

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

Evaluación de la efectividad terapéutica de extractos funcionales obtenidos de Brasicáceas.

Memoria presentada por **Dña. Ana Isabel Guzmán Carrasco**
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada

Bajo la dirección de:

Dra. Consolación Melguizo Alonso

Dra. Rosario Martínez Martínez

Granada, 1 de abril de 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Isabel Guzmán Carrasco
ISBN: 978-84-1195-367-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92852>

La doctoranda, **Ana Isabel Guzmán Carrasco** y las directoras de la tesis, **Consolación Melguizo Alonso, Rosario Martínez Martínez**, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 1 de abril de 2024

Directores de la tesis

Doctoranda

Fdo.: **Consolación Melguizo Alonso**

Fdo.: **Ana I. Guzmán Carrasco**

Fdo.: **Rosario Martínez Martínez**

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO

CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Ana Isabel Guzmán Carrasco ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: “EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE EXTRACTOS FUNCIONALES OBTENIDOS DE BRASICÁCEAS”.

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada, 1 de abril de 2024.

Fdo: Dra. Consolación Melguizo Alonso

Catedrática de Universidad

Dra. ROSARIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

PROFESORA AYUDANTE DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Ana Isabel Guzmán Carrasco ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: “EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE EXTRACTOS FUNCIONALES OBTENIDOS DE BRASICÁCEAS”.

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada, 1 de abril de 2024.

Fdo: Dra. Rosario Martínez Martínez

Profesor Ayudante Doctor

“Dedicatoria”

Agradecimientos

RESUMEN

El cáncer de colon y la obesidad son dos patologías no transmisibles con una alta prevalencia en la sociedad. La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa debido a un desequilibrio energético entre las calorías ingeridas y las consumidas. La OMS estima que un cuarto de la población adulta europea padece obesidad y es responsable de más de 1.2 millones de muertes al año. El cáncer colorrectal (CCR) se origina por alteraciones celulares que provocan la pérdida del control del proceso de proliferación derivando en una excesiva división celular y la capacidad de estas células malignas para diseminarse a otros tejidos. Es el tercer tipo de cáncer por incidencia en la población a nivel mundial, y el segundo tipo en número de defunciones asociadas. Aunque son dos entidades distintas, cabe destacar que la obesidad *per se* supone un riesgo importante para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer colorrectal.

Ambas patologías suponen un desajuste en el estado redox del individuo, un estado inflamatorio crónico, alteraciones metabólicas y disbiosis intestinal. En este contexto, los extractos vegetales suponen una gran herramienta para mejorar estos parámetros debido a la diversidad de compuestos bioactivos que los componen, los cuales han demostrado tener un efecto beneficioso sobre la salud humana al prevenir y ser utilizado para el tratamiento de múltiples alteraciones. Concretamente, las especies vegetales de la familia *Brassicaceae* aportan numerosos efectos beneficiosos sobre la salud debido a su valor nutricional y a su alto contenido en compuestos bioactivos. Entre ellos, destacan los isotiocianatos, a los que se les atribuye efectos fisiológicos sobre la salud humana como la inducción de enzimas detoxificantes. Los compuestos fenólicos, además, presentes en multitud de especies vegetales, suscitan gran interés gracias a su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerogénica. Por otra parte, el ejercicio físico tiene un papel fundamental en la prevención de estas enfermedades, estando mediados estos efectos beneficiosos por mecanismos antiinflamatorios, estimulación de la respuesta del sistema inmune, modulación de

distintos aspectos del metabolismo glucídico y lipídico, y mejora el sistema cardiovascular.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta tesis doctoral es obtener extractos funcionales derivados de Brassicáceas y otras especies vegetales, que puedan ser usados para el tratamiento de la obesidad y alteraciones asociadas y la prevención del cáncer colorrectal, administrados de forma aislada o en combinación con la realización de un protocolo de ejercicio físico.

Para ello, se realizó un *screening* sobre diferentes especies vegetales y mediante la realización de distintos métodos de extracción con el fin de seleccionar aquellos extractos vegetales con mayor rendimiento y capacidad antioxidante. Además, en el caso de los extractos vegetales procedentes de Brásicas se evaluó la capacidad para inducir enzimas detoxificantes. En base a ello, se formularon dos nutraceuticos combinando distintas especies vegetales y métodos de extracción, los cuales fueron sometidos a un proceso de digestibilidad *in vitro* y pruebas de capacidad antioxidante, capacidad antiproliferativa y capacidad antiinflamatoria en las líneas celulares HT-29, T84 y J774A1, respectivamente. Para identificar los compuestos bioactivos que componían estos nutraceuticos se utilizó cromatografía líquida de alta resolución. Finalmente, la funcionalidad de cada nutraceutico fue evaluada en dos ensayos de experimentación animal en ratones C57BL/6J: i) modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida y ii) modelo de cáncer colorrectal inducido por el método AOM/DSS.

Con respecto al modelo de obesidad, las intervenciones realizadas de restricción calórica y administración del nutraceutico en combinación o no con un protocolo de ejercicio físico, no solo consiguieron revertir el peso corporal de los animales, sino que además mejoraron los parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico, y consiguieron revertir el estado inflamatorio, oxidante y la disbiosis intestinal derivadas de la obesidad.

Con respecto a los ensayos sobre el modelo experimental animal de cáncer colorrectal, se logró desarrollar pólipos tumorales en el colon de los ratones sin

afectar a otros órganos. La ingesta diaria de $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del nutraceutico desarrollado a partir de extractos vegetales de semillas de Brassicáceas fue capaz de reducir el desarrollo de estos pólipos, efecto que se vio aún más potenciado cuando combinó con el protocolo de ejercicio físico. Además, ha sido capaz de mejorar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y disbiosis intestinal derivadas del desarrollo del tumor.

A modo de conclusiones, y debido a la creciente prevalencia de la obesidad y de las alteraciones metabólicas derivadas de ella, podemos decir que es necesario el desarrollo de estrategias eficaces para combatir los problemas sanitarios y sociales asociados a esta patología. La restricción calórica fue una estrategia eficaz para la pérdida de peso. Además, la administración de nutraceuticos combinada con un protocolo de ejercicio hacen la sinergia de tratamiento ideal en un modelo preclínico que podría plantearse en un futuro para la realización de ensayos clínicos. Por otra parte, los extractos desarrollados a partir de las semillas de especies de la familia Brassicáceas tienen un papel preventivo excepcional en el inicio del desarrollo del cáncer colorrectal, potenciándose este efecto con la combinación del ejercicio físico, a través de la disminución del estado proinflamatorio de los animales y de la mejora de la capacidad antioxidante, al ser capaces de eliminar moléculas inestables como ROS que pueden iniciar el proceso de carcinogénesis.

Estos nutraceuticos pueden ser utilizados como suplementos dietéticos en el tratamiento de la obesidad y la prevención del cáncer colorrectal, dos condiciones patológicas donde la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental.

SUMMARY

Colon cancer and obesity are two non-communicable diseases with a high prevalence in society. Obesity is defined as an abnormal or excessive accumulation of fat due to an energy imbalance between calories ingested and calories consumed. The WHO estimates that a quarter of the European adult population suffers from obesity that is responsible for more than 1.2 million deaths per year. Colorectal cancer (CRC) is caused by cellular alterations that lead to a loss of control of the proliferation process, resulting in excessive cell division and the ability of these malignant cells to spread to other tissues. It is the third type of cancer by incidence in the population worldwide, and the second type in number of associated deaths. Although they are two distinct entities, it should be noted that obesity *per se* is an important risk for the development of different types of cancer, including colorectal cancer.

Both pathologies involve an imbalance in the individual's redox state, a chronic inflammatory state, metabolic alterations and intestinal dysbiosis. In this context, plant extracts are a great tool to improve these parameters due to their content of bioactive compounds which have been shown to have a beneficial effect on human health by reducing or preventing these alterations. The plant species of the *Brassicaceae* family provide numerous health benefits due to their nutritional value and their high content of bioactive compounds. Among them, the isothiocyanates stand out, to which most of the physiological effects on human health are attributed. However, phenolic compounds attracted great interest in this doctoral thesis due to their antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antiaggregation and detoxifying enzyme induction capacity. Physical exercise also plays a fundamental role in the prevention of these diseases. The beneficial effects of regular exercise are mediated by anti-inflammatory mechanisms, stimulation of the immune system response, modulation of metabolism and improvement of the cardiovascular system.

The general objective of this PhD is to obtain functional extracts derived from Brassicaceae and other plant species, which can be used for the treatment of obesity and associated disorders and the prevention of colorectal cancer, administered alone or in combination with a physical exercise protocol.

For this purpose, a screening in terms of plant species and extraction methods was carried out in order to select those plant extracts with the highest antioxidant capacity in various chemical tests. In addition, in the case of *Brassicaceae* plant extracts, the capacity to induce detoxifying enzymes was evaluated. Based on the screening results, two nutraceuticals were formulated combining different plant species and extraction methods. These were subjected to an *in vitro* digestion process and tested for antioxidant, antiproliferative and anti-inflammatory capacity in HT-29, T84 and J774A1 cell lines, respectively. High performance liquid chromatography was used to identify their specific bioactive compounds. Finally, the functionality of each nutraceutical was evaluated in two animal experimental assays in C57BL/6J mice: i) high-fat diet-induced obesity model and ii) AOM/DSS-induced colorectal cancer model.

A model of obesity and metabolic alterations in experimental animals was established from the 3rd week of the experimental by consuming a high fat and fructose in the drinking water period. The administration of the nutraceutical in combination with a physical exercise protocol not only managed to reverse the body weight of the animals, but also improved plasma parameters related to glycemic and lipid metabolism, decreased the accumulation of fat in the liver, and managed to reverse the inflammatory, oxidative, and intestinal dysbiosis state derived from obesity. On the other hand, it was possible to develop tumor polyps in the colon of mice without affecting other organs. The daily administration of the nutraceutical developed from plant extracts at 500mg/kg body weight was able to reduce the development of these polyps, an effect that was further enhanced when combined with the physical exercise protocol. In addition, it was able to improve the

endogenous antioxidant and anti-inflammatory activities and correct the gut dysbiosis derived from tumor development.

The increasing prevalence of obesity and related metabolic disorders requires the development of effective strategies to combat the health and social problems associated with these pathologies. Caloric restriction is an effective strategy for weight loss and our results highlight that the combination of nutraceutical administration with an exercise protocol may provide the ideal treatment synergy in combination with the former intervention to be tested in population-based studies to enhance the effects of caloric restriction on different metabolic and inflammatory parameters derived from the development of obesity. Furthermore, these results confirm the beneficial effects of brassica extracts on health and encourage their use as a dietary supplement in the prevention/treatment of those pathological conditions where inflammation and oxidative stress play a fundamental role. The consumption of brassicas, or the bioactive compounds derived from this family, may decrease the risk and incidence of CRC by being able to eliminate unstable molecules such as ROS that can initiate the process of carcinogenesis.

ABREVIATURAS

AGCC	Ácido Graso de Cadena Corta
AICR	American Institute for Cancer Research
AOM	Azoxymethane
ATGL	Lipasa de triglicéridos del tejido adiposo
ATP	Adenosina trifosfato
bAT	Tejido adiposo beige
BAT	Tejido adiposo pardo
BSI	Body Shape Index / Índice de forma corporal
CADM1	Molécula de adhesión celular 1
CAT	Catalasa
CCR	Cáncer colorrectal
CDC42	Proteína implicada en el ciclo de división celular
CIS	Carcinoma in situ
CVD	Enfermedades cardiovasculares
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo II
ENT	Enfermedad No Transmisible
FADH2	Dinucleótido de flavina adenina reducido
FASN	Ácido graso sintasa
FGF-21	Factor de crecimiento de fibroblastos
G3P	Glicerol 3-fosfato
GCO	Global Cancer Observatory
GK	Glucoquinasa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT	Transportador de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
HOMA	Homeostatic model assessment
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IC50	Inhibición del 50% del crecimiento celular
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
IRS	Substrato receptor de la insulina
LPS	Lipopolisacárido
MAO	Obesidad con metabolismo alterado
MetS	Síndrome metabólico
MGL	Monoglicérido lipasa
MHO	Metabólicamente sano, pero fenotipo obeso
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAFL	Hígado graso no alcohólico
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólica
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica

NF-KB	Factor nuclear kappa B
NIDDK	Instituto Nacional Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
NT	Nutracéutico
ODS	Objetivos de desarrollo sostenible
OMS	Organización mundial de la salud
SFN	Sulforrafano
SO	Obesidad sarcopénica
SOD	Superóxido dismutasa
PIK3CD	Subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
PK	Proteínas quinasas
PPARα	Receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
PVAT	Tejido adiposo perivascular
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFA	Ácido graso saturado
SLC20A1	El transportador de fosfato dependiente de sodio 1
SNS	Sistema nervioso simpático
SREBP	Proteína de unión a elementos reguladores del esteroles
TAB	Tejido adiposo blanco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tejido adiposo marrón
TEM	Microambiente tumoral
TG	Triglicéridos
TFG	Factor de crecimiento tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral
TOFI	Delgado por fuera, obeso por dentro
TTOG	Test de tolerancia oral a la glucosa
UCP1	Proteína desacoplante 1
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
WAT	Tejido adiposo blanco
WOA	Atlas mundial de obesidad
WOF	Federación mundial de la obesidad
UCP1	Proteína desacoplante 1
WAT	Tejido adiposo blanco

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	OBESIDAD	3
1.1.1	<i>Prevalencia</i>	4
1.1.2	<i>Mortalidad</i>	6
1.1.3	<i>Factores de riesgo</i>	6
1.1.4	<i>Tejido adiposo. Fisiopatología de la obesidad</i>	9
1.1.5	<i>La obesidad como factor de riesgo para el desarrollo de otras patologías</i>	19
1.1.6	<i>Tratamientos</i>	33
1.2	CÁNCER COLORRECTAL (CCR)	43
1.2.1	<i>Carcinogénesis</i>	45
1.2.2	<i>Incidencia</i>	53
1.2.3	<i>Mortalidad</i>	54
1.2.4	<i>Factores de riesgo</i>	55
1.2.5	<i>Sintomatología, detección, diagnóstico y prevención</i>	57
1.2.6	<i>Tratamientos</i>	59
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
2.1	HIPÓTESIS.....	71
2.2	OBJETIVO GENERAL	71
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	73
3.2	GERMINACIÓN	74
3.3	EXTRACTOS FUNCIONALES	75
3.3.1	<i>Extractos etanólicos</i>	75
3.3.2	<i>Extractos acuosos e Hidrolizados proteicos</i>	76
3.4	PRUEBAS QUÍMICAS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	77
3.4.1	<i>Polifenoles totales</i>	77
3.4.2	<i>ABTS</i>	78
3.4.3	<i>Capacidad reductora de hierro</i>	79
3.4.4	<i>Capacidad quelante de hierro</i>	80
3.4.5	<i>Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica</i>	80
3.5	FORMULACIÓN DE NUTRACÉUTICOS	82
3.6	IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	84
3.7	DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	85
3.8	ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES	86
3.8.1	<i>Ensayos de viabilidad celular</i>	87
3.8.2	<i>Ensayos de capacidad antioxidante in vitro</i>	88
3.8.3	<i>Ensayos de capacidad antiinflamatoria</i>	89

3.8.4	<i>Ensayos de capacidad antiproliferativa</i>	90
3.8.5	<i>Determinación de la actividad de enzimas detoxificantes</i>	90
3.9	ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	93
3.9.1	<i>Ensayos para estudios de obesidad</i>	93
3.9.1.1	Animales de experimentación	93
3.9.1.2	Dietas experimentales.....	93
3.9.1.3	Grupos experimentales	94
3.9.1.4	Periodo experimental	96
3.9.1.5	Programa de ejercicio físico	96
3.9.1.6	Análisis realizados.....	98
3.9.2	<i>Modelo experimental in vivo para el cáncer de colon</i>	111
3.9.2.1	Animales de experimentación	111
3.9.2.2	Dietas experimentales.....	111
3.9.2.3	Grupos experimentales	112
3.9.2.4	Período experimental.....	112
3.9.2.5	Inducción del cáncer colorrectal <i>in situ</i>	113
3.9.2.6	Programa de ejercicio físico	114
3.9.2.7	Análisis realizados.....	115
3.10	ESTADÍSTICA.....	120
4	RESULTADOS	121
4.1	ENSAYOS EN MODELO DE OBESIDAD.....	121
4.1.1	<i>Caracterización de los extractos vegetales</i>	121
4.1.2	<i>Diseño y caracterización del nutracéutico</i>	124
4.1.2.1	Capacidad antioxidante	124
4.1.2.2	Digestión <i>in vitro</i>	125
4.1.2.3	Citotoxicidad.....	125
4.1.2.4	Capacidad antioxidante y antiinflamatoria en cultivo celular	126
4.1.2.5	Identificación de compuestos bioactivos	127
4.1.3	<i>Ensayos in vivo</i>	133
4.1.3.1	Peso e ingesta de los animales.....	133
4.1.3.2	Test incremental de consumo máximo de O ₂	138
4.1.3.3	Parámetros hemáticos.....	139
4.1.3.4	Parámetros bioquímicos.....	141
4.1.3.5	Inmunoensayo	143
4.1.3.6	Índices biológicos determinados	145
4.1.3.7	Test de tolerancia oral a la glucosa (TOG)	147
4.1.3.8	Composición corporal.....	150
4.1.3.9	Peso de los órganos.....	151
4.1.3.10	Parámetros hepáticos.....	152
4.1.3.11	Expresión génica en hígado y músculo.....	154
4.1.3.12	Microbioma intestinal	157
4.2	ENSAYOS EN MODELOS DE CANCER COLORECTAL.....	166
4.2.1	<i>Caracterización extractos vegetales</i>	166
4.2.1.1	Capacidad antioxidante mediante pruebas químicas	166
4.2.2	<i>Diseño y caracterización del nutracéutico</i>	185
4.2.2.1	Capacidad antioxidante	185

