiento del peso perdido.
10. El estudio de la expresión génica de las enzimas relacionadas con los mecanismos de lipogénesis y lipólisis en el hígado mostró que el consumo de dieta hipergrasa disminuyó la expresión de enzimas lipogénicas. Estas alteraciones en la expresión génica se vieron revertidas con las intervenciones de control de peso ensayados.

En conclusión, las estrategias de intervención de pérdida de peso y mantenimiento probadas fueron eficaces para revertir las alteraciones relacionadas con la obesidad en el peso corporal, la capacidad aeróbica, el metabolismo de la glucosa, la función cardiovascular, renal y hepática. Las acciones más beneficiosas resultaron de la restricción calórica y el ejercicio físico, mientras que la administración de AM251 ejerció un efecto complementario. La implementación de las estrategias propuestas de control de peso en sujetos con sobrepeso u obesidad pueden evitar los efectos

rebote postratamiento y son medidas muy efectivas para revertir las alteraciones metabólicas, hepáticas, cardiovasculares y renales desarrolladas en paralelo al desequilibrio calórico, el sedentarismo y la obesidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Huang, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* **2**, 231–237 (2009).
2. Thang, S. H. & Mike, E. L. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc. Dis.* **5**, 204800401663337 (2016).
3. Boguszewski, C., Paz-Filho, G. & Velloso, L. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. *Endokrynologia Polska.* **61**(2), 194-206 (2010).
4. Yumuk, V., Tsigos, C.. & Fried, M. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes. Facts* **8**, 402–424 (2015).
5. Camacho, S. & Ruppel, A. Is the calorie concept a real solution to the obesity epidemic? *Glob. Health Action* **10**(1) 1289650 (2017).
6. Golbidi, S., Badran, M. & Laher, I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 941868 (2012).
7. Koch, M. *et al.* Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nat.* 2015 5197541 **519**, 45–50 (2015).
8. Cristoforo Silvestri, C. & Di Marzo, V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* **17**, 475–490 (2013).
9. Quarta, C. *et al.* CB1 Signaling in Forebrain and Sympathetic Neurons Is a Key Determinant of Endocannabinoid Actions on Energy Balance. *Cell Metab.* **11**, 273–285 (2010).
10. Cristino, L., Bisogno, T. & Vincenzo Di Marzo, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 9–29 (2020).
11. OMS | 10 datos sobre la obesidad. *WHO* (2017). <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>.

12. Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N. & Lázaro-Masedo, S. Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25–64 Years) 2014–2015: The ENPE Study. *Rev. Española Cardiol. English Ed.* **69**, 579–587 (2016).
13. Malo-Serrano, M., Castillo, N. M., Pajita, D. D. & Miguel Malo-Serrano, C. La obesidad en el mundo. *An Fac med.* **78**, 173–178 (2017).
14. OMS | Obesidad. *WHO* (2016). https://www.who.int/es/health-topics/obesity#tab=tab_1
15. Robertson, A., Lobstein, T. & Knai, C. *Obesity and socio-economic groups in Europe: Evidence review and implications for action.* (2007). https://www.researchgate.net/publication/238730926_Obesity_and_socio-economic_groups_in_Europe_Evidence_review_and_implications_for_action/link/00b7d5281180a463f9000000/download
16. Ortiz-Moncada, R. *et al.* Social determinants of overweight and obesity in Spain 2006. 2655. *Med.Clin* 2655 (Barc.) (2011).
17. Sánchez-Cruz, J.-J., Jiménez-Moleón, J. J., Fernández-Quesada, F. & Sánchez, M. J. Prevalence of Child and Youth Obesity in Spain in 2012. *Rev. Española Cardiol. (English Ed.* **66**, 371–376 (2013).
18. Petrakis, D. *et al.* Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. doi:10.3390/ijerph14101282.
19. Kumar, S. & Kelly, A. S. Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* **92**, 251–265 (2017).
20. Thaker, V. V. GENETIC AND EPIGENETIC CAUSES OF OBESITY. *Adolesc. Med. State Art Rev.* **28**, 379 (2017).
21. Loos, R. J. F. & Janssens, A. C. J. W. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. *Cell Metab.* **25**, 535–543 (2017).
22. Mozaffarian, D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. *Circulation* **133**, 187–225