4.2.2.2	Digestión <i>in vitro</i>	186
4.2.2.3	Citotoxicidad.....	187
4.2.2.4	Capacidad antioxidante en cultivo celular.....	189
4.2.2.5	Capacidad de inducción enzimas detoxificantes.....	189
4.2.2.6	Identificación de compuestos bioactivos.....	190
4.2.3	<i>Ensayo experimental animal</i>	195
4.2.3.1	Peso e ingesta de los animales.....	195
4.2.3.2	Parámetros hemáticos.....	197
4.2.3.3	Peso órganos.....	198
4.2.3.4	Análisis colon.....	198
4.2.3.5	Análisis histológico.....	200
4.2.3.6	Expresión génica.....	210
4.2.3.7	Microbioma.....	212
5	DISCUSIÓN.....	215
5.1	ENSAYO EN MODELO DE OBESIDAD.....	215
5.2	ENSAYO EN MODELO DE CÁNCER COLORRECTAL.....	235
6	CONCLUSIONES.....	245
7	BIBLIOGRAFIA.....	247
8	ÍNDICE DE TABLAS.....	273
9	ÍNDICE DE FIGURAS.....	277

1 INTRODUCCIÓN.

Obesidad y cáncer de colon: dos enfermedades no transmisibles

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son la consecuencia de una combinación de factores genéticos, ambientales, fisiológicos y comportamentales que causan 17 millones de muertes al año en personas con menos de 70 años [1]. Son enfermedades crónicas que afectan a todos los grupos de edad, regiones y países y comprende principalmente patologías cardiovasculares, respiratorias, diabetes y el cáncer. En 2015, la Asamblea General de las Naciones Unidas estableció los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) para lograr un futuro mejor a nivel mundial. En ellos se reconocían las ENT como un reto importante, estableciendo como meta en la Agenda 2030 reducir en un tercio la mortalidad prematura provocada por estas patologías mediante la prevención y el tratamiento [2].

Estas enfermedades se ven propiciadas, entre otros factores, por hábitos de vida poco saludables como el consumo de una dieta alta en grasa o la falta de actividad física, el hábito tabáquico y el consumo de alcohol, considerándose también la contaminación atmosférica como un factor de riesgo importante para el desarrollo de algunas de estas patologías. La exposición a estos factores puede dar lugar a alteraciones metabólicas como un aumento de la tensión arterial, de los niveles de glucosa y lípidos en sangre, sobrepeso y obesidad, que puedan desencadenar infartos de miocardio y/o accidentes cerebrovasculares, diabetes, enfermedad pulmonar y una gran diversidad de tipos de cáncer [1]. La falta de actividad física es responsable de 830.000 muertes al año mientras que 1.8 millones de muertes anuales se deben a dietas poco saludables. La obesidad y el cáncer de colon son dos enfermedades no transmisibles que se caracterizan por su alta prevalencia en la población a nivel mundial. Aunque son dos entidades distintas, el Global Cancer Observatory (GCO) establece una relación causal entre la obesidad y varios tipos de cáncer. Se estima que en el año 2020 se produjeron unos 478.900 casos de cáncer directamente relacionados con la obesidad a nivel mundial [3].

Cabe destacar que la obesidad *per se* supone un riesgo importante para el desarrollo de al menos trece tipos de cáncer, entre ellos se incluyen cáncer mamario, uterino, ovárico, esofágico, estomacal, colorrectal, pancreático o de hígado, siendo el cáncer colorrectal (CCR) uno de los más relevantes [4]. El desarrollo de la obesidad está ligado a un aumento en el plasma en la concentración de glucosa, insulina, IGF-1, lípidos, leptina, estrógenos, resistina y citoquinas proinflamatorias. Todos estos factores se han relacionado con la patogenicidad del cáncer [5]. Un alto nivel de TG en sangre supone un incremento en la proliferación y agresividad de células tumorales. La RI derivada de la obesidad supone un incremento en la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el cual se ha relacionado con la estimulación en la proliferación, supervivencia y migración de células cancerígenas. La expresión de la proteína transportadora de ácidos grasos CD36 se encuentra sobreexpresada en pacientes obesos, y además se ha reconocido su papel en la metástasis de ciertos tipos de cáncer como el gástrico. El estado de inflamación que se produce en pacientes obesos genera la producción de ROS, que son factores de riesgo en el desarrollo del cáncer. Los adipocitos disfuncionales producen citoquinas proinflamatorias como IL-1 β que estimula la activación de células cancerosas y promueve la metástasis o la IL-6 o TNF α que estimulan la angiogénesis. Otra citoquina que se incrementa por un tejido adiposo disfuncional es la leptina, que no solo promueve la proliferación de células cancerígenas, sino que promueve la aparición de fenotipos resistentes a los fármacos [6].

En la presente tesis doctoral se abordarán posibles tratamientos basados en extractos funcionales obtenidos de Brasicáceas y otras especies vegetales para paliar y/o prevenir ambas enfermedades.

1.1 OBESIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que supone un riesgo para la salud y cuya prevalencia en la sociedad se ha triplicado desde 1975. La causa principal para su desarrollo es un desequilibrio energético entre las calorías ingeridas y las consumidas (debido principalmente a un aumento en la ingesta de alimentos ricos en grasa y de alto contenido calórico) así como un descenso en la actividad física [7]. El método más común de identificación del sobrepeso o la obesidad clínicamente es el índice de masa corporal (IMC) o la relación entre el peso y la estatura, debido a que es indicador simple y no invasivo. En adultos se considera que un paciente tiene sobrepeso cuando su IMC es igual o superior a 25 kg/m² y tiene obesidad cuando es superior a 30 kg/m², mientras que en el caso de niños es necesario tener en cuenta la edad. El riesgo de padecer algún tipo de ENT crece con el aumento del IMC. En concreto un IMC elevado es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer. Además, en el caso de IMC en niños ocasiona dificultades respiratorias, un mayor riesgo de hipertensión, RI y efectos fisiológicos que puede desencadenar en muerte prematura y discapacidad en la edad adulta [7].

Sin embargo, el IMC solo tiene en cuenta el contenido de grasa total, sin tener en cuenta su distribución o el contenido total de músculo o masa magra [8,9]. Por ello, en los últimos años se han empleado nuevos índices para superar estas limitaciones, como el perímetro de la cintura que permite estimar el volumen abdominal [8], el índice de Lee que relaciona el peso con el largo del tronco [10], y el índice de complejión corporal (BSI, por sus siglas en inglés: *Body Shape Index*) que permite conocer la distribución de la grasa corporal [9]. Otros índices no antropométricos usados para conocer la probabilidad de desarrollar una enfermedad metabólica son el índice HOMA, por sus siglas en inglés *Homeostasis Model Assesment*, que permite estimar la sensibilidad a la insulina y la función de las células β [11], o los índices

aterogénicos que son indicadores de riesgo cardiovascular basados en el nivel de colesterol, glucosa e insulina en sangre [9,12].

La obesidad es una enfermedad heterogénea, que no actúa o se presenta de la misma forma en todos los pacientes. Yáñez-Esquirol et al. [13] definen diversos fenotipos de la obesidad clasificándolos en función de la composición corporal y el riesgo de sufrir alteraciones metabólicas:

- Fenotipo MAO (*Metabolic Altered Obesity*): Individuos con IMC > 30 y que además presentan las alteraciones metabólicas típicas derivadas de la obesidad.
- Fenotipo TOFI (*Thin Outside, Fat Inside*): Aquellos individuos que presentan un peso estándar según su IMC, pero su perfil metabólico entra dentro de los parámetros de la obesidad: el nivel de citoquinas proinflamatorias es elevado, presentan mayor porcentaje de grasa visceral, hiperinsulinemia, RI, dislipemia.
- Fenotipo MHO (*Metabolically Healthy but Obese*): Personas obesas según su IMC, pero con un perfil metabólico sano; presentan valores estándar para la sensibilidad a la insulina, contenido lipídico y de citoquinas proinflamatorias.
- Fenotipo SO (*Sarcopenic Obesity*): Se presenta sobre todo en personas adultas y está caracterizada por la presencia de obesidad visceral acompañada de sarcopenia. La inflamación crónica que produce la obesidad tiene un efecto catabólico en la masa muscular, favoreciendo la pérdida de masa muscular, así como su funcionalidad. Además, la SO incrementa más el riesgo de sufrir alteraciones metabólicas como enfermedades cardiovasculares y mortalidad que cuando se presentan la sarcopenia o la obesidad de forma aislada [14].

1.1.1 Prevalencia

Según el informe de la OMS en el año 2022 sobre la obesidad en la región europea, la obesidad supone un grave problema de salud pública en todo el mundo y uno de los principales factores de mortalidad en la unión europea. Según los datos oficiales de la fundación de la obesidad mundial (WOF, por sus siglas en inglés *World Obesity*

Federation) en 2020, 2.603 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, 988 millones eran obesos [15]. En la **Figura 1** se muestra la distribución y prevalencia de la obesidad a nivel mundial.

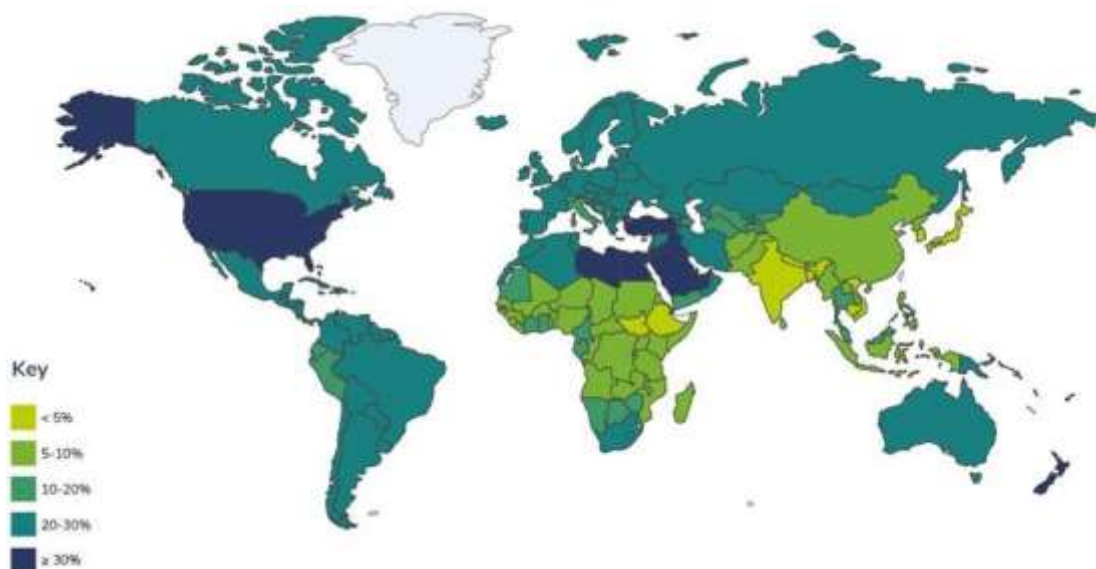


Figura 1. Prevalencia de la obesidad (IMC > 30 kg/m²) en adultos [16].

En la región europea la OMS estima que un cuarto de la población adulta padece obesidad (26%). Dado que ningún país ha informado de un descenso en la prevalencia de la obesidad de su población en los últimos años, se estima que en 2035 la obesidad en la región europea afectará al 35% de las mujeres y un 39% de hombres [16].

En la **Figura 2** se muestra la prevalencia actual de obesidad en la población española según el último estudio poblacional reportado por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [17]. En general la prevalencia es mayor en hombres (19.3%) que en mujeres (18.0%), viéndose afectado por el nivel de estudios, la renta y la presencia de alguna discapacidad. La federación mundial de la obesidad (WOF) en el atlas de obesidad mundial publicado el año 2023, estimó un aumento significativo en el número de casos que padecerán obesidad para el año 2035, tanto personas adultas como niños. Este incremento se verá más pronunciado en el caso de varones adultos, mientras que el número de niños obesos incrementará por igual, independientemente del sexo [16]. De hecho, en el último informe oficial de la Junta

de Andalucía que se publicó en 2021, en Andalucía había un 20.3% de niños y niñas de entre 6 y 9 años con obesidad [18].

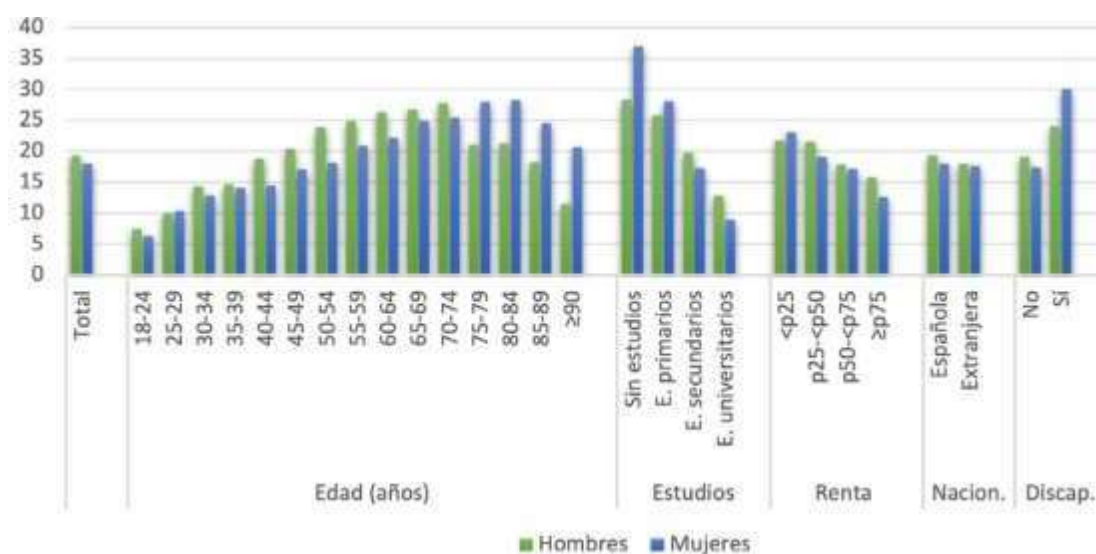


Figura 2. Prevalencia (%) de obesidad según características sociodemográficas en el estudio de situación ponderal ENE-COVID [17].

1.1.2 Mortalidad

Además de desencadenar la aparición de otras enfermedades, el exceso de grasa está asociado a un incremento en la mortalidad. Recientes estudios estiman que en la región europea el sobrepeso y la obesidad causan más de 1.2 millones de muertes al año, esto supone un 13% del número total de muertes en esta región. Aquellas personas que padecen obesidad tienen una esperanza de vida 5 años menor que aquellas que mantienen un peso saludable. Aun así, se estima que las muertes derivadas de la obesidad están subestimadas por la dificultad en su evaluación o las consecuencias en la salud en las que derivan [19]. A su vez, en estos últimos años, se ha constatado la implicación de la obesidad sobre ciertas enfermedades infecciosas como la COVID19, donde el padecimiento de esta patología incrementa tanto el riesgo de ingreso hospitalario como el riesgo de muerte [20].

1.1.3 Factores de riesgo

Existen multitud de factores que intervienen en el desarrollo de la obesidad, y aunque también se ha relacionado el desarrollo de la obesidad con factores genéticos, la realidad es que la mayoría de estos factores entorno y el estilo de vida:

1.1.3.1 Factores ambientales

Los cambios en los hábitos alimentarios y de actividad física que hemos adquirido en los últimos años han hecho que actualmente tengamos un estilo de vida muy favorecedor para el desarrollo de la obesidad. Las dietas basadas en alimentos ultra procesados, con alto contenido calórico principalmente de grasas saturadas y azúcares refinados son cada vez más accesibles en nuestra sociedad, además, de la naturaleza cada vez más sedentaria de los nuevos puestos de trabajo y las formas de transporte. Todo ello contribuye a que teniendo un mayor consumo de energía en la dieta, nuestro gasto energético sea menor, por tanto, se produce el desajuste energético que da lugar a la obesidad [7]. Varios estudios han demostrado que un exceso de fructosa en la dieta disminuye la expresión del transportador de glucosa (GLUT4) en los adipocitos e incrementa el contenido de triglicéridos (TG) en el hígado reduciendo la sensibilidad a la insulina y un alto contenido de glucosa que causa glucotoxicidad y RI de los hepatocitos [21]. Además, una dieta basada en alimentos procesados, con alto contenido en grasa o azúcares se asocia con la RI y disbiosis intestinal. En concreto, se produce un cambio en el ratio Firmicutes/Bacteroidetes, e incrementa la presencia de bacterias proinflamatorias [22]. También contribuye a la integridad de la barrera epitelial facilitando la adsorción de toxinas, moléculas proinflamatorias como lipopolisacáridos (LPS) al torrente sanguíneo [23].