- (2016).
23. Nicolaidis, S. Environment and obesity. *Metabolism*. **100**, 153942 (2019).
 24. Muscogiuri, G., Secinaro, A., Ciliberti, P., Fuqua, M. & Nutting, A. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the management of adult congenital heart disease. *J. Thorac. Imaging* **32**, 233–244 (2017).
 25. Dinsa, G. D., Goryakin, Y., Fumagalli, Y. E. & M Suhrcke, M. Obesity and socioeconomic status in developing countries: a systematic review. *Obes. Rev.* **13**, 1067–1079 (2012).
 26. Cryan, J. F. & Dinan, T. G. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 13 701–712 (2012).
 27. Hewagalamulage, S. D., Lee, T. K., Clarke, I. J. & Henry, B. A. Stress, cortisol, and obesity: a role for cortisol responsiveness in identifying individuals prone to obesity. *Domestic Animal Endocrinology* vol. 56 S112–S120 (2016).
 28. Castro, A. V. B., Kolka, C. M., Kim, S. P. & Bergman, R. N. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **58**, 600–609 (2014).
 29. Coelho, M., Oliveira, T. & Fernandes, R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Archives of Medical Science* vol. 9 191–200 (2013).
 30. Waki, H. & Tontonoz, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annual Review of Pathology* vol. 2 31–56 (2007).
 31. Costa, J. V & Duarte, J. S. Adipose tissue and adipokines. *Acta Med. Port.* **19**, 251–6 (2004).
 32. Grant, R. W. & Dixit, V. D. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity* **23**, 512–518 (2015).
 33. Waki, H. & Tontonoz, P. Endocrine Functions of Adipose Tissue. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2**, 31–56 (2007).
 34. Coll, M. Y., Ruíz, M. J., Navarro, J. J., de la Cruz, A.L., Valladares, C.F. Factors

- Related to In-Hospital Mortality Caused by Acute Myocardial Infarction. *Rev. Enfermedades no Transm. Finlay* **2**, 128–136 (2012).
35. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* vol. **106** 171–176 (2000).
 36. Lyon, C. J., Law, R. E. & Hsueh, W. A. Minireview: Adiposity, inflammation, and atherogenesis. in *Endocrinology* vol. 144 2195–2200 (2003).
 37. Saely, C. H., Geiger, K. & Drexel, H. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology* vol. 58 15–23 (2011).
 38. Aguilera-Méndez, A. *Artículos de revisión Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente Nonalcoholic hepatic steatosis: a silent disease. Rev Med Inst Mex Seguro Soc* vol. 56 (2018).
 39. Rinella, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* **313**, 2263–2273 (2015).
 40. Coll-Risco, I. *et al.* Effects of interval aerobic training combined with strength exercise on body composition, glycaemic and lipid profile and aerobic capacity of obese rats. *J. Sports Sci.* **34**, 1452–60 (2016).
 41. Diehl, A. M. & Day, C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2063–2072 (2017).
 42. Heymsfield, S. B. & Wadden, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N. Engl. J. Med.* **376**, 254–266 (2017).
 43. Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., Sanyal, A. J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **24**, 908–922 (2018).
 44. Elena Buzzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* **65**, 1038–1048 (2016).
 45. Suzuki, A. & Diehl, A. M. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Annu. Rev. Med.* **68**, 85–98 (2017).

46. Varela-Rey, M. *et al.* Fatty liver and fibrosis in glycine N-methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide. *Hepatology* **52**, 105–114 (2010).
47. Masuoka, H. C. & Chalasani, N. Nonalcoholic fatty liver disease: An emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1281**, 106–122 (2013).
48. Kawamura, Y. *et al.* Large-scale long-term follow-up study of Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease for the onset of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 253–261 (2012).
49. Yilmaz, Y. NAFLD in the absence of metabolic syndrome: Different epidemiology, pathogenetic mechanisms, risk factors for disease progression? *Seminars in Liver Disease.* **32**, 14–21 (2012).
50. Sari, C. I. *et al.* Android fat deposition and its association with cardiovascular risk factors in overweight young males. *Front. Physiol.* **10**, 1162 (2019).
51. Tomsa, A. *et al.* Endothelial function in youth: a biomarker modulated by adiposity-related insulin resistance. *J. Pediatr.* **178**, 171–177 (2016).
52. Borghi, C. *et al.* Expert consensus for the diagnosis and treatment of patient with hyperuricemia and high cardiovascular risk. *Cardiol. J.* **25**, 545–564 (2018).
53. Kachur, S., Lavie, C. J., De Schutter, A., Milani, R. V. & Ventura, H. O. Obesity and cardiovascular diseases. *Minerva Medica* vol. **108**, 212–228 (2017).
54. Tune, J. D., Goodwill, A. G., Sassoon, D. J. & Mather, K. J. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl. Res.* **183**, 57–70 (2017).
55. Ritchie, S. A. & Connell, J. M. C. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **17**, 319–326 (2007).
56. Hutley, L. & Prins, J. B. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **330**, 280–289 (2005).
57. Johnson, A. R., Milner, J. J. & Makowski, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev.* **249**,