La temperatura ambiental también influye en la obesidad ya que la energía gastada en la termorregulación es mayor o menor en función de esta temperatura. Es decir, a menor temperatura ambiental, el organismo incrementa el gasto metabólico para mantener su temperatura óptima. Hemos aclimatado nuestro ambiente para mantener un entorno termo-confortable en viviendas, lugares de trabajo y medios de transporte, minimizando la demanda energética para tal fin e incrementado la acumulación de esta energía y el riesgo de desarrollar obesidad [21].

El desarrollo de la obesidad está asociado con un estilo de vida sedentario [24]. Se ha demostrado que un estilo de vida sedentario está asociado con inducción de la RI [25], además de con una menor consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx), un

incremento de la grasa visceral, presión sanguínea y mayores concentraciones en plasma de cortisol y el factor de necrosis tumoral (TNF α). La mayoría de estos parámetros pueden ser revertidos con la realización de ejercicio físico [26].

1.1.3.2 Envejecimiento

La edad se asocia con cambios en la composición corporal: se incrementa el riesgo de acumular grasa visceral alrededor del hígado, músculo esquelético y abdomen. Además, el gasto energético basal disminuye conforme envejecemos y, de forma general, se practica menos ejercicio por lo que el gasto energético es menor y se acumulará más grasa si se mantiene la misma ingesta calórica [21]. El envejecimiento se asocia también a la pérdida de masa muscular o sarcopenia, que unida a la acumulación de grasa visceral incrementa el estado de inflamación del individuo y aumenta el riesgo de sufrir enfermedades metabólicas [14].

1.1.3.3 Microbiota intestinal

La composición de la microbiota está influenciada por la dieta, la edad, el tipo de nacimiento (convencional o cesárea), uso de antibióticos u otros medicamentos, la genética y la actividad física, siendo este último junto con la dieta los moduladores con más importancia. Cualquier cambio en la composición y/o función de la microbiota puede generar la ganancia de peso ya que juega un papel fundamental en la homeostasis energética. De hecho, trasplantes de la microbiota de ratones obesos ha sido capaz de generar la acumulación de grasa en ratones *germ-free*, sin ser debido a un incremento en la ingesta de alimento, sino por una inflamación crónica derivada de un aumento de bacterias gramnegativas que incrementan la absorción de lipopolisacáridos (LPS) y por una alteración en la homeostasis energética al incrementar poblaciones bacterianas capaces de ser más eficientes en la producción de energía a partir del contenido fecal; aprovechando monosacáridos que habitualmente no serían digeribles, incrementando la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y promoviendo el depósito de triglicéridos en los adipocitos [27].

1.1.3.4 Factores genéticos

Determinados genes pueden afectar la cantidad de grasa almacenada, y su distribución. Otros determinan la eficiencia en el uso de la energía proveniente de la comida. Malos hábitos en la alimentación suponen metilaciones en el ADN que pueden incrementar el riesgo de sufrir obesidad en niños nacidos de padres obesos [21]. La obesidad genética puede ser causada por la alteración de un único gen, como el gen de la leptina o el receptor de la leptina, y entonces se denomina obesidad monogenética. Sin embargo, es más usual la obesidad poligenética en la que la genética del paciente determina el grado de susceptibilidad frente a distintos estímulos ambientales, pudiendo ser susceptibles a modificaciones epigenéticas e incrementar el riesgo de desarrollar obesidad [28].

1.1.4 Tejido adiposo. Fisiopatología de la obesidad

El tejido adiposo es un órgano endocrino metabólicamente activo cuyas células, los adipocitos, envían y reciben hormonas conocidas como adipocitoquinas, las cuales se asocian a procesos relacionados con el metabolismo glucídico o lipídico, el desarrollo celular, la inflamación y el estrés oxidativo. Por tanto, una alteración en ellas puede derivar en numerosos problemas de salud [19]. La cantidad de adipocitos, el tipo y la distribución son esenciales para determinar la funcionalidad del tejido adiposo y la homeostasis energética de un individuo [13]. Aunque los adipocitos son las células más características del tejido adiposo, encontramos además otros tipos celulares como células del sistema inmune, células endoteliales, y células sanguíneas que junto con los adipocitos se encargan de mantener la homeostasis del tejido [29]. La proporción de los diferentes tipos celulares presentes varía en función del estado fisiológico, el nivel de inflamación del individuo, o la localización del tejido adiposo [30].

Los adipocitos almacenan o movilizan los nutrientes en función de la necesidad del organismo. Cuando existe una carencia de nutrientes, además de producirse un aumento de la glucemia mediante la acción del glucagón, los adipocitos se estimulan por la noradrenalina y activan lipasas encargadas de liberar ácidos grasos no

esterificados y glicerol al torrente sanguíneo, para que pueda ser usado por los órganos, como el hígado o el músculo esquelético. Sin embargo, en abundancia de nutrientes, el nivel de glucosa en sangre se incrementa y la insulina inhibe las enzimas implicadas en la activación de lipasas. Paralelamente, se promueve la captación de glucosa y la lipogénesis para almacenar los lípidos en las vesículas de los adipocitos [31]. Todo este proceso está regulado por las adipoquinas, las proteínas estructurales de membrana y las proteínas quinasas (entre otras) que han sido reconocidas como mediadoras de la lipólisis [13]. El efecto negativo de la obesidad sobre la salud no se debe solo a la presencia de mayor tejido graso, sino que, con el desarrollo de la obesidad, la respuesta de los adipocitos a estas señales extracelulares, concretamente a la insulina, disminuye notablemente. Es decir, pierde la habilidad para responder a los cambios externos, derivando en problemas metabólicos como resistencia a la insulina, inflamación y muerte celular [19].

La cantidad de tejido adiposo de un individuo adulto puede verse incrementada por un aumento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o por un incremento en el número de adipocitos presentes (hiperplasia). Los adipocitos se generan a partir de células conocidas como preadipocitos, que tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en adipocitos maduros. El proceso de transición de un preadipocito a un adipocito se compone de cuatro fases, descritas en la **Figura 3**. Es un proceso regulado por una gran cantidad de factores de transcripción, entre los que destacan los receptores activados por proliferadores peroxisomales gamma ($PPAR\gamma$), necesario para promover la diferenciación y el mantenimiento de esta, y las proteínas alfa de unión a potenciadores ($C/EBP\alpha$) que promueven la expresión de genes a través de la interacción con sus promotores [30].

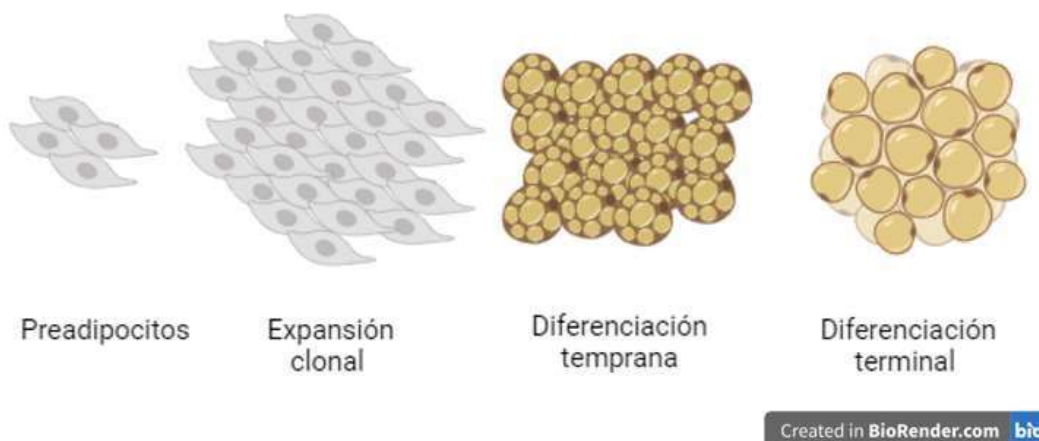


Figura 3. Fases de maduración de preadipocito a adipocito.

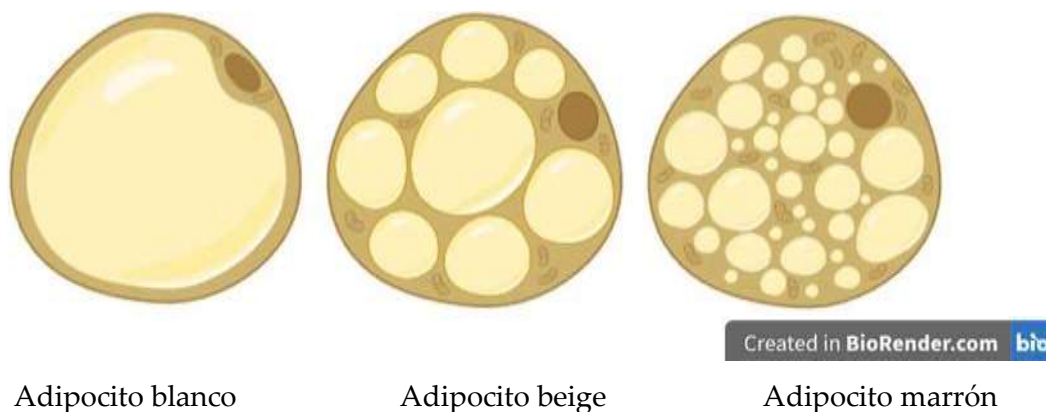
En los mamíferos se encuentran distintos tipos de tejido adiposo, los cuales presentan una función, fenotipo, origen y regulación distintivo:

- Tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés *White Adipose Tissue*). Su nombre se debe a que está compuesto principalmente por adipocitos blancos caracterizados por tener una gran vesícula lipídica y muy pocas mitocondrias, las cuales provienen de adipoblastos [32]. Supone entre el 10-15% del peso total de una persona sana, y se incrementa hasta un 50% en individuos con sobrepeso [32]. La principal función del WAT es la de almacenar los lípidos como reserva energética (lipogénesis), pero también interviene en la lipólisis, la captación de glucosa y secreción de adipoquinas como la leptina, adiponectina, y resistina, entre otras [29]. Se pueden diferenciar: i) *WAT subcutáneo* localizado bajo la piel y distribuido por todo el cuerpo, aunque se encuentran mayores depósitos en la zona abdominal, nalgas y muslos y, ii) *WAT visceral* que se localiza alrededor de los órganos proporcionando aislamiento y protección mecánica a los mismos [30]. El tejido adiposo visceral presenta además un mayor impacto sobre la salud debido a que la grasa visceral es biológicamente más activa y su función endocrina supone un mayor riesgo metabólico [33].
- Tejido adiposo pardo (BAT, por sus siglas en inglés *Brown Adipose Tissue*). Está caracterizado por la presencia de adipocitos marrones los cuales presentan gran cantidad de mitocondrias ricas en hierro que le confieren la habilidad

para producir calor en respuesta a estímulos ambientales, es decir la termogénesis, [32] y sus vesículas lipídicas son varias y pequeñas. Además, interviene en la depuración de lípidos, catabolismo de la glucosa y secreción de IL-6 y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21). Los adipocitos marrones se caracterizan por expresar una proteína de membrana mitocondrial conocida como proteína desacoplante 1 (UCP1), cuya función es desacoplar el gradiente de protones para producir ATP y generar calor [29]. Se encuentran principalmente localizados en la zona supraclavicular, torácica y abdominal. Su presencia se ve disminuida con el desarrollo de la obesidad [5].

- Tejido adiposo beige (bAT, por sus siglas en inglés *Beige Adipose Tissue*). Se conocen como adipocitos beige por presentar características similares a los adipocitos blancos, pero funcionalidad de adipocito marrón. Se encuentran en los depósitos de WAT pero presentan mayor número de mitocondrias, vesículas lipídicas que los adipocitos blancos y además expresan marcadores característicos de los adipocitos marrones, como el UCP1, que les permite generar calor por termogénesis al igual que los adipocitos marrones [32]. Se han descrito numerosos mecanismos como los impulsores para la diferenciación y activación de estos adipocitos beige, autores como destacan patologías como la diabetes y las enfermedades metabólicas descrito por Ghaben & Scherer [31].

Los tipos celulares característicos de cada tejido se muestra en la **Figura 4**.



Adipocito blanco

Adipocito beige

Adipocito marrón

Figura 4. Tipos de adipocitos.

El tejido adiposo es la principal **reserva energética** del organismo. En los períodos de sobrecarga de ingesta, los adipocitos almacenarán la energía excedente en forma de grasa mediante el proceso conocido como lipogénesis. En períodos donde la ingesta calórica es escasa y es necesario utilizar la reserva energética, los adipocitos movilizan sus reservas para que puedan ser usadas por el organismo en un proceso conocido como lipólisis.

La **lipogénesis** es el proceso que convierte los carbohidratos, y otros sustratos, en ácidos grasos que serán almacenados como triglicéridos (TG). La lipogénesis tiene lugar en multitud de tejidos y en cada uno de ellos se regula de una manera específica. En el tejido adiposo, juega un papel fundamental en la homeostasis de los lípidos y la glucosa y en la termorregulación. En un estado de obesidad, la actividad lipogénica del tejido adiposo se ve reducida mientras que en el hígado se ve incrementada, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad hepática del hígado graso no alcohólico o NAFLD por sus siglas en inglés *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* [34].

La lipogénesis está regulada por nutrientes y hormonas metabólicas como son la insulina, la glucosa, el glucagón y los glucocorticoides. Cuando los niveles de

glucosa o insulina son elevados en sangre se promueve la captación de glucosa por el tejido adiposo, que será introducida en el citoplasma por el transportador de glucosa (GLUT4) y fosforilado hasta piruvato por la glucoquinasa (GK). En el interior de la mitocondria tendrá lugar la fosforilación del piruvato para dar comienzo al ciclo de Krebs que genera Acetil-CoA que es usado como sustrato por la ácido graso sintasa (FASN) para generar ácido palmítico, el cual será transformado en ácidos grasos saturados (SFA) o monoinsaturados como el esteárico y el oleico [34].

Cuando la concentración de ácidos grasos es elevada, pueden causar lipotoxicidad debido a su actividad como detergente que afectará a la homeostasis ácido-base y generará lípidos bioactivos como las ceramidas y diacilgliceroles que causarán estrés, disfunción y muerte celular. Debido a ello, son almacenados de manera segura e inocua en las reservas lipídicas en forma de TG, siendo el tejido adiposo dónde se almacenan la mayor parte de estos [35]. Cuando la glucosa entra al interior celular por el transportador de glucosa conocido como GLUT4, es fosforilada por la glucoquinasa produciendo glicerol-3-fosfato (G3P) como producto previo al piruvato. El G3P es acetilado para generar ácido lisofosfatídico, el cual se esterificará y transformará en ácido fosfatídico que será dirigido para la síntesis de triacilglicerol (TAG) por la enzima fosfatidato fosfatasa (LIPIN 1) o la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) [34].

Durante el desarrollo de la obesidad, los hepatocitos muestran una translocación de GLUT4 reduciendo la captación de glucosa por el tejido adiposo, y promoviendo la acumulación ectópica de los lípidos y la RI [34].

Aunque los TG representan una forma de almacenar y transportar los ácidos grasos eficiente e inerte, estas moléculas no son capaces de atravesar la membrana celular. Por ello, en condiciones de falta energética, los TG deben hidrolizarse en ácidos grasos libres y glicerol, un proceso que es catalizado por enzimas lipasas y que recibe el nombre de **lipolisis**. Las principales lipasas implicadas son la lipasa sensible a hormonas (HSL) con un papel clave en la degradación de TG y diglicéridos, la monoglicerol lipasa (MGL) y la lipasa de TG del tejido adiposo (ATGL) [35]. La

norepinefrina, es una catecolamina con un papel fundamental en la activación de la lipólisis al activar proteínas quinasas (PKA) que inician el proceso, aunque la insulina es el regulador negativo más relevante [36].

Las alteraciones en la lipólisis están asociadas con el desarrollo de obesidad, diabetes tipo II, NAFLD, cáncer y enfermedades cardíacas, entre otras [35]. La obesidad se asocia con un incremento en la lipólisis debida a una insensibilidad de los adipocitos a la insulina, que actúa como inhibidor de este proceso. Además, la obesidad se relaciona con un estado de inflamación en el que moléculas proinflamatorias como TNF α e IL-6 pueden promover la RI de los adipocitos [36].