- 218–238 (2012).
58. Wieser, V., Moschen, A. R. & Tilg, H. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **61**, 119–125 (2013).
 59. Oh, Y. S., Lee, Y. J., Park, E. Y. & Jun, H. S. Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **27**, 813–819 (2011).
 60. Izaola, O., Luis, D. de, Sajoux, I., Domingo, J. C. & Vidal, M. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr. Hosp.* **31**, 2352–2358 (2015).
 61. Turkbey, E. B. *et al.* The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *JACC. Cardiovasc. Imaging* **3**, 266–274 (2010).
 62. Ahlqvist, E. *et al.* Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 361–369 (2018).
 63. Kostapanos, M. S., Florentin, M., Elisaf, M. S. & Mikhailidis, D. P. Hemostatic factors and the metabolic syndrome. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **11**, 880–905 (2013).
 64. Hintistan, S., Cilingir, D. & Pekmezci, H. Assessment of death anxiety among medical and surgery clinics patients of a teaching hospital. *J. Pak. Med. Assoc.* **66**, 823–8 (2016).
 65. Tabas, I., Williams, K. J., & Borén, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–1844 (2007).
 66. Berg, A. H. & Scherer, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **96**, 939–949 (2005).
 67. León-Pedroza, J. I. *et al.* Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cir. Cir.* **83**, 543–551 (2015).

68. Grundy, S. M. Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 635–643 (2012).
69. Egocheaga, M. I. *et al.* Awareness and implementation in daily practice of the S.E.N.-semFYC consensus document on chronic kidney disease. *Nefrologia*. **32**, 797-808 (2012).
70. Castela, A. M. *et al.* Consensus document for the detection and management of chronic kidney disease. *Nefrologia* **34**, 243–262 (2014).
71. Matsushita, K. *et al.* Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* **375**, 2073–2081 (2010).
72. Kovesdy, C. P., Furth, S. & Zoccali, C. Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic. *Nefrologia* **37**, 360–369 (2017).
73. Kumar, S. *et al.* Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 1645–1656 (2008).
74. Zhang, C. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition in podocytes mediated by activation of NADPH oxidase in hyperhomocysteinemia. *Pflugers Arch.* **462**, 455-67 (2011).
75. Lehr, S., Hartwig, S. & Sell, H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics. Clin. Appl.* **6**, 91–101 (2012).
76. Sharma, K. The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction. *Kidney Int.* **76**, 145–148 (2009).
77. Kovesdy, C. P., Furth, S. & Zoccali, C. Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic. *Nefrologia* **37**, 360–369 (2017).
78. Lee, M. P., Orlov, D. & Sweeney, S. Leptin induces rat glomerular mesangial cell hypertrophy, but does not regulate hyperplasia or apoptosis. *Int. J. Obes. (Lond)*. **29**, 1395–1401 (2005).
79. Fukuda, A. *et al.* Growth-Dependent Podocyte Failure Causes Glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1351 (2012).

80. Tao, S. *et al.* Effect of cooling heat-stressed dairy cows during the dry period on insulin response. *J. Dairy Sci.* **95**, 5035–5046 (2012).
81. Sung, K.-C. & Kim, S. H. Interrelationship between Fatty Liver and Insulin Resistance in the Development of Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1093–1097 (2011).
82. Hayashi, K. *et al.* Effects of insulin on rat renal microvessels: Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Kidney Int.* **51**, 1507–1513 (1997).
83. Alejandro R Chade, A. R. & Hall, J. E. Role of the Renal Microcirculation in Progression of Chronic Kidney Injury in Obesity. *Am. J. Nephrol.* **44**, 354–367 (2016).
84. Yang, S. H. *et al.* Triglyceride to High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio and Cardiovascular Events in Diabetics With Coronary Artery Disease. *Am. J. Med. Sci.* **354**, 117–124 (2017).
85. Alberti, K. G. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
86. Briones, A. M. *et al.* Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **59**, 1069–1078 (2012).
87. Bonomini, F., Rodella, L. F. & Rezzani, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* **6**, 109–120 (2015).
88. Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145–1159 (2012).
89. Eirin, A., Lerman, A. & Lerman, L. O. The Emerging Role of Mitochondrial Targeting in Kidney Disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* **240**, 229 (2017).