Otra de las funciones principales del tejido adiposo es el **aislamiento térmico**. La termogénesis tiene lugar en el tejido adiposo pardo o beige y está activado por el sistema nervioso simpático (SNS). Las neuronas del SNS que inervan el BAT liberan noradrenalina que interactúa con los adrenoreceptores β del adipocito, estimulando la lipólisis intracelular de los TG almacenados, y como consecuencia la síntesis de ácidos grasos. Estos ácidos grasos activan la UCP1 (una proteína transportadora situada en la membrana mitocondrial interna), que estimula el flujo pasivo de protones de vuelta a la matriz mitocondrial desde el espacio intermembrana, disipando el gradiente de protones (H⁺) generado cuando los transportadores de electrones, como el dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) y el dinucleótido de flavina adenina reducido (FADH₂), son transportados a través de la cadena de transporte de electrones [37].

Como ya se ha indicado, el tejido adiposo es un órgano **endocrino** que es capaz de sintetizar y secretar al medio gran cantidad de adipocinas. Intervienen en multitud de procesos biológicos como la regulación de la ingesta calórica, la sensibilidad a la insulina o la inflamación. Pueden actuar de forma local mediante mecanismos autocrinos / paracrinos o modular el metabolismo de órganos como el hipotálamo, el páncreas, el hígado, el músculo esquelético o el sistema inmune mediante un mecanismo endocrino [38].

Algunas de las adipocinas secretadas por el tejido adiposo, así como los mecanismos en los que están implicados, se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Resumen de las principales moléculas secretadas por el tejido adiposo.

Nombre	Función	Referencia
Leptina	Proinflamatorio, anoréxico e incrementa gasto energético.	[29]
TNF α	Proinflamatorio	[5].
HGF	Proinflamatorio	[5]
Resistina	Proinflamatorio, mediador en la RI, incrementa el riesgo de sufrir enfermedades cardiometabólicas.	[29]
Chemerina	Proinflamatorio, adipogénesis y angiogénesis	[39]
IL-1 β	Proinflamatorio, apoptosis células β (\uparrow IR)	[5].
IL-6	Proinflamatorio	[5].
IL-8	Proinflamatorio	[5].
Adiponectina	Antiinflamatorio, promueve captación de glucosa muscular e inhibe producción glucosa hepática	[29]
IL-4	Antiinflamatorio	[5].
IL-10	Antiinflamatorio	[5].
IL-13	Antiinflamatorio	[5].
IL-19	Antiinflamatorio	[5].

Factor de necrosis tumoral (TNF), Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Interleucina (IL)

La secreción de citoquinas proinflamatorias está relacionada con la progresión del síndrome metabólico (MetS) y el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer. La sobreexpresión de TNF α y leptina inhibe la expresión del receptor de la insulina generando RI en músculo e hígado, entre otras [5].

Los niveles de leptina son directamente proporcionales a la acumulación de grasa corporal. En condiciones normales, la leptina suprime la ingesta de alimento y estimula el gasto energético, así como controla la homeostasis de la glucosa y la IR. En un estado de exceso de ingesta o acumulación de energía en forma de grasa, los niveles de leptina se incrementan para contrarrestar el desequilibrio metabólico,

pero normalmente se desarrolla una resistencia a la leptina en los tejidos por lo que no responden ante ella. La leptina también supone la activación de la respuesta inmune proinflamatoria por lo que se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas derivadas [39].

La adiponectina juega un papel clave en la respuesta inflamatoria ya que inhibe la citoquina $TNF\alpha$, y previene la RI [40]. Presenta efectos antiinflamatorios, antiaterogénicos y antidiabéticos por interferir en la activación de la vía NF-KB e incrementar la sensibilidad a la insulina [39].

1.1.4.1 Alteraciones asociadas al tejido adiposo disfuncional

Inflamación: La obesidad supone un incremento en el tamaño de los adipocitos, que desencadena la liberación de ácidos grasos, especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6 o la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) que reclutará monocitos en el tejido adiposo inflamado, los cuales se convertirán en macrófagos que liberarán citoquinas proinflamatorias al medio, contribuyendo al estado inflamatorio característico de la obesidad [21]. La obesidad también supone un incremento en la permeabilidad intestinal, que deriva en un incremento en la absorción de lipopolisacáridos (LPS) secretados por el microbioma, que promueven el estado inflamatorio [41].

Lipotoxicidad: La liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo supone una acumulación de estos de forma visceral en hígado, páncreas, corazón y otros órganos. Esta grasa acumulada de forma ectópica, incrementa la concentración de productos derivados como son las ceramidas o el diacilglicerol (DAG) que promueven el estrés oxidativo mediante la liberación de ROS, inflamación y apoptosis [21].

Disfunción mitocondrial: Una mitocondria disfuncional supone la pérdida de la integridad y función, lo que deriva en una imposibilidad para generar energía, causando alteraciones y daños en el metabolismo [42]. El exceso de TG está estrechamente relacionado con una alteración mitocondrial, principalmente en las mitocondrias del tejido adiposo, hígado y músculo. En el tejido adiposo de personas

obesas, los marcadores de fusión de las mitocondrias están inhibidos, mientras que los marcadores para la fisión están incrementados [43]. La fisión supone una división de la mitocondria en dos orgánulos esféricos disfuncionales con menor capacidad para producir energía. Este proceso conlleva daño en el ADN mitocondrial, que altera la producción de energía, genera ROS induciendo estrés oxidativo y apoptosis [42]. La apoptosis disminuye el número de mitocondrias lo que conlleva un descenso en el gasto energético, incrementando aún más la acumulación lipídica [21]. En las personas con obesidad las mitocondrias presentan una morfología y biogénesis alterada, una producción de peróxidos aumentada y una oxidación incompleta de los ácidos grasos que genera la producción de DAG, acetyl CoA y ceramidas. Todo esto deriva en un incremento en la concentración de ROS que causa daño en el ADN, lípidos, proteínas y enzimas de la cadena respiratoria [44].

Especies reactivas del oxígeno (ROS): Los mecanismos antioxidantes endógenos más relevantes son la actividad de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) junto con minerales (Se, Mn, Cu y Zn), vitaminas (A, C y E) y biomoléculas (glutatión, bilirrubina y ácido úrico) con capacidad antioxidante. En individuos sanos estas enzimas, junto con las moléculas antioxidantes, son capaces de regular los niveles de radicales libres contribuyendo en el mantenimiento del estado redox del organismo. [45]. Sin embargo, la acumulación excesiva de grasa promueve la producción de ROS debido a una disfunción mitocondrial como se ha explicado anteriormente, o por un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa (NOX) de la membrana plasmática. En un tejido adiposo funcional, NOX4 es estimulada por la insulina generando H₂O₂ que inhibirá la proteína tirosina fosfatasa PTP1B (inhibidor del efecto de leptina e insulina) e incrementará la señalización de la insulina. Un incremento en la concentración de glucosa y ácidos grasos supone un incremento en la producción de ROS por parte de NOX los que supone una reversión en la inhibición de PTP1B contribuyendo a la RI [46]. Una sobreproducción de ROS por cualquiera de estas vías supone un incremento del estrés oxidativo, que activarán factores de transcripción como el NF-KB que incrementarán la producción de citoquinas proinflamatorias. Un

exceso en la acumulación de ROS también promueve la activación de la cascada serina/treonina (Ser/Thr) que contribuirá a la RI [21].

1.1.5 La obesidad como factor de riesgo para el desarrollo de otras patologías.

La obesidad es el principal factor de riesgo para el aumento de las enfermedades metabólicas [47]. Como ya se ha comentado, un tejido adiposo disfuncional se caracteriza por una hipertrofia de los adipocitos que además secreta y sintetiza factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF α), IL-6, leptina y resistina, mientras que se inhibe la síntesis de adiponectina y omentina con efecto antiinflamatorio [13]. La omentina ha sido reconocida recientemente como un importante mediador en el desarrollo de patologías derivadas de la obesidad como la diabetes. Se ha descrito que el nivel circulante de esta citoquina en el plasma de pacientes obesos se ve reducido lo que desencadena un mayor estado inflamatorio, un desajuste en la captación de glucosa y RI promoviendo el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas [48,49].

El estado proinflamatorio que desencadena la obesidad a causa de la lipotoxicidad, la RI, y cambios en el microbioma se relacionan con el desarrollo de multitud de enfermedades como aterosclerosis, hipertensión, dislipemia, coagulación, disfunción endotelial [50]. Como consecuencia las personas con obesidad presentan mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II o la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) [19].

1.1.5.1 Resistencia a la insulina (RI)

La RI se define como la disminución de la acción de la insulina sobre sus tejidos diana como son el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo, y por consiguiente disminuye el ingreso de glucosa a las células y por tanto la capacidad para producir energía, viéndose afectadas y sus funciones fisiológicas [5]. Además, la insulina está implicada en la promoción de la lipogénesis, inhibe gluconeogénesis, glucogenólisis y previene la lipólisis o catabolismo de las proteínas [51]. La acción de la insulina se

basa en la unión a sus receptores situados en la superficie celular del músculo esquelético, tejido adiposo o el hígado, lo que promueve la auto fosforilación del receptor y la fosforilación del sustrato (IRS) que activa proteínas quinasas AKT o PKB y estas reclutarán el transportador de glucosa (GLUT-4) a la membrana plasmática para facilitar la captación de la glucosa hacia el interior celular [5]. Cuando las células no responden adecuadamente a la insulina, los niveles de glucosa en sangre aumentan, y por consiguiente las células β pancreáticas vuelven a secretar más insulina para compensar los niveles altos de glucosa en sangre, lo cual es el comienzo de un círculo vicioso que dará lugar a la RI [21]. La hiperglicemia derivada de la RI produce apoptosis de las células β debido a efectos glucotóxicos [5].

Como ya se ha indicado, una acumulación excesiva de TG incrementa la concentración de ceramidas, el diacilglicerol o ácidos grasos de cadena larga, los que inducen la activación de quinasas como PKC o JNK y, por consiguiente, la fosforilación de IRS por la acción de Ser/Thr, inhibiendo la normal estimulación de la insulina mediante la tirosina. Lo que resulta en un desacoplamiento en la señalización de la insulina. Los ácidos grasos activan la NADPH oxidasa e inducen la producción de ROS lo que deriva en un incremento del estrés oxidativo y aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias. Esto contribuirá al desarrollo de la RI al estimular las quinasas JNK, y a la inhibición la fosforilación de los IRS por efecto de la insulina, lo que dará lugar a una inhibición de la traslocación de GLUT-4 a la membrana plasmática [21,51].

Ciertas adipoquinas como la adiponectina o la leptina pueden regular la función de las células β , y el metabolismo de la glucosa. La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina para activar la fosforilación de IRS. La leptina promueve la sensibilidad a la insulina en el tejido periférico y promueve la translocación de GLUT4 del citosol a la membrana para incrementar la captación de glucosa. La obesidad se relaciona con bajos niveles de adiponectina, pero altos niveles de leptina, debido seguramente a una resistencia a la misma [5]. Además, la leptina inhibe la secreción de la insulina y disminuye la función de las células β [52].

1.1.5.2 Diabetes mellitus tipo II

Es una enfermedad crónica causada por un uso ineficiente de la insulina para captar la glucosa en sangre, produciendo hiperglucemia mantenida en el tiempo y que finalmente derivará en diabetes. Según el Instituto para la diabetes y enfermedades digestivas o hepáticas de Estados Unidos (NIDDK), existen cuatro tipos de diabetes [53]:

- Prediabetes: aparecen altos niveles de glucosa en sangre mayores de lo habitual, pero aun así no suficientemente altos como para el diagnóstico de diabetes. Este tipo de patología predispone al paciente a sufrir diabetes tipo II en el futuro.
- Diabetes tipo I: el organismo no produce insulina debido entre otros factores, a que el propio sistema inmune del individuo destruye las células pancreáticas que la producen. Suele manifestarse en edades tempranas.
- Diabetes tipo II o DMT2: el organismo no produce o es insensible a la utilización de la insulina. Suele aparecer en personas de mediana edad o edad avanzada.
- Diabetes gestacional: aparece en algunas mujeres durante el segundo o tercer trimestre de gestación, y suele desaparecer tras ella.
- Diabetes tipo III: la asociación de la diabetes tipo II con la enfermedad del Alzheimer se conoce como diabetes tipo III [54]. La diabetes es un factor de riesgo en el desarrollo de demencia. La diabetes y la RI se han asociado con un déficit cognitivo, un menor volumen cerebral con menor plasticidad e incrementa la probabilidad de desarrollar Alzheimer.

Para el diagnóstico de la resistencia a la insulina o la diabetes se utiliza la determinación de la glucemia basal donde se mide la glucosa en sangre en ayunas, la prueba de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) para lo que se toma una muestra de sangre en ayunas y otras dos tras la ingesta de 75g de glucosa, y por último la prueba de la hemoglobina glicosilada cuya concentración es mayor a medida que incrementa la glucosa (valores mayores al 6,5 % de hemoglobina glicosilada

corresponderían con una situación de diabetes). Los valores de referencia se presentan en la **Tabla 2** [53].

Tabla 2. Valores de referencia de glucosa en sangre para el diagnóstico de diabetes [53].

	Glucemia basal	Glucemia tras 2h de TTOG
Parámetros normales	< 99 mg/dL	< 139 mg/dL
Prediabetes	100-125 mg/dL	140-199 mg/dL
Diabetes	>126 mg/dL	>200 mg/dL

Según la OMS más del 95% de las personas diagnosticadas con diabetes son del tipo II y su aparición es mayor en personas con sobrepeso u obesidad. En el informe mundial sobre la diabetes publicado por la OMS se pone de manifiesto el alarmante incremento de la población afectada por esta patología. Concretamente, desde 1980 la prevalencia de esta enfermedad ha ascendido a casi el doble en la población adulta, llegando a afectar a 422 millones de personas en el 2014. Asociado al incremento de sus factores de riesgo como son la obesidad y el sobrepeso [55].

La obesidad incrementa la RI y la intolerancia a la glucosa que son las alteraciones metabólicas presentes en la diabetes tipo II. El incremento de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-18), y de leptina circulante, así como una disminución en los niveles de adiponectina se asocian con una menor sensibilidad a la insulina y por tanto es un predictor del desarrollo de DMT2 [56]. La **Figura 5** desarrollada por Jin et al. [5], muestra las distintas rutas por las que la obesidad induce la RI y el desarrollo de diabetes mellitus tipo II.

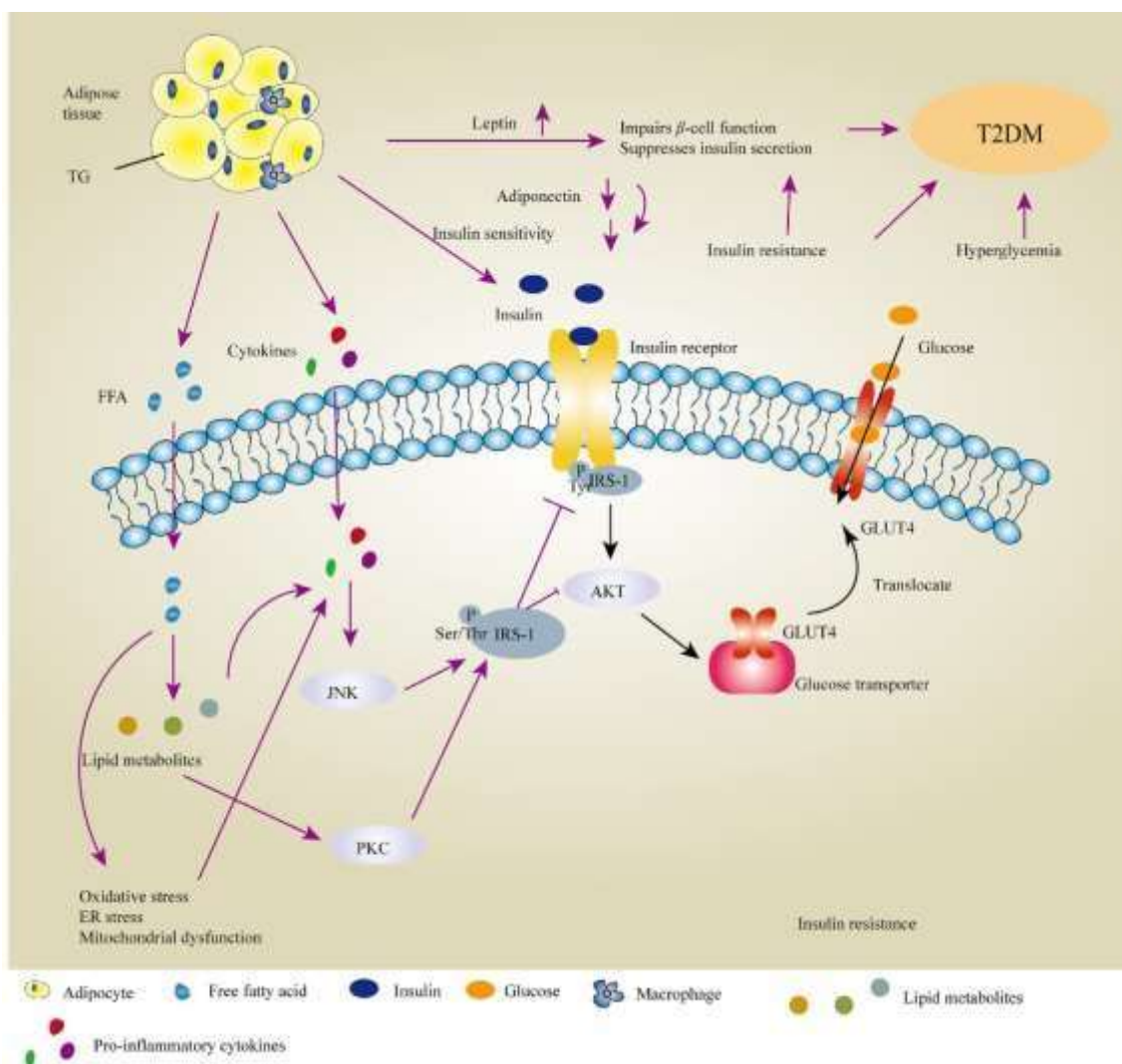


Figura 5. Efecto de la obesidad sobre el desarrollo de la RI y DMT2 [5].

1.1.5.3 Enfermedades cardiovasculares (CVD)

Los accidentes cardiovasculares, la insuficiencia cardíaca o infarto agudo de miocardio, se deben principalmente a la generación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro o el corazón, obstruyendo el flujo de sangre hacia estos órganos. Entre los principales riesgos asociados al desarrollo de esta enfermedad se encuentran una dieta desequilibrada, la falta de actividad física y el consumo de tabaco y alcohol. Además, la probabilidad de desarrollar esta patología se incrementa en personas que presentan obesidad o sobrepeso, hipertensión, hiperglucemia o hiperlipidemia [57].

Se trata de la principal causa de muerte a nivel mundial. La OMS estima que solo en el año 2015 murieron 17.7 millones de personas debido a esta patología. Las

enfermedades cardiovasculares producen mayor número de defunciones en la población con ingresos bajos o medios [57]. El Instituto Nacional de Estadística (INE) atribuye que el 27,1% de las defunciones que se produjeron en la primera mitad del año 2023 en España se debieron a enfermedades del sistema circulatorio [58].

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado una fuerte correlación entre el desarrollo de CVD y la obesidad, considerando que entre el 35% y el 45% de las personas que han sufrido un infarto agudo de miocardio eran obesas o sufrían sobrepeso [5].

La localización dónde se acumula el tejido adiposo es muy relevante, ya que la grasa visceral produce graves efectos adversos en la salud, mientras que la subcutánea se considera neutral [29]. Por tanto, el incremento de acúmulos de grasa de forma visceral alrededor del corazón supone un incremento en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, específicamente aquella que rodea las arterias coronarias, conocida como tejido adiposo perivascular o PVAT, por sus siglas en inglés *PeriVascular Adipose Tissue* [59]. PVAT está reconocida como un elemento clave en la regulación local de la función o disfunción vascular, debido a su proximidad a la pared vascular y su habilidad para interactuar con el sistema vascular [5]. En pacientes sanos, la adrenalina liberada por el sistema nervioso simpático activa los adrenoreceptores β_3 de los adipocitos, los cuales activan la liberación de adiponectina que presenta efectos como vasodilatador. Con el desarrollo de la obesidad, el sistema nervioso simpático se encuentra sobreestimulado y los adrenoreceptores β_3 se vuelven resistentes a la adrenalina, por lo que disminuye la liberación de adiponectina, lo que contribuye a incrementar la presión sanguínea [40].

El tejido cardíaco es capaz de regular la concentración de WAT mediante la liberación de una hormona conocida como factor natriurético auricular (ANP) que promueve la lipólisis de WAT. También ejerce un efecto antiinflamatorio al inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α . En pacientes obesos la concentración de ANP es más baja que en pacientes con normopeso [5]. La

acumulación visceral de ácidos grasos libres en el cardiomiocito incrementa la síntesis de ROS vía oxidación de los ácidos grasos libres desencadenando una disfunción mitocondrial [60].

La obesidad también supone una disminución en el contenido de BAT que, junto con el estado de inflamación, derivan en una menor expresión de la proteína UPC-1 que se asocia con un incremento de estrés oxidativo del tejido adiposo, alterando la comunicación con las células circulantes del sistema cardiovascular. Esto afecta directamente a la funcionalidad cardiovascular ya que el tejido adiposo pardo secreta citoquinas como el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), IL-6 y el factor de crecimiento A del endotelio vascular (VEGFA) que muestran un efecto protector en el sistema cardiovascular [61]. BAT también ejerce un efecto vaso protector al regular la contracción vascular [5].

La presión sanguínea en el organismo está regulada principalmente por el sistema renina-angiotensina-aldosterona. La activación del receptor de angiotensina II induce que el WAT subcutáneo se diferencie en bAT incrementando la expresión de UPC-1. La conversión de angiotensina II a angiotensina 1-7 produce termogénesis de BAT y lipólisis de WAT, además de promover un efecto vasodilatador mejorando la presión sanguínea y disminuyendo el riesgo de sufrir CVD [62]. Altos niveles de ácidos grasos libres, así como del ion superóxido o leptina causan vasoconstricción y aumento de la presión sanguínea mediante un incremento de la actividad del sistema nervioso simpático [5].

Con el desarrollo de la obesidad, los TG que se acumulan de forma ectópica, han de ser transportados vía sanguínea unidos a lipoproteínas de baja densidad (LDL), que pueden atravesar la pared arterial y producir inflamación. Estas LDL pueden oxidarse debido a la alta concentración de ROS que se producen como consecuencia de la obesidad, de manera que las LDL oxidadas son atrapadas por los macrófagos formando células espumosas (*foam cells*) promoviendo lesiones ateroscleróticas. Las citoquinas proinflamatorias secretadas por el tejido adiposo promueven la migración de macrófagos al tejido, incrementando la unión a las LDL y el número de *foam cells*

[5] iniciando o contribuyendo a la formación de placas de ateroma. La adiponectina inhibe la expresión para reclutar macrófagos, por lo que contribuye a reducir la formación de *foam cell*. Se ha observado que las personas con una baja concentración de adiponectina presentan mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares [5]. Por otra parte, las adipocinas, los ácidos grasos libres y los iones superóxido secretados por un tejido adiposo disfuncional activan la actividad del sistema nervioso simpático, lo que desencadena hipertensión, una hipertrofia del ventrículo izquierdo y un aumento del gasto cardíaco (**Figura 6**) [5].

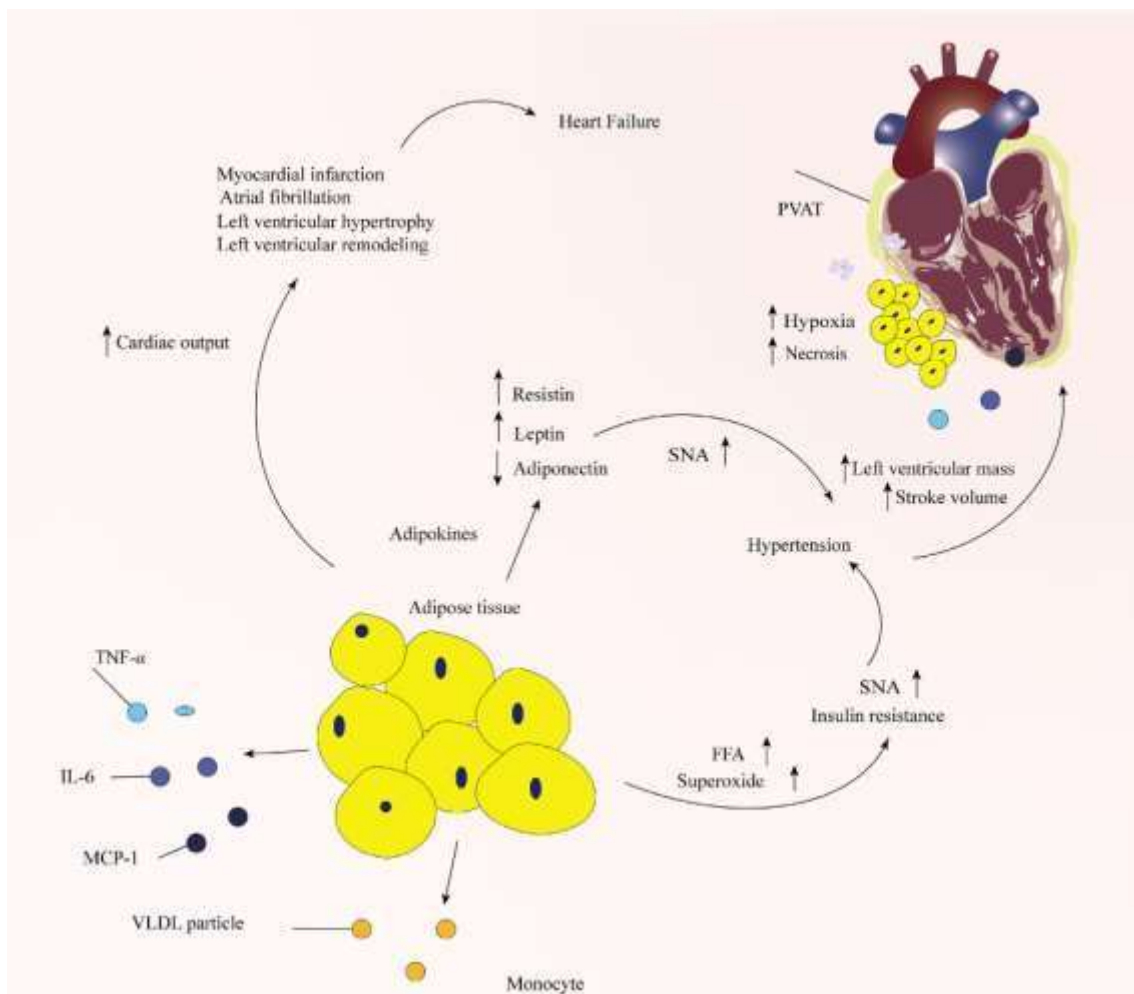


Figura 6. Efecto de la obesidad en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [5].

1.1.5.4 Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)

La enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD), antes conocida como enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA o NAFLD por sus siglas en inglés, non – alcoholic fatty liver disease) se define como una

excesiva acumulación de grasa hepática, no relacionada con el consumo de alcohol, sino que esta acumulación se debe principalmente a la disfuncionalización del tejido adiposo que causa una ineficiencia a la hora de almacenar TG en respuesta a un incremento de la ingesta calórica. El organismo entonces acumula estos lípidos en otros órganos como el hígado, causando lipotoxicidad que termina en una RI y una respuesta inflamatoria del mismo (incremento de los niveles de TNF- α , IL-6...) [56]. Además, esta patología está directamente relacionada con enfermedades cardiovasculares y DMT2 [50] encontrándose altamente afectada por el desarrollo de la obesidad [5].

La NAFLD es una enfermedad del hígado caracterizada por presentar esteatosis en más de un 5% de sus hepatocitos, en ausencia de alcohol [63]. Existen dos tipos de NAFLD: esteatohepatitis no alcohólica o NASH (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*) y el hígado graso no alcohólico o NAFL (*NonAlcoholic Fatty Liver*). Se diferencian según el nivel de daño hepático, generalmente en NAFL existe acumulación de grasa, pero no presenta inflamación en el hígado mientras que NASH además de presentar acumulación de grasa en el hígado, éste está inflamado y aparecen daños en células hepáticas pudiendo causar lesiones mayores como cirrosis o cáncer [64,65].

La prevalencia de esta enfermedad se ha incrementado en los últimos años, a la par que el incremento en obesidad y diabetes. Se estima que el 32% de la población mundial adulta está afectada por NAFLD y que tanto la incidencia como la prevalencia es mayor en hombres que en mujeres [66], aunque hay que tener en cuenta la falta de estudios sobre esta enfermedad en la población de África, Oceanía, o Sudamérica [67]. En Europa varios estudios han determinado la prevalencia en torno al 30%, en concreto el metaanálisis realizado por Riazi et al. [66] estima que el 32.6% de la población europea está afectada por NAFLD. En concreto, Turquía es la que mayor prevalencia presentaba con un 48.4%, seguido de Italia con 38.2%, Alemania, Portugal y España con una prevalencia entre el 25 y el 27% [67]. Sin embargo, el estudio realizado por Estes et al. [68] estima que en el año 2030 la mayor prevalencia de NAFLD será para Italia con 29.5%, seguido de España (27.6%),

Alemania (26.4%), Reino Unido (24.7%) y Francia (23.6%). Concretamente, en España se estima un incremento en el número de casos de NAFLD de 10.5 millones en 2016 a 12.7 millones en 2030 [67].

Entre los factores de riesgo que se asocian a esta enfermedad, el mayor de ellos es la presencia de MetS. La asociación entre estas enfermedades es bidireccional, es decir, el desarrollo de NAFLD también es un importante factor de riesgo para el desarrollo del MetS [65], además, la NAFLD se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico.

La fisiopatología de NAFLD es compleja y heterogénea, influenciada por múltiples factores como la lipotoxicidad, el estrés oxidativo, la inflamación y disbiosis de la flora intestinal, que se retroalimentan entre sí y conllevan a una alteración en la histología y bioquímica del hígado [64]. El incremento de ácidos grasos libres en el hígado puede ser causado por el transporte venoso de estos ácidos grasos libres originados en el tejido adiposo mediante lipólisis de los TG, o por la lipogénesis *de novo* a partir de glucosa o fructosa procedente de la dieta [65]. Se ha descrito que la lipogénesis hepática está sobre expresada en pacientes que presentan obesidad, lo que favorece la acumulación de ácidos grasos, y el desarrollo de cirrosis y NASH [34], así como la liberación de ceramidas, diacilglicerol y ROS [64] con el consiguiente estrés oxidativo, muerte de hepatocitos, y con probabilidad de desarrollo de cirrosis y finalmente, cómo último estadio, puede llegar a desarrollarse un carcinoma hepatocelular [65]. El proceso por el cual un exceso de ácidos grasos libres produce lipotoxicidad y apoptosis en los hepatocitos queda resumido en la **Figura 7**.

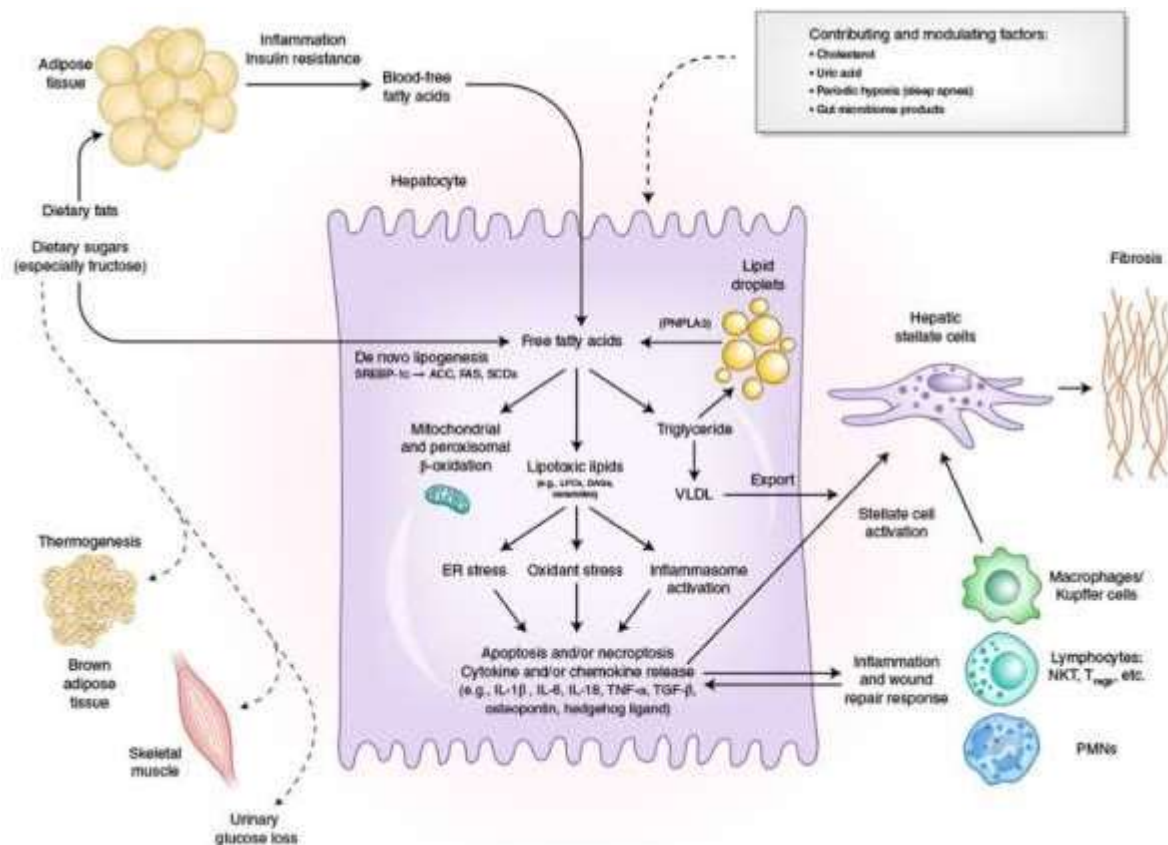


Figura 7. Esquema del daño inducido por una sobrecarga energética en el hígado [65].