90. Balistreri, C. R., Caruso, C. & Candore, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* vol. **2010**, 802078 (2010).
91. Silvariño, R., Gadola, L. & Ríos, P. Obesidad y Enfermedad Renal Crónica. *Rev. Uruguay Med. Interna* **2**, 3–23 (2017).
92. Silva, R. S. da, Pereira, Á., Nóbrega, M. M. L. da & Mussi, F. C. Construction and validation of nursing diagnoses for people in palliative care. *Rev. Lat. Am. Enfermagem* **25**, e2914 (2017).
93. Carretero Gómez, J. & Arévalo Lorido, J. C. Clinical assessment and treatment of diabetes in patients with chronic kidney disease. *Revista Clinica Espanola* vol. **218** 305–315 (2018).
94. Park, F., Potukuchi, P. K., Moradi, H. & Kovesdy, C. P. Cannabinoids and the kidney: Effects in health and disease. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* vol. **313** F1124–F1132 (2017).
95. Levander, O. A. A Global View of Human Selenium Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **7**, 227–250 (1987).
96. Montesa, M. J. P. *et al.* Estudio del estrés oxidativo en enfermedad renal avanzada. *Nefrologia* **29**, 464–473 (2009).
97. Viada Pupo, E., Gómez Robles, L. & Reyna Campaña Marrero, I. CORREO CIENTÍFICO MÉDICO DE HOLGUÍN Estrés oxidativo Oxidative Stress. *Correo Científico Médico de Holguín* **21**, 171–186 (2017).
98. Yung, L., Leung, F., Yao, X., Chen, Z.-Y. & Huang, Y. Reactive Oxygen Species in Vascular Wall. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets* **6**, 1–19 (2012).
99. Hicks, J. J., Juan Hicks, Y. J. & T, Y. D. *Estrés oxidante. Concepto y clasificación.* *Revista de Endocrinología y Nutrición.* **14** (2006).
100. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 44–84 (2007).
101. Hadizadeh, F., Faghihmani, E. & Adibi, P. Nonalcoholic fatty liver disease:

- Diagnostic biomarkers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **8**, 11 (2017).
102. Long, M. T., Gandhi, S. & Loomba, R. Advances in non-invasive biomarkers for the diagnosis and monitoring of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* vol. **111**, 154259 (2020).
 103. Neuman, M. G., Cohen, L. B. & Nanau, R. M. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* vol. **28** 607–618 (2014).
 104. Yoon, J. L *et al.* Diagnostic performance of body mass index using the Western Pacific Regional Office of World Health Organization reference standards for body fat percentage. *J Korean Med Sci.* **30**, 162-6 (2015).
 105. Okorodudu, D. O. *et al.* Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes. (Lond).* **34**, 791–799 (2010).
 106. Fernández, D. O. Germán Cossio *et al.* (eds.), Prácticas culturales, discursos y poder en América Latina. *Hist. y Soc.* **0**, 201–205 (2010).
 107. Resende, N. M. *et al.* The effects of coconut oil supplementation on the body composition and lipid profile of rats submitted to physical exercise. *An. Acad. Bras. Cienc.* **88**, 933–940 (2016).
 108. Kosmala, W., Przewlocka-Kosmala, M., Wojnalowicz, A., Mysiak, A. & Marwick, T. H. Integrated backscatter as a fibrosis marker in the metabolic syndrome: association with biochemical evidence of fibrosis and left ventricular dysfunction. *Eur. J. Echocardiogr.* **13**, 459–467 (2012).
 109. Oner, E. *et al.* Fragmented QRS complexes are associated with left ventricular systolic and diastolic dysfunctions in patients with metabolic syndrome. *Cardiol. J.* **22**, 691–698 (2015).
 110. VanHoose, L. *et al.* Electrocardiographic changes with the onset of diabetes and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**, (2010).
 111. VanHoose, L. *et al.* Electrocardiographic changes with the onset of diabetes

- and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**, (2010).
112. Delhey, L., Jin, J., Thapa, S., Delongchamp, R. & Faramawi, M. F. The association of metabolic syndrome and QRS|T angle in US adults (NHANES III). *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* **25**, (2020).
 113. Espinola-Klein, C. *et al.* Inflammation, atherosclerotic burden and cardiovascular prognosis. *Atherosclerosis* **195**, e126–e134 (2007).
 114. Provan, D. *et al.* Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* **3**, 3780 (2019).
 115. Lima, S, L. *et al.* The Error of Estimated GFR in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Med.* **8**, 1543 (2019).
 116. Chen, S. Retooling the creatinine clearance equation to estimate kinetic GFR when the plasma creatinine is changing acutely. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 877–888 (2013).
 117. Soriano S. H. L. Procedimiento diagnóstico y valoración del enfermo con insuficiencia renal crónica. *Nefrología Clínica.* **34**, 801–804 (2009).
 118. Wada, T. *et al.* Clinical impact of albuminuria and glomerular filtration rate on renal and cardiovascular events, and all-cause mortality in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin. Exp. Nephrol.* **18**, 613–620 (2014).
 119. Souweine, J. S. *et al.* Interest of albuminuria in nephrology, diabetology and as a marker of cardiovascular risk. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* **77**, 26–35 (2019).
 120. Berhane, A. M., Weil, E. J., Knowler, W. C., Nelson, R. G. & Hanson, R. L. Albuminuria and estimated glomerular filtration rate as predictors of diabetic end-stage renal disease and death. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 2444–2451 (2011).
 121. Schaefer, F. & Bakkaloglu, S. A. Diseases of the Kidney and Urinary Tract in Children. *Brenner and Rector's the Kidney.* **75**, 2622–79 (2012).
 122. Newman, C, L. *et al.* Cortical bone mechanical properties are altered in an

- animal model of progressive chronic kidney disease. *PLoS One* **9**, (2014).
123. Analisis de orina y de los líquidos corporales / Urinalysis and body fluids - Susan King Strasinger, Marjorie Schaub Di Lorenzo - Google Libros. <https://books.google.es/books?id=uJmKmvIUdoC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.
 124. Xu, L. H. R. *et al.* Temporal Changes in Kidney Stone Composition and in Risk Factors Predisposing to Stone Formation. *J. Urol.* **197**, 1465–1471 (2017).
 125. Frassetto, L. & Kohlstadt, I. Treatment and prevention of kidney stones: an update. *Am. Fam. Physician* **84**, 1234–1242 (2011).
 126. Grundy, S. M. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. *J. Investig. Med.* **64**, 1082–1086 (2016).
 127. Zhang, X. & Lerman, L. O. The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Transl. Res.* **183**, 14–25 (2017).
 128. Gierach, M. *et al.* Correlation between Body Mass Index and Waist Circumference in Patients with Metabolic Syndrome. *ISRN Endocrinol.* **2014**, 1–6 (2014).
 129. Swinburn, B. A. *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet (London, England)* **378**, 804–814 (2011).
 130. Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamundi, S. & Mehta, J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **11**, 215–225 (2017).
 131. Grundy, S. M. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 629–636 (2008).
 132. Huertas, J. R., Lara, A. R., Acevedo, O. G. & Mesa, M. D. Milk and dairy products as vehicle for calcium and vitamin d: Role of calcium enriched milks. *Nutr. Hosp.* **36**, 962–973 (2019).
 133. Strychar, I. Diet in the management of weight loss. *CMAJ* vol. **174** 56–63 (2006).

134. Piatti, P. M. *et al.* Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: Comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. *Metabolism* **43**, 1481–1487 (1994).
135. Wycherley, T. P. *et al.* A high-protein diet with resistance exercise training improves weight loss and body composition in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **33**, 969–976 (2010).
136. Martinez, R. *et al.* Aerobic interval exercise improves renal functionality and affects mineral metabolism in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **316**, F90–F100 (2019).
137. Haram, P. M. *et al.* Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc. Res.* **81**, 723–732 (2009).
138. Chung, J., Kim, K., Hong, J. & Kong, H.-J. Effects of prolonged exercise versus multiple short exercise sessions on risk for metabolic syndrome and the atherogenic index in middle-aged obese women: a randomised controlled trial. *BMC Womens. Health* **17**, (2017).
139. Roca-Rivada, A. *et al.* Muscle tissue as an endocrine organ: comparative secretome profiling of slow-oxidative and fast-glycolytic rat muscle explants and its variation with exercise. *J. Proteomics* **75**, 5414–5425 (2012).
140. Henningsen, J., Rigbolt, K. T. G., Blagoev, B., Pedersen, B. K. & Kratchmarova, I. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 2482–2496 (2010).
141. Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N. A. & Lucia, A. Exercise is the real polypill. *Physiology* **28**, 330–358 (2013).
142. Hittel, D. S. *et al.* Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**, 2023–2029 (2010).
143. Quinn, L. S. & Anderson, B. G. Interleukin-15, IL-15 Receptor-Alpha, and Obesity: Concordance of Laboratory Animal and Human Genetic Studies. *J. Obes.* **2011**, (2011).

144. Ryan, D. H. & Yockey, S. R. Weight Loss and Improvement in Comorbidity: Differences at 5%, 10%, 15%, and Over. *Curr. Obes. Rep.* **6**, 187 (2017).
145. Pilitsi, E. *et al.* Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. *Metabolism.* **92**, 170–192 (2019).
146. Narayanaswami, V. & Dwoskin, L, P. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol. Ther.* **170**, 116–147 (2017).
147. Rubio Herrera, M. A., Fernández-García, J. M., Corio Andújar, R., Santos Altozano, C. & Urieta Carpi, J. J. Tratamiento farmacológico de la obesidad para médicos de Atención Primaria. *Med. Fam. Semer.* **45**, 559–565 (2019).
148. Clarke, Z. Sibutramine. *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* 1–5 (2020).
149. Mead, E. *et al.* Drug interventions for the treatment of obesity in children and adolescents. *Cochrane database Syst. Rev.* **11**, (2016).
150. Hua, T. *et al.* Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB 1. *Cell* **167**, 750-762.e14 (2016).
151. Crunkhorn, S. Drug design: Cannabinoid receptor structure revealed. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 822 (2016).
152. Hua, T. *et al.* Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB 1. *Nature* **547**, 468–471 (2017).
153. Gadde, K. G., Martin, C. K., Berthoud, H. R. & Heymsfield, S. B. Obesity: Pathophysiology and Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 69–84 (2018).
154. Khera, R. *et al.* Association of pharmacological treatments for obesity with weight loss and adverse events a systematic review and meta-analysis. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, 2424–2434 (2016).
155. Onakpoya, I. J., Lee, J. J., Mahtani, K, R., Aronson, J. K. & Heneghan, C, J. Naltrexone-bupropion (Mysimba) in management of obesity: A systematic review and meta-analysis of unpublished clinical study reports. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **86**, 646–667 (2020).
156. Johnson, D. B. & Quick, J. Topiramate And Phentermine. 29489234 (2021).