La RI es otro factor que contribuye al desarrollo de esta patología. La activación de la lipólisis de los ácidos grasos en el tejido adiposo por medio de la insulina, produce un desajuste en la regulación de la lipólisis, derivando en un exceso de ácidos grasos en el hígado [65]. El aumento de la expresión del factor de transcripción SREBP-1b, por sus siglas en inglés *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*, juega un papel fundamental en la adipogénesis *de novo*; incrementando la captación de glucosa y ácidos grasos libres en el hígado mediante la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos libres vía PPAR α [64]. La insulina puede ocasionar un incremento de ROS y fibrosis hepática, lo que produce una disfunción mitocondrial y la activación del factor nuclear kappa B (NF-KB) que promueve la expresión de genes proinflamatorios en el hígado [64].

Las ROS juegan un papel fundamental en la proliferación y migración celular, así como en la fibrosis hepática producida en NAFLD. El estrés oxidativo puede ser causado por una producción excesiva de ROS en el hígado los cuales inhibirían la

producción de enzimas antioxidantes como la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). La activación de NADPH oxidasa, producirá NOX2 siendo la mayor responsable de la producción de ROS [64,69].

Las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo visceral juegan un papel clave en la progresión de NAFLD. La adiponectina disminuye la concentración de lípidos en el hígado mediante la activación de la lipoproteína lipasa en el WAT lo que promueve la captación de TG por parte del tejido adiposo blanco y reduce su acumulación en el hígado. También contribuye a la activación PPAR α que promueven el consumo energético disminuyendo la acumulación de TG en otros tejidos. La leptina por otra parte tiene una doble función, puede actuar inhibiendo la lipogénesis *de novo*, estimulando la oxidación de los ácidos grasos y reduciendo su acumulación en el hígado, o bien, puede causar fibrosis hepática al promover un estado inflamatorio [5].

También se ha encontrado una fuerte correlación entre cambios en el microbioma y el desarrollo de NAFLD. Alteraciones hacia el aumento de determinadas poblaciones microbianas en la microbiota, incrementan la permeabilidad intestinal, permitiendo la translocación de bacterias y sus productos al sistema circulatorio y al hígado. Se incrementa la concentración de bacterias gramnegativas y por consiguiente de lipopolisacárido (LPS) producido por las mismas que dan lugar a un aumento en los niveles de ROS en el organismo. Los LPS también activan los receptores de TNF α en las células de Kupffer desencadenando inflamación en el hígado [64]. Se han encontrado diferencias entre el microbioma fecal de pacientes obesos con el microbioma de pacientes normo peso, en concreto, aparecen o se incrementan bacterias que inducen inflamación o que producen metabolitos que pueden interferir en procesos metabólicos como el butirato, propionato y el acetato [50].

1.1.5.5 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SMet) es una condición patológica caracteriza por la presencia de anomalías metabólicas como hipertensión, obesidad abdominal, RI e hiperlipidemia [70,71], donde otros autores también incluyen en esta definición

alteraciones como un estado protrombótico y proinflamatorio [72]. En el año 2005 la asociación internacional para la diabetes (IDF) y la asociación americana del corazón junto con el instituto nacional del corazón, pulmón y sangre (AHA/NHLBI) recopilaron los parámetros que se deben tener en cuenta para el diagnóstico del SMet y que se recogen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Factores para diagnosticar el MetS, definidos por la asociación IDF y AHA/NHLBI [73].

		Hombres	Mujeres
Circunferencia cintura	IDF	>94 cm	>80 cm
	AHA/NHLBI	>102 cm	>88 cm
Colesterol HDL		< 40 mg /dL ⁽¹⁾	< 50 mg /dL ⁽¹⁾
Glucosa en sangre		> 5.6 mmol/L (100 mg /dL) ⁽²⁾	
TG en sangre		> 1.7 mmol/L (< 150 mg /dL) ⁽³⁾	
Presión sanguínea		135/ 85 mmHg ⁽⁴⁾	

Se incluyen aquellos que estén en tratamiento frente al colesterol HDL bajo ⁽¹⁾, los TG en sangre altos ⁽³⁾, o la presión sanguínea alta ⁽⁴⁾, o bien hayan sido diagnosticado con diabetes mellitus ⁽²⁾

Aun así, hay parámetros en los que ambas asociaciones no coinciden. Por ejemplo, la IDF recoge la obesidad abdominal como requisito indispensable para el diagnóstico, mientras que el AHA/NHLBI no lo considera. La IDF considera una circunferencia de la cintura relativo a un IMC de 25kg/m², mientras que los valores de circunferencia de cintura establecidos por la AHA/NHLBI correspondiente a un IMC de 30kg/m² [73].

Aunque existen genes asociados al desarrollo del SMet, se consideran un componente minoritario, es el factor epigenético el que tiene todo el peso sobre su desarrollo [71]. La obesidad se ha considerado un factor de riesgo e incluso un requisito inicial en el desarrollo del SMet. La inflamación crónica, la lipotoxicidad y la RI que juegan un papel fundamental en el inicio, progresión y transición del SMet [70]. La fisiopatología del SMet comprende diversos mecanismos que deben ser aun completamente elucidados. Entre los mecanismos principales implicados en su desarrollo se sabe que las ROS juegan un papel fundamental. Los pacientes con SMet presentan menor concentración de enzimas antioxidantes en plasma y mayor concentración de biomarcadores de daño oxidativo que individuos sanos lo que supone mayor concentración de ROS contribuyendo al estrés oxidativo [74]. Un

exceso en la ingesta de lípidos, carbohidratos o ácidos grasos saturados activan vías intracelulares como la fosforilación, la autooxidación de gliceraldehídos o la proteína quinasa C que generan iones superóxido que promueven el estado de estrés oxidativo [75]. Como ya hemos mencionado anteriormente la obesidad también supone un incremento en la actividad de NOX y estrés del retículo endoplasmático, así como una activación de factores de transcripción proinflamatorios como el NF-KB sensibles a ROS, que promueve la liberación de citoquinas inflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6 que a su vez inducen la liberación de ROS, convirtiéndose en un ciclo que se retroalimenta. Por tanto, la generación de ROS promueve el desarrollo del SMet (**Figura 8**) mientras que las adipoquinas que mayor implicación tienen sobre el desarrollo de esta patología son la leptina, chemertina, IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α cuya concentración se ve incrementada, mientras que la adiponectina, omentina e IL-10 reducida [39].

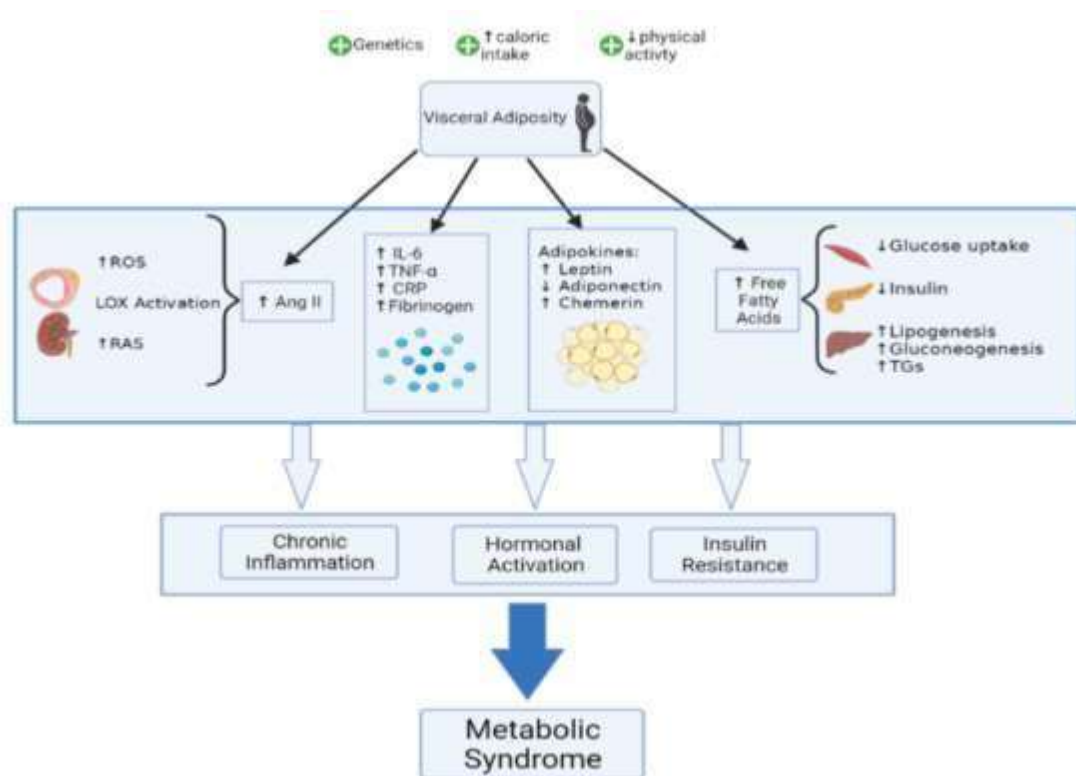


Figura 8. Mecanismos implicados en el desarrollo del SMet Fahed et al., (2022).

1.1.6 Tratamientos

Según la OMS la prevalencia del sobrepeso, obesidad y las enfermedades no transmisibles vinculadas pueden prevenirse mediante la realización de ejercicio físico de forma periódica y una alimentación saludable, reduciendo la ingesta de grasas (saturadas) y azúcares (refinados principalmente) y aumentando el consumo de frutas, verduras, legumbres, cereales integrales y frutos secos (OMS, 2021).

Entre los tratamientos para la obesidad destacan la pérdida de peso mediante un incremento en la actividad física diaria, cambios en la alimentación, cirugía bariátrica o intervenciones farmacológicas [5,41,76]. La pérdida de peso solo ocurre cuando el gasto energético es mayor que la ingesta calórica. Los principales mecanismos fisiológicos que hay que tener en cuenta son: i) el control del apetito, ii) restricción de la absorción lipídica, iii) antiadipogénesis, iv) antilipogénesis, v) movilización lipídica, vi) antiinflamación y vii) modulación de la microbiota [77].

1.1.6.1 Tratamiento quirúrgico

La cirugía bariátrica es una intervención médica eficaz para la pérdida de peso. No obstante, solo se aplica en pacientes con un IMC ≥ 35 . La pérdida de peso alcanzada no es la misma en todos los casos, varía según el tipo de técnica utilizada, así como de la edad, el género, la relación con la alimentación y factores antropométricos, psicológicos o económicos. Se ha evidenciado que una considerable proporción de pacientes no experimentan la pérdida de peso esperada, o sufren un efecto rebote, tras la cirugía [78]. La cirugía bariátrica para promover la pérdida de peso también es usada en el tratamiento frente al NAFLD, ya que se ha demostrado en varios estudios que la pérdida de peso mejora notablemente esta patología, sin embargo, al ser una técnica invasiva solo se aplica en determinados pacientes [50].

1.1.6.2 Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos actualmente aprobados por la FDA y usados en el tratamiento de la obesidad se resumen en la **Tabla 4**. A excepción del orlistat, liraglutide y el semaglutide, el resto de los fármacos aprobados actúan a través del sistema nervioso central reduciendo el apetito o generando sensación de saciedad.

Tabla 4. Medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad [5,45].

Nombre	Acción	Aprobación	Efectos secundarios
Semaglutide	Agonista del GLP-1	2021	Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, fatiga e hipoglucemia en pacientes diabéticos
Setmelanodite	Simpatomimético	2020	Dolor de cabeza, náuseas, diarrea, dolor abdominal e hiperpigmentación de la piel.
Liraglutide	Agonista del GLP-1	2014	Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal.
Bupropion/ Naltrexona	Hipotalámica	2014	Náuseas, diarrea, dolor de cabeza, palpitaciones, presión sanguínea elevada transitoria.
Topiramate/ Phentermin	Simpatomimético.	2012	Insomnio, ansiedad, depresión, pensamientos suicidas y ansiedad.
Rimonabant	Bloqueador del receptor CB1	2006	Depresión y pensamientos suicidas
Orlistat	Inhibidor de la lipasa pancreática	1999	Daño hepático, incontinencia fecal, deficiencia vitamínica.
Sibutramine	Simpatomimético	1997	Infarto de miocardio
Cathin hidroclorito	Simpatomimético	1975	Taquicardia, incremento de la presión arterial.
Fenfluramine	Simpatomimético	1973	Insuficiencia cardíaca
Phentermine	Simpatomimético	1959	Palpitaciones y elevada presión sanguínea

El orlistat es un inhibidor de la lipasa pancreática, el liraglutide y el semaglutide son agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) que ejercen un efecto reductor sobre la concentración de glucosa, así como de la ingesta calórica debido a un incremento en la saciedad. El liraglutide y el semaglutide son los únicos medicamentos cuya administración se ha aprobado de forma inyectable, el resto se administran por vía oral. La naltrexona/bupropion actúa a nivel hipotalámico promoviendo la saciedad al estimular la hormona estimulante de melanocitos que reduce la ingesta calórica e incrementa el gasto energético. El Phentermine/Topiramate ha demostrado efecto sobre la pérdida de peso al estimular la liberación de noradrenalina y suprimir el apetito. El setmelanotide es un agonista

del receptor de melanocortina (MC4R) que actúa en el núcleo paraventricular del hipotálamo e inhibe el apetito [45].

Aunque están aprobados por la FDA, muchos de ellos muestran multitud de efectos secundarios, e incluso otros han sido retirados del mercado [79]. Por ejemplo, la combinación de Phentermin/Topiramate ha sido rechazada por la Agencia Europea del Medicamento por sus efectos secundarios sobre la salud cardiovascular y mental [45]. Mayores problemas gastrointestinales se han encontrado en pacientes que tomaban liraglutide o semaglutide que en aquellos que tomaban el placebo [80,81]. El orlistat además de generar problemas gastrointestinales, supone una alteración en la adsorción de vitamina E (α -tocoferol) y vitamina D [82].

Existen otros fármacos que ayudan a revertir las alteraciones metabólicas derivadas de la obesidad. Por ejemplo, entre las estrategias terapéuticas utilizadas en el tratamiento frente al NAFLD encontramos inhibidores del transportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2), que promueven la secreción de glucosa en la orina, contribuyendo a disminuir los niveles de glucosa en sangre y mejorando la IR. Los receptores agonistas del GLP-1, simulan el mismo efecto del GLP-1 promoviendo la secreción de insulina, inhibiendo el glucagón por lo que producen saciedad, reduciendo así la ingesta calórica. Receptores agonistas de ácido biliar como cilofexor, nidufexor y pifexor han demostrado una efectividad en la reducción del contenido graso del hígado, el ácido obeticólico (OCA) además consigue reducir la fibrosis del hígado. Por último, los agonistas del PPAR como pioglitazone (agonista de PPAR γ) sensibilizador de la insulina que ha demostrado recientemente una significativa reducción de NASH y fibrosis hepática. Sin embargo, todos ellos presentan efectos secundarios [50].

Debido a todas estas consecuencias o efectos secundarios de estos fármacos se ha producido la búsqueda de nuevas alternativas que cumplan satisfactoriamente los términos de eficacia, seguridad y duración en el tratamiento de la obesidad. En los últimos años se ha evidenciado el potencial efecto beneficioso de moléculas de origen natural, provenientes de extractos vegetales o moléculas aisladas de estos sobre el

desarrollo de la obesidad, siempre y cuando se combine con un estilo de vida saludable [23].

1.1.6.3 Tratamientos no farmacológicos

A pesar de la gran variedad de tratamientos e intervención quirúrgica existentes, una modificación en el estilo de vida como cambios en la dieta o reducción del sedentarismo, son actualmente consideradas como la mejor terapia para la pérdida de peso, así como para el mantenimiento del peso perdido [83]. Tanto una dieta equilibrada con restricción calórica como la realización de ejercicio físico conllevan una notable reducción en la cantidad de tejido adiposo visceral (VAT) y en la acumulación de grasa en el hígado, independientemente de la edad, el sexo o la raza [84].

También se ha reportado que la principal terapia frente al desarrollo del SMet o NAFLD suponen modificaciones del estilo de vida, principalmente modificaciones nutricionales y de actividad física [50,85]. La actividad física ha demostrado ser una herramienta efectiva en la reducción del peso corporal, mejorando la RI periférica en pacientes con SMet [85]. Se ha demostrado una potente asociación entre los distintos tipos de dietas y el riesgo de desarrollar SMet, en concreto una dieta saludable está asociada a un menor riesgo de desarrollar esta patología, mientras que una dieta alta en grasas, consumo de alcohol y alimentos procesados se asocia con un alto riesgo de desarrollar SMet [70].

1.1.6.3.1 Dieta

La alimentación juega un papel fundamental sobre el estado de salud. Una dieta desequilibrada supone un riesgo importante en el desarrollo de enfermedades no transmisibles (ENT), principalmente sobrepeso, obesidad, diabetes o cáncer [86].