157. Cohen, J. B. & Gadde, K. M. Weight Loss Medications in the Treatment of Obesity and Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **21**, (2019).
158. Guo, W., Tian, W., Lin, L. & Xu, X. Liraglutide or insulin glargine treatments improves hepatic fat in obese patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease in twenty-six weeks: A randomized placebo-controlled trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **170**, (2020).
159. Garvey, W. T. *et al.* Efficacy and Safety of Liraglutide 3.0 mg in Individuals With Overweight or Obesity and Type 2 Diabetes Treated With Basal Insulin: The SCALE Insulin Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care* **43**, 1085–1093 (2020).
160. Lopez-Jimenez, F., Bhatia, S., Collazo-Clavell, M. L., Sarr, M. G. & Somers, V. K. Safety and Efficacy of Bariatric Surgery in Patients With Coronary Artery Disease. *Mayo Clin. Proc.* **80**, 1157–1162 (2005).
161. Carson, J. L. *et al.* The Effect of Gastric Bypass Surgery on Hypertension in Morbidly Obese Patients. *Arch. Intern. Med.* **154**, 193–200 (1994).
162. Batsis, J. A. *et al.* Effect of bariatric surgery on the metabolic syndrome: a population-based, long-term controlled study. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 897–906 (2008).
163. Bloomberg, R. D., Fleishman, A., Nalle, J. E., Herron, D. M. & Kini, S. Nutritional Deficiencies following Bariatric Surgery: What Have We Learned? *Obes. Surg.* **2005 152** **15**, 145–154 (2005).
164. Mathus-Vliegen, E. M. H. & Tytgat, G. N. J. Intra-gastric balloon for treatment-resistant obesity: safety, tolerance, and efficacy of 1-year balloon treatment followed by a 1-year balloon-free follow-up. *Gastrointest. Endosc.* **61**, 19–27 (2005).
165. Alfalah, H. *et al.* Intra-gastric balloon for preoperative weight reduction in candidates for laparoscopic gastric bypass with massive obesity. *Obes. Surg.* **16**, 147–150 (2006).
166. Dornas, W. C. & Silva, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* **36**, 731–737 (2011).

167. Burcelin, R, *et al.* Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, (2002).
168. Kanuri, G. *et al.* Role of tumor necrosis factor α (TNF α) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 527–534 (2011).
169. Tappy, L. *et al.* Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* **26**, 1044–1049 (2010).
170. Kanuri, G. & Bergheim, I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11963–11980 (2013).
171. Ackerman, Z. *et al.* Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **45**, 1012–1018 (2005).
172. Charlton, M. *et al.* Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **301**, (2011).
173. Inui, A. Transgenic study of energy homeostasis equation: implications and confounding influences. *FASEB J.* **14**, 2158–2170 (2000).
174. Eagleson, K. L., Fairfull, L. D., Salton, S. R. J. & Levitt, P. Regional Differences in Neurotrophin Availability Regulate Selective Expression of VGF in the Developing Limbic Cortex. *J. Neurosci.* **21**, 9315–9324 (2001).
175. Rankinen, T. *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. **14**, 529–644 (2006).
176. Justo, M. L. *et al.* Water-soluble rice bran enzymatic extract attenuates dyslipidemia, hypertension and insulin resistance in obese Zucker rats. *Eur J Nutr.* **52**, 789-97 (2013)
177. Galisteo, E, D. *et al.* Exercise Decreases Lipogenic Gene Expression in Adipose Tissue and Alters Adipocyte Cellularity during Weight Regain After Weight Loss. *Front. Physiol.* **7**, (2016).
178. Elfhag, K. & Rössner, S. Who succeeds in maintaining weight loss? A

- conceptual review of factors associated with weight loss maintenance and weight regain. *Obes. Rev.* **6**, 67–85 (2005).
179. Coll-Risco, I. *et al.* Effects of interval aerobic training combined with strength exercise on body composition, glycaemic and lipid profile and aerobic capacity of obese rats. *J. Sports Sci.* **34**, 1452–1460 (2016).
 180. Martínez, R. *et al.* Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food Funct.* **9**, 830–850 (2018).
 181. Martinez, R. *et al.* A combined healthy strategy for successful weight loss, weight maintenance and improvement of hepatic lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **85**, (2020).
 182. Prieto, P, G. *et al.* Plasma D-Glucose, D-Fructose and Insulin Responses after Oral Administration of D-Glucose, D-Fructose and Sucrose to Normal Rats. *J Am Coll Nutr.* **23**(5):414-9. (2004)
 183. Kapravelou, G. *et al.* Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 1207–1216 (2015).
 184. Lepage, G. & Roy, C, C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**, 114–120 (1986).
 185. González-Torres, L. *et al.* Glucomannan- and glucomannan plus spirulina-enriched pork affect liver fatty acid profile, LDL receptor expression and antioxidant status in Zucker fa/fa rats fed atherogenic diets. *Food Nutr. Res.* **61**, (2017).
 186. Von Diemen, V., Trindade, E. N., Roberto, M. & Trindade, M. Experimental model to induce obesity in rats 1 Modelo experimental para induzir obesidade em ratos. *Acta Cirúrgica Bras.* **21**, 2006–425.
 187. Novelli, E, L. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* **41**, 111–119 (2007).
 188. Lee, Y. H. *et al.* Augmented Insulin and Leptin Resistance of High Fat Diet-Fed

- APPswe/PS1dE9 Transgenic Mice Exacerbate Obesity and Glycemic Dysregulation. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
189. Frederich, R. C. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* **1995 112 1**, 1311–1314 (1995).
190. Shawky, N. M. & Segar, L. Sulforaphane improves leptin responsiveness in high-fat high-sucrose diet-fed obese mice. *Eur. J. Pharmacol.* **835**, 108 (2018).
191. Shin, A, C. *et al.* Responsiveness of hypothalamo-pituitary-adrenal axis to leptin is impaired in diet-induced obese rats. *Nutr. Diabetes* **9**, 10–10 (2019).
192. Tam, J. *et al.* Peripheral cannabinoid-1 receptor blockade restores hypothalamic leptin signaling. *Mol. Metab.* **6**, 1113–1125 (2017).
193. Zizzari, P. *et al.* CB1 and GLP-1 Receptors Cross Talk Provides New Therapies for Obesity. *Diabetes* **70**, 415–422 (2021).
194. Merroun, I. *et al.* Novel effects of the cannabinoid inverse agonist AM 251 on parameters related to metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Metabolism.* **62**, 1641–1650 (2013).
195. Chambers, A, P., Koopmans, H, S., Pittman, Q, J. & Sharkey, K, A. AM 251 produces sustained reductions in food intake and body weight that are resistant to tolerance and conditioned taste aversion. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 109–116 (2006).
196. Crespo, I., Gómez de Heras, R., Rodríguez de Fonseca, F. & Navarro, M. Pretreatment with subeffective doses of Rimonabant attenuates orexigenic actions of orexin A-hypocretin 1. *Neuropharmacology* **54**, 219–225 (2008).
197. Morello, G. *et al.* Orexin-A represses satiety-inducing POMC neurons and contributes to obesity via stimulation of endocannabinoid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4759–4764 (2016).
198. Di Marzo. *et al.* Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **410**, 822–825 (2001).
199. Garyfallia, K. *et al.* The Combined Intervention with Germinated *Vigna radiata*

- and Aerobic Interval Training Protocol Is an Effective Strategy for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Other Alterations Related to the Metabolic Syndrome in Zucker Rats. *Nutrients* **9**, 774 (2017).
200. Mackie, K. Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. *Handb. Exp. Pharmacol.* **168**, 299–325 (2005).
 201. Maccarrone, M. *et al.* Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 277–296 (2015).
 202. Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. & Pasquali, R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* **27**, 73–100 (2006).
 203. Bensaïd, M. *et al.* The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol. Pharmacol.* **63**, 908–914 (2003).
 204. Esposito, I. *et al.* The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant stimulates 2-deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating the expression of phosphatidylinositol-3-kinase. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1678–1686 (2008).
 205. Crespillo, A. *et al.* Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *Biochem. J.* **433**, 175–185 (2011).
 206. Eid, B. G. *et al.* Effects of the CB1 Receptor Antagonists AM6545 and AM4113 on Insulin Resistance in a High-Fructose High-Salt Rat Model of Metabolic Syndrome. *Medicina (B. Aires).* **56**, 1–14 (2020).
 207. Lin, Y. C. *et al.* Defective calcium inactivation causes long QT in obese insulin-resistant rat. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **302**, (2012).
 208. Beinart, R. *et al.* The QT interval is associated with incident cardiovascular events: The MESA Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, 2111–2119 (2014).
 209. Zhou, D. & Shearman, L, P. Voluntary exercise augments acute effects of CB1-receptor inverse agonist on body weight loss in obese and lean mice.