Por ello, una dieta saludable supone la primera estrategia en la pérdida de peso y la prevención de la obesidad. Se recomienda una dieta basada en la ingesta diaria de verduras, frutas, cereales o derivados de plantas, con ingesta ocasional de derivados de animales y una ingesta mínima de alimentos procesados. Estas pautas han demostrado un efecto significativo sobre la reducción del peso corporal de personas

obesas, así como una mejora en el estado de salud de pacientes con diabetes tipo II, con enfermedades cardiovasculares o con SMet. Los efectos beneficiosos de esta dieta se deben principalmente al alto contenido en fibra, polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 (ω 3), minerales y otros micronutrientes y su bajo contenido en ácidos grasos saturados, y carbohidratos refinados [22].

Las enfermedades metabólicas derivadas de la obesidad también se ven influenciadas por cambios la alimentación. Una dieta saludable basada en semillas, plantas, frutos, legumbres, cereales y el aceite de oliva, así como de compuestos de origen natural derivados de ellos como el Omega-3, polifenoles, curcumina y prebióticos se asocia a un menor riesgo de desarrollar SMet [70]. La NAFLD también es una enfermedad multifactorial en la que la lipotoxicidad, el estrés oxidativo, la inflamación o la disbiosis juegan un papel clave [64]. El mejor tratamiento son cambios en el estilo de vida, adquiriendo hábitos alimentarios más saludables y realizando ejercicio físico de forma regular [50].

1.1.6.3.2 Compuestos bioactivos para el tratamiento de la obesidad

En individuos obesos el estado redox del organismo está desequilibrado lo que promueve un estado de estrés oxidativo [87]. Este desajuste del no solo interfiere en el metabolismo de la glucosa y los lípidos al promover la RI, sino que también interviene en la regulación de la saciedad y la ingesta a nivel hipotalámico lo que deriva en un control del apetito y del peso. Por ello, las moléculas con capacidad antioxidante suponen un punto clave en el tratamiento de la obesidad [45].

Entre las moléculas de origen natural con efecto en la prevención o tratamiento de la obesidad se han identificado multitud de terpenos, alcaloides, glicósidos y polifenoles. Entre los terpenos el celastrol y withaferin A han demostrado reducir la ingesta calórica, el peso y los niveles de leptina en animales que han generado obesidad debido a una dieta alta en grasas. Entre los alcaloides cabe destacar el efecto de bouchardatina reduciendo el peso de los animales obesos con efecto antilipogénico y estimulante de la termogénesis al elevar la expresión de UCP1; y narciclasine con un efecto sobre la pérdida de peso al reducir la cantidad de WAT y

la hipertrofia de adipocitos. El asperulósido es un glicósido natural que promueve la lipólisis del tejido adiposo y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y en el músculo [77].

Los polifenoles se pueden encontrar en frutas, verdura, cereales, el café o el té. Se subdividen en ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, chalconas, lignanos y curcumoides. Se han incluido como tratamientos dietéticos para tratar o prevenir la obesidad y se ha demostrado que mejoran la disfunción mitocondrial, la inflamación e influyen sobre la actividad del sistema nervioso simpático. Aunque cabe destacar que cada polifenol produce un efecto fisiológico distinto, en función de su estructura química, biodisponibilidad y metabolismo [83].

Los flavonoides son una de las moléculas bioactivas derivadas de las plantas que han demostrado tener más efectos beneficiosos sobre la salud humana. Se subdividen en flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas y antocianinas [83]. Los flavonoides tienen un efecto beneficioso sobre la obesidad disminuyendo la ingesta calórica y la absorción lipídica debido a la inhibición de enzimas implicadas en la hidrólisis de lípidos (lipasas) o azúcares (glucosidasas) e impidiendo su completa degradación y por tanto su absorción intestinal [41]. Flavonoides como la apigenina, luteolina, , kaempferol, naringenina, quercetina o miricetina han mostrado actividad inhibitoria de α -amilasas y α -glucosidasas [88]. Otros polifenoles ejercen un efecto beneficioso sobre la obesidad al inhibir las proteínas de membrana responsables de la captación de nutrientes. En concreto, la quercetina inhibe el transportador de glucosa y fructosa (GLUT2), mientras que el flavonoide epicatequien-gallate (ECG) y epigallocatequin (EGCG) inhiben el GLUT5 [41,89]. Los flavonoides pueden actuar también como moléculas antioxidantes, modulando el estrés oxidativo generado durante la obesidad al neutralizar ROS o NOS directamente, o indirectamente mediante la activación de los mecanismos endógenos [41]. Pueden influir en el estado inflamatorio del organismo propio de la obesidad. Flavonoides como cianidin-3-glicósido, nobiletin o la quercetina promueven la reducción de citoquinas proinflamatorias [41]. Por último, los flavonoides son capaces de interactuar de

forma bidireccional con el microbioma. Por una parte, flavonoides pueden actuar como prebióticos contribuyendo a modular el perfil y la función del microbioma, promoviendo la presencia de bacterias saludables; y por otra, el microbioma intestinal es el responsable de gran parte de la biodisponibilidad y absorción de los flavonoides [41].

Los extractos funcionales derivados de vegetales también suponen un efecto beneficioso sobre la obesidad. En este caso no se atribuye su actividad a ninguna molécula, sino al efecto conminado de todas ellas que ejercen un efecto sinérgico frente la progresión de la enfermedad. En este contexto, los nutracéuticos se definen como alimentos funcionales con propiedades beneficiosas debido a su contenido en compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, antiinflamatoria o moduladora del microbioma, entre otros. El consumo de nutracéuticos en la dieta se ha asociado con un buen estado de salud, contribuyendo a mantener sanos los tejidos mediante una disminución de factores inflamatorios y prevención del desarrollo de enfermedades ENT [86]. Estudios como el desarrollado por D'Antongiovanni et al. [23] demuestran que una suplementación vegetal basada en una mezcla de extractos vegetales de *Curcuma longa*, *Cassia mimosoides* y *Phyllanthus emblica* fue capaz de reducir el peso corporal y el IMC de los animales, así como disminuir el peso del bazo y el hígado, disminuir parámetros metabólicos derivados de la obesidad como el IL-1, y por tanto contribuyendo a la antiinflamación y ejerciendo un efecto antioxidante. En otro estudio, De la Fuente et al. [90] estudiaron el mecanismo de acción por el cual una suplementación vegetal compuesta por un extracto de té verde y té negro demostró un efecto sobre la reducción del peso, incrementando la actividad lipolítica y antiadipogénica. Este efecto se atribuyó a la capacidad para incrementar la transcripción de genes antioxidantes e inhibir la de genes inflamatorios. Chavanelle et al. [91] analizaron el efecto de una suplementación basada en 5 extractos vegetales sobre la obesidad. Al igual que en los anteriores estudios, esta suplementación consiguió revertir el peso de los animales y la homeostasis en el metabolismo de la glucosa debido a una disminución en la adsorción intestinal de los lípidos o directamente por inhibición de las lipasas.

Existen determinadas sustancias de origen natural que han demostrado tener un efecto beneficioso sobre el NAFLD, como la quercetina, el naringenina, silimarina, rutina, kaemferol y antocianinas, mediante la reducción de la inflamación y el estrés oxidativo. Algunos alcaloides como la betaína, conogilina, oxymatrina y berberina, reducen la acumulación lipídica en el hígado, regulan el metabolismo de la glucosa e inhiben la esteatosis hepática. Los compuestos fenólicos (curcumina, epigallocatequin-3-gallate, resveratrol o el ácido cafeico), inhiben el acúmulo de la grasa hepática y muestran efectos antioxidantes. Las saponinas reducen el estrés oxidativo. Por último, los polisacáridos derivados de plantas son importantes reguladores del sistema inmune, presentan un efecto anticancerígeno, hipoglucemiante y muestran un efecto protector en el hígado inhibiendo la esteatosis, regulando el microbioma y ejerciendo un efecto antiinflamatorio [64].

1.1.6.3.3 Restricción calórica

No solo es necesario mantener ingesta de alimentos de calidad, sino que la proporción y cantidad total de calorías ingeridas debe ser proporcional al gasto energético del organismo. La restricción calórica se refiere a una restricción del 10 al 40% de la ingesta habitual de calorías sin alterar los requerimientos nutricionales [92]. Se considera un tratamiento simple y eficaz para reducir el peso y prevenir la aparición de alteraciones en el metabolismo [93]. Una restricción calórica de forma moderada durante 4 a 6 meses supone una pérdida de peso del 5 al 10% [84]. Una restricción calórica de más del 40% de la ingesta habitual causa daño hepático, incrementando la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF α , además de producir alteraciones en la composición del microbioma y en la barrera intestinal promoviendo la adsorción de lipopolisacáridos [93].

1.1.6.3.4 Ejercicio físico

El ejercicio físico presenta un papel fundamental en el desarrollo y prevención de diversas enfermedades crónicas, incluyendo la obesidad y las enfermedades metabólicas [94]. El ejercicio físico, actúa como modulador en el metabolismo, principalmente por ejercer un efecto positivo sobre el metabolismo del músculo

esquelético. Entre estos efectos encontramos un incremento en la oxidación lipídica, en la sensibilidad a la insulina, en la captación de glucosa, una reducción en el contenido lipídico intramuscular y una mejora en la capacidad oxidativa de las mitocondrias [95]. Aunque también produce un efecto beneficioso sobre otros tejidos como son el hígado, el tejido adiposo, el páncreas y el sistema cardiovascular mediante la liberación de citoquinas (miocinas) u hormonas al medio que pueden intervenir en la regulación del sistema inmune [96]. Las diversas modalidades de ejercicio, así como la frecuencia, la intensidad o la duración pueden influir en los efectos metabólicos que produce. El ejercicio aeróbico parece tener mayor impacto en la pérdida de peso mientras que el ejercicio de alta intensidad ayuda a mejorar el perfil lipídico [94]. El ejercicio físico y sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo no siempre van emparejados con la pérdida de peso [40], pero sí ha sido considerado por varios autores como la mejor estrategia para el mantenimiento de la pérdida de peso [97,98]. Además, la realización de ejercicio físico es capaz de incrementar la concentración de BAT [99]. Los efectos beneficiosos de realizar ejercicio moderado de forma regular están mediados por mecanismos antiinflamatorios, como un incremento en la producción y liberación de citoquinas antiinflamatorias e inhibición de las proinflamatorias, así como en la expresión de estimulantes de estas citoquinas. Además, disminuyen la infiltración y acumulación de los macrófagos en el tejido adiposo. El ejercicio físico reduce la inflamación en aquellas personas que presentan un estado inflamatorio elevado, mientras que estimula la respuesta del sistema inmune en individuos sanos [100]. Aunque algunos autores como Verheggen et al. [101] concluyeron que el ejercicio por sí solo no tiene un efecto significativo en la reducción del peso corporal, destacan que presenta un mayor efecto en la reducción de la grasa visceral que una intervención nutricional de forma aislada. De hecho, la realización de 30 a 60 min de ejercicio al día, con una intensidad moderada-alta, durante 4 a 6 meses demostró una reducción de la VAT del 15 al 20%, siempre y cuando se asociara con una dieta equilibrada y sana [84].

Además de ser beneficioso para el control de la obesidad, la realización de ejercicio físico también supone mejoras sobre las enfermedades metabólicas derivadas. Por

ejemplo, Diniz et al. [102] demostraron que un protocolo de ejercicio físico puede ser un tratamiento no farmacológico para tratar NAFLD, mejorando la RI derivada de la obesidad. En su estudio sometieron a ratones obesos por ingesta de dieta hipercalórica a un programa de ejercicio físico durante 8 semanas. Descubrieron que aquellos que realizaron el ejercicio físico presentaban una mayor expresión de la proteína PPAR α , disminuyendo la esteatosis, la inflamación y la fibrosis en modelos animales con NAFLD. El ejercicio también supuso un aumento en la activación de AMPK, que puede ser responsable de la mejora en la RI que se encontró. En el estudio realizado por Sugimoto et al. [103] se describió que la realización de ejercicio físico combinado con una restricción calórica presentó efectos significativamente más relevantes, que ambas intervenciones por separado, sobre el control de la obesidad o en la prevención de enfermedades metabólicas derivadas como la diabetes mellitus tipo II. La combinación de ambas consiguió un incremento en el contenido de músculo esquelético, mientras que disminuyó el contenido de WAT. También se encontró un incremento en la expresión de GLUT4 y lipasas, lo que promueve la captación de glucosa y el metabolismo lipídico.

En lo relativo a las enfermedades cardiovasculares, el grupo de Saxton et al. [40] demostró que el ejercicio físico era capaz de revertir el efecto anti contráctil que genera el tejido adiposo que rodea al corazón (PVAT), debido a la obesidad. El efecto anti contráctil del PVAT contribuye al desarrollo de hipertensión y diabetes tipo II. El ejercicio inhibió los niveles de TNF α , contribuyendo a reducir la inflamación del tejido. Además de incrementar los niveles de adiponectina que actúa como vasodilatador, el ejercicio consiguió incrementar la expresión de β -adrenoreceptores y OCT3, lo que supuso una prevención en las complicaciones vasculares derivadas de la obesidad. Este grupo de investigadores acentúa la importancia del ejercicio como tratamiento de primera línea en el tratamiento de la obesidad para evitar los daños vasculares derivados.

1.2 CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades relacionadas en las que ciertas alteraciones celulares provocan la pérdida del control del proceso de proliferación que conlleva a una excesiva división celular y la capacidad de estas células malignas para diseminarse a otros tejidos (metástasis) [104,105]. El CCR es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en la población a nivel mundial, y el segundo tipo de cáncer con mayor número de defunciones asociadas.

El CCR puede clasificarse en función del tipo celular del cual se origina. Más del 90% de los cánceres colorrectales se originan a partir las glándulas de la mucosa generando adenocarcinomas [106]. Existen otro tipo de tumores mucho menos comunes como los tumores carcinoides que se originan a partir de células productoras de hormonas en el intestino, tumores estromales que se originan a partir de las células especializadas de la pared del colon llamadas *células intersticiales de Cajal*, linfomas originados en células del sistema inmunitario o sarcomas originados a partir de células sanguíneas [107].

En función de la cantidad de alteraciones genéticas que presente se puede categorizar en tumores hipermutados (>12 mutaciones por 10^6 pares de bases) o no hipermutados (<8.24 mutaciones por 10^6 pares de bases) [108,109]. Según el Atlas de Genoma del Cáncer, el cáncer colorrectal es uno de los tumores que más mutaciones presenta [110].

En clínica se usa el sistema de clasificación de estadificación tumor, ganglio linfático y metástasis (TNM); siendo un sistema que clasifica el tumor en función del lugar dónde se originó, el tamaño y diseminación. Este sistema de clasificación sirve para entender la gravedad del cáncer y las probabilidades de supervivencia en el momento de su diagnóstico, y para determinar el mejor tratamiento. El sistema TNM es mundialmente utilizado. A continuación se describen que representa cada letra y qué indican acerca del estado del tumor, según el instituto nacional del cáncer [111]:

- La T indica el tamaño y extensión del tumor. Suele ir precedido por un

número que cuando más grande es, mayor tamaño tendrá el tumor, o se habrá extendido a tejido cercanos.

- TX: No es posible medir el tamaño del tumor primario.
- T0: No es posible encontrar el tumor primario.
- T1-T4: A mayor número, mayor tamaño o extensión del tumor.
- La N indica el número de ganglios linfáticos regionales que son cancerosos. Se subdivide en:
 - NX: Imposibilidad para medir el tumor en los ganglios cercanos.
 - N0: No hay presencia de cáncer en los ganglios regionales.
 - N1-N3: Cuando más alto el número que precede a la N, mayor es el número de ganglio linfáticos afectados por el tumor. Indican el número y la ubicación de los ganglios linfáticos cancerosos.
- La M indica la presencia de metástasis.
 - MX: Imposibilidad de medir la metástasis.
 - M0: El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
 - M1: El cáncer primario se ha diseminado a otras partes del cuerpo. (M1a) para determinar que ha alcanzado un órgano distinto al colon o el recto (M1b), ha alcanzado más de un órgano y (M1c) metástasis peritoneal.

Existe otro tipo de clasificación que se usa en combinación a la del TNM, y que agrupa el tumor en cinco estadios más generales, a continuación se definen según el Instituto Nacional del Cáncer [111]:

- Estadio 0: También conocido como carcinoma *in situ* (CIS). Se trata de la presencia de células anormales que no se han diseminado a tejidos cercanos.
- Estadio I, estadio II y estadio III: Indican la presencia de cáncer. Cuanto mayor sea el número más grande será el tamaño del tumor y mayor diseminación hacia nódulos linfáticos u órganos cercanos. *Por ejemplo, el estadio IIa indica que el tumor ha invadido la pared del colon o el recto, pero sin diseminación a ganglios linfáticos regionales ni otros órganos. El estadio IIIa indica que el tumor ha invadido*

el revestimiento interno del intestino, y se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos.

- Estadio IV: El cáncer se ha diseminado a otros órganos distantes del organismo, es decir, presencia de metástasis.