- Pharmacol. Biochem. Behav.* **77**, 117–125 (2004).
210. Zou, X. *et al.* Supraoptimal Cytokinin Content Inhibits Rice Seminal Root Growth by Reducing Root Meristem Size and Cell Length via Increased Ethylene Content. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, Vol. 19, Page 4051 **19**, 4051 (2018).
211. Liu, Y. L., Connoley, I. P., Wilson, C. A. & Stock, M. J. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lepob/Lep ob mice. *Int. J. Obes.* **29**, 183–187 (2005).
212. Franklin, N. C. *et al.* Circuit resistance training attenuates acute exertion-induced reductions in arterial function but not inflammation in obese women. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **13**, 227–234 (2015).
213. Slivovskaja, I. *et al.* Aerobic Training Effect on Arterial Stiffness in Metabolic Syndrome. *Am. J. Med.* **131**, 148–155 (2018).
214. Cai, G., Shi, G., Xue, S. & Lu, W. The atherogenic index of plasma is a strong and independent predictor for coronary artery disease in the Chinese Han population. *Med. (United States)* **96**, (2017).
215. Shyu, K.-G., Chang, H., Lin, C.-C. & Kuan, P. Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1 and E-Selectin in Patients With Acute Coronary Syndrome. *Chest* **109**, 1627–1630 (1996).
216. Jenkin, K. A. *et al.* Chronic administration of AM251 improves albuminuria and renal tubular structure in obese rats. *J. Endocrinol.* **225**, 113–124 (2015).
217. Udi, S. *et al.* Dual inhibition of cannabinoid CB1 receptor and inducible NOS attenuates obesity-induced chronic kidney disease. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 110–127 (2020).
218. Barutta, F. *et al.* Cannabinoid Receptor 1 Blockade Ameliorates Albuminuria in Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **59**, 1046 (2010).
219. Koura, Y. *et al.* Anandamide Decreases Glomerular Filtration Rate through Predominant Vasodilation of Efferent Arterioles in Rat Kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1488–1494 (2004).
220. Sampaio, L, S. *et al.* The endocannabinoid system in renal cells: regulation of

- Na(+) transport by CB1 receptors through distinct cell signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 4615–4625 (2015).
221. Munusamy, S., do Carmo, J. M., Hosler, J. P. & Hall, J. E. Obesity-induced changes in kidney mitochondria and endoplasmic reticulum in the presence or absence of leptin. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **309**, F731–F743 (2015).
222. Mukhopadhyay, P. *et al.* CB 1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 657–668 (2010).
223. Chen, X. *et al.* Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* **203**, 291–304 (2018).
224. Higami, Y. *et al.* Hepatic gene expression profile of lipid metabolism in rats: Impact of caloric restriction and growth hormone/insulin-like growth factor-1 suppression. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **61**, 1099–1110 (2006).
225. Martinez, R. *et al.* Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food Funct.* **9**, 830–850 (2018).
226. López-Vicario, C. *et al.* Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. *Eur. J. Pharmacol.* **785**, 133–143 (2016).
227. Osei-Hyiaman, D. *et al.* Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **115**, 1298 (2005).
228. Muller, T. *et al.* Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **313**, E26–E36 (2017).
229. Wu, H. M., Yang, Y. M. & Kim, S. G. Rimonabant, a cannabinoid receptor type 1 inverse agonist, inhibits hepatocyte lipogenesis by activating liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase axis downstream of $G\alpha$ i/o inhibition. *Mol. Pharmacol.* **80**, 859–869 (2011).

230. Vida, M. *et al.* CB1 blockade potentiates down-regulation of lipogenic gene expression in perirenal adipose tissue in high carbohydrate diet-induced obesity. *PLoS One* **9**, (2014).
231. Chen, C. C. *et al.* Using proteomics to discover novel biomarkers for fatty liver development and response to CB1R antagonist treatment in an obese mouse model. *Proteomics* **17**, (2017).
232. Vijayakumar, M. V., Pandey, P., Mishra, G. C. & Bhat, M. K. Hypolipidemic effect of fenugreek seeds is mediated through inhibition of fat accumulation and upregulation of LDL receptor. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 667–674 (2010).
233. Zhu, Z. *et al.* Hypolipidemic effect of Youcha in hyperlipidemia rats induced by high-fat diet. *Food Funct.* **8**, 1680–1687 (2017).
234. Mendes, I. K, S. *et al.* Weight loss enhances hepatic antioxidant status in a NAFLD model induced by high-fat diet. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **43**, 23–29 (2018).

8. ANEXOS