1.2.1 Carcinogénesis

La carcinogénesis del CCR se inicia por la transformación de las células epiteliales del colon en células hiper proliferativas debido a mutaciones espontáneas, mutágenos ambientales o alteraciones genéticas o epigenéticas. Entre los cambios epigenéticos encontramos:

- Metilación del ADN: Es un proceso catalizado por enzimas ADN metiltransferasas que añaden un grupo metilo al nucleótido, generalmente perteneciente a las islas CpG, mientras que la desmetilación es catalizada por enzimas de translocación (TET). El correcto equilibrio entre estas dos enzimas garantiza la adecuada expresión génica, cuando hay un desequilibrio puede ocurrir una hipermetilación que da como resultado la falta de expresión de un gen específico, o una hipometilación dónde ocurre lo contrario. En las células cancerosas ocurre una hipermetilación en las islas CpG del promotor del gen supresor de tumores (ACP) lo que provoca su silenciamiento e inicio y progresión del tumor [112].
- Acetilación de histonas: Las histonas unidas al ADN puede sufrir modificaciones postraduccionales al unirse moléculas de acetilo a ellas, modificando su carga y derivando en una reorganización de la cromatina. La hiperacetilación supone un aumento de la expresión génica, mientras que la hipoacetilación supone su silenciamiento. Están reguladas por enzimas acetiltransferasa o desacetilasas [112].
- MicroARNs: Son moléculas de ARN no codificantes, de unos 17 a 25 nucleótidos, que pueden inhibir de forma postranscripcional la expresión de ciertos genes. Participan en todos los procesos biológicos (diferenciación, regulación del ciclo celular, respuesta inmune, angiogénesis o apoptosis). En

las células cancerosas se incrementa la expresión de microARN A promotores del desarrollo o progresión del cáncer como miARN-155 o 215, y disminuye la concentración de miARN supresores de tumores como miARN-34a [112,113].

La hiper proliferación de estas células da lugar a un adenoma benigno (estadio 0), el 10% de estos pólipos adenomatosos derivan en el desarrollo de tumores debido a alteraciones en el ADN formando un adenocarcinoma que invade la capa muscular (estadio I). Mutaciones en APC, catequinas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento del microambiente tumoral (TME) están implicados en la fase de iniciación del tumor colorrectal a partir del adenoma. Cuando el tumor crece en tamaño y volumen invade la capa serosa (estadio II) y el peritoneo (estadio III), las mutaciones implicadas en la progresión del tumor ocurren principalmente en el gen que codifica la proteína que controla la división celular (CDC) y en el factor de crecimiento transformante (TGFβ). Por último, el tumor se podrá diseminar a otros órganos vía linfática o sanguínea (estadio IV). Esta última fase de progresión del tumor está caracterizada por mutaciones en p53, BAX y factores pro angiogénicos. El proceso de desarrollo del cáncer colorrectal está representado en la **Figura 9**. El estadio en el que se encuentre el tumor cuando se identifique, indicará el grado de severidad y las opciones terapéuticas disponibles [108,114].

La alta tasa de mortalidad del CCR se debe a la metástasis en el hígado o pulmones. Una subpoblación celular del CCR conocida como *cancer stem cells* (CSCs) parecen tener un gran potencial metastásico adaptándose a los diferentes microambientes de los tejidos que atraviesa [115].

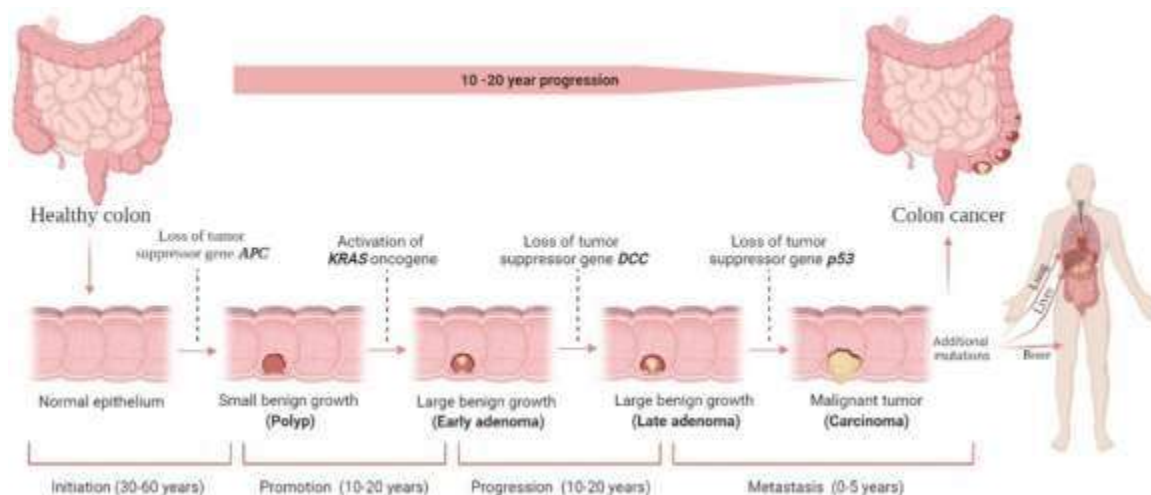


Figura 9. Desarrollo del cáncer colorrectal creada con BioRender por Hossain et al., (2022).

1.2.1.1 Alteraciones genómicas

A nivel genómico, esta ruta de adenoma a carcinogénesis es causada por al menos tres vías moleculares principales. La vía de la inestabilidad cromosómica (CIN) que afecta principalmente al lado izquierdo del colon, la vía de la inestabilidad microsatélite (MSI) más predominante en el lado derecho del colon o una tercera ruta conocida como la vía serrada que se puede encontrar en ambas [116].

- Inestabilidad cromosómica (CIN): Es el responsable del 70-85% de los casos esporádicos de CCR. Se caracteriza por presentar alteraciones en el número de cromosomas y su estructura, así como una pérdida o ganancia de segmentos cromosómicos por aneuploidía, deleciones, inserciones, amplificaciones o pérdida de la heterocigosidad. Generalmente se asocian con mutaciones en oncogenes específicos o genes supresores del tumor como el gen poliposis coli adenomatosa (ACP), KRAS, PIK3CA o p53, que regulan la proliferación y el ciclo celular y juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión del CCR. La pérdida de actividad en APC supone una translocación de catequina β y activación de la Wnt que activa genes implicados en la carcinogénesis como VEGF y PPAR. La mutación en KRAS aparece en el 40% de los tumores CCR, está implicado en la señalización de la vía EGFR y NF-KB que regulan la proliferación y supervivencia celular [109,114,116].

-
- Inestabilidad microsatélite (MSI): Es el responsable del 10-20% de los casos de CCR esporádicos y el responsable de casi el total de los tumores que aparecen en paciente con el síndrome de Lynch. Los microsatélites son secuencias de ADN repetidas en tándem. Se asocian con hipermutabilidad genética en estas regiones. La causa más común es el silenciamiento epigenético mediante hipermetilación de genes reparadores del daño en el ADN (genes MMR) como MLH o MSH. Otros genes alterados son aquellos que codifican proteínas reguladoras de la proliferación (CDX, IGF2), la parada del ciclo celular o apoptosis (CASP5, PTEN, FAS) [109,114,116]. La iniciación de este tipo de tumores también se debe a alteraciones encontradas en el gen ACP, pero también se inicia por mutaciones en BRAF. Este tipo de tumores se desarrolla de forma más rápida que los que ocurren vía CIN [109].
 - Vía serrata o fenotipo metilador de CpG (CIMP): responsable del 10-20% de los CCR. Una mutación en BRAF es el primer mecanismo identificado en esta vía, que puede derivar en una activación de la proteína quinasa ERK derivando en una proliferación celular descontrolada (similar a vía CIN) o derivar en mutaciones en genes MMR (similar vía MSI). Ambas vías se caracterizan por una alta metilación en regiones del genoma ricas en dinucleótidos de citosina/guaninas conocidas como islas CpG, que codifican genes supresores del tumor. La metilación de estas islas implica silenciamiento y desarrollo del tumor [109]. Se dividen en CIMP elevado caracterizado por presentar mutaciones en el protooncogén BRAF, metilación en MLH o inhibición de la metiltransferasa MGMT o CIMP bajo caracterizado por mutación en el gen que codifica la proteína KRAS [114].

1.2.1.2 Alteraciones en vías de señalización metabólicas

Como hemos comentado anteriormente el desarrollo del CCR implica diversas mutaciones de forma secuencial. Los principales mecanismos alterados por estas mutaciones son aquellos que regulan la proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia celular CCR [114]. Encontramos diversas vías metabólicas alteradas que interaccionan de forma intra e intercelular en la inducción y progresión del CCR

[116], entre ellas están:

- Wnt/ β -catenina: La activación de esta vía se encuentra presente en más del 90% de los tumores CCR debido a la pérdida de funcionalidad del APC [115]. Esta vía juega un papel fundamental en el mantenimiento de los tejidos y en la regeneración del intestino [114]. Una mutación en ACP supone una desenfrenada activación de Wtn que deriva en una acumulación de β -catenina en el citoplasma y su translocación hacia el núcleo dónde actúa como activador de factores de transcripción de genes involucrados en la proliferación, contribuyendo a la hiperproliferación celular y crecimiento del tumor [116].
- JAK/STAT: Un activación de Janus quinasas (JAKs) mediante fosforilación resulta en el reclutamiento de proteínas STAT que participan en la oncogénesis mediante la estimulación de genes implicados en la inhibición de la apoptosis, regulación del ciclo celular o inductores de angiogénesis [116].
- Ras/ERK: Esta vía de señalización incluye una cascada de quinasas implicadas en el crecimiento celular y proliferación. La activación de ERK inhibe la apoptosis al inhibir los receptores de los ligandos FAS o TNF. La hiper activación de Ras/ERK contribuye a la inhibición de la senescencia por una sobreexpresión de la telomerasa [116].
- PI3K/AKT (mTOR): PI3K es una quinasa intracelular que regula el crecimiento, la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular. AKT es una quinasa con residuos de tirosina y serina que es activada por PI3K y cuya activación promueve la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. AKT regula la activación de proteínas como mTOR que es activador de la proliferación, angiogénesis, crecimiento y supervivencia celular [114]. PTEN inhibe la activación de esta vía de señalización al desfosforilar un segundo mensajero implicado en esta vía, resultando en una parada del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. En MSI ocurre una pérdida de funcionalidad de PTEN contribuyendo al desarrollo del tumor

[116].

- TGF β /SMAD: TGF β es una familia generadora de polipéptidos (SMAD) que regulan procesos biológicos como el crecimiento celular, la diferenciación, apoptosis, la producción de la matriz extracelular y función inmune [116]. Cuando la función de TGF β se pierde en estadios tempranos del CCR se observa un crecimiento descontrolado de las células, mientras que cuando se pierde en estadios tardíos supone pérdida de la respuesta inmune que contribuyen a la invasión y migración celular [114].
- Notch: Es una vía de señalización intercelular muy conservada que regula procesos como la diferenciación, proliferación y muerte celular [114]. Una sobreexpresión de esta vía de señalización supone un incremento de la carcinogénesis [116].
- NF-KB: El factor nuclear de transcripción es el mayor regulador de la respuesta inflamatoria. Está implicado en procesos biológicos de diferenciación, ciclo y migración celular. Es activado por ligandos como el clúster de diferenciación CD40 o por factores extracelulares como virus, citoquinas o LPS. Su activación lo transloca al núcleo sobre expresando genes que promueven la iniciación y progresión del CCR [114,117].
- EGFR/MAPK: EGFR es el receptor del factor de crecimiento epidemial y MAPK la proteína quinasa activada por mitógenos, cuya alteración promueve la progresión del tumor al promover la proliferación celular, la supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis del tumor [114].

La progresión del tumor no está simplemente regulada por cambios genéticos de las células tumorales, sino que también se ve influenciado por el microambiente tumoral (TME). El TME lo compone todo aquello que rodea el tumor, en concreto consiste en el conjunto de células tumorales, células del estroma, células del sistema inmune y matriz extracelular. Es un sistema complejo que influye en el crecimiento y desarrollo del tumor. La supervivencia de las células tumorales cuando invaden otros tejidos se debe en parte al efecto de este microambiente tumoral, ya que recluta células del sistema inmune o del sistema inflamatorio alterando el metabolismo del estroma y

evitando que las células del sistema inmune lo reconozcan como extraño y lo eliminen. Por ejemplo, la IL-6 es una citoquina secretada por macrófagos, fibroblastos o linfocitos del microambiente tumoral que activa la vía de señalización JAK/STAT favoreciendo la migración celular y la invasión [114].

1.2.1.3 Prevención

La OMS recomienda para la prevención del cáncer de colon una detección precoz mediante programas de cribado y, además, un aumento en la realización de actividades deportivas y en el consumo de frutas y verduras [105]. Hay tres niveles de prevención; primaria es aquella dirigida para toda la población, secundaria es aquella que se usa en pacientes que presentan lesiones premalignas, y la terciaria es la usada para prevenir una reaparición del cáncer. Hoy en día, la mejor manera de actuar en la prevención del cáncer colorrectal es el uso de colonoscopias para poder actuar ante cualquier indicio, sin embargo, su elevado coste y el carácter invasivo hacen que la técnica no pueda ser usada de forma continuada ni está indicada para todo tipo de personas. [108]. La relación entre la ingesta de legumbres, vegetales y frutas y el riesgo de desarrollar cáncer, presenta un patrón de asociación consistente en una misma dirección: un mayor consumo de vegetales disminuye el riesgo de desarrollar cáncer [118,105]. Entre los vegetales recomendados se encuentran, entre otras; zanahoria, vegetales de hoja verde, vegetales del género *Allium* y de la familia *Brassicaceae*. Esta acción antitumoral se debe a la presencia de moléculas como carotenos, vitamina C y E, selenio, polifenoles, inhibidores de proteasas, indoles e isotiocianatos. Es la combinación de varias de estas moléculas la responsable de un menor riesgo de desarrollo de ciertos tipos de cáncer [119].

La recomendación del consumo de especies vegetales de la familia Brassicaceae para la prevención del CCR, se basa en el contenido de unas moléculas naturalmente presentes en esta familia conocidas como glucosinolatos, los cuales se convierten en productos bioactivos conocidos como isotiocianatos (ITC) gracias a la enzima mirosinasa y/o por la microbiota intestinal. Además, su gran contenido en polifenoles contribuye a la quimio prevención por su capacidad de captar radicales

libres que puedan causar daño celular, así como su capacidad para incrementar la actividad de enzimas detoxificantes que inhiben la fase inicial del desarrollo del CCR [120]. Sin embargo, a pesar de ser una prometedora medida quimiopreventiva, la ingesta directa de estos vegetales para su futura absorción y conversión en ITC puede no ser suficiente para llegar a conseguir una actividad terapéutica [78]. En este contexto, el uso de nutraceuticos se convierte en una estrategia eficaz en la prevención de esta patología. Los nutraceuticos se definen como el uso de componentes alimenticios, o sus ingredientes activos para la prevención y el tratamiento de diversas patologías, específicamente en el cáncer, el uso de nutraceuticos ha demostrado tener un efecto positivo en la prevención del desarrollo del tumor al ejercer efectos sobre la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis y metástasis de las células cancerígenas. Por otra parte, su capacidad antioxidante protege las células de los radicales libres que podrían causar alteración en el ADN [113,121].

La quimioterapia preventiva se define como el uso de agentes naturales o sintéticos que se usan para prevenir, suprimir o para revertir la fase inicial de carcinogénesis [122]. Existen compuestos químicos que han demostrado ser eficaces en la prevención de cierto tipo de tumores. En concreto, antiinflamatorios no esteroideos o AINES como la aspirina, sulindac, celecoxib, rofecoxib, eflornitina-sulindac y ursodiol han demostrado en ensayos en animales como clínicos un efecto preventivo sobre el desarrollo de cáncer colorrectal. El programa de prevención *Adenoma/Carcinoma (CAPP)* demostró que tomar una dosis baja de aspirina durante más de dos años redujo el riesgo de cáncer colorrectal en la mitad de los pacientes con riesgo de desarrollarlo, sin embargo, la dosis óptima y la duración no han sido definidas. Parece que el mecanismo de acción quimiopreventivo de estas moléculas se basa en la inhibición de la COX-2, proteína que se encuentra sobre expresada en células cancerígenas, lo que facilita la apoptosis en células de CCR. No obstante, mayores estudios *in vivo* son necesarios para poder esclarecer dosis y efectos adversos [108,123]. Como agentes quimiopreventivos de origen natural, actualmente no se encuentra ninguno en el mercado, aunque sí hay algunos que han llegado a

fase preclínica o clínica como el ácido ursodeoxicólico (UDCA), el ácido fólico, o la curcumina [113].

1.2.2 Incidencia

El número estimado de nuevos casos de cáncer en el mundo fue de 19.3 millones en el año 2020, y se estima que esta cifra aumente hasta 30.2 millones en el año 2040. Entre los cánceres más comunes en cuanto a su incidencia a nivel mundial, se encuentran el cáncer de mama con 2.3 millones de casos, seguido por el cáncer de pulmón (2.2M), colorrectal (1.9M), próstata (1.4M), piel (1.2M) y gástrico (1.1M)

En la **Figura 10** se puede observar una representación de la incidencia del cáncer el todo el mundo.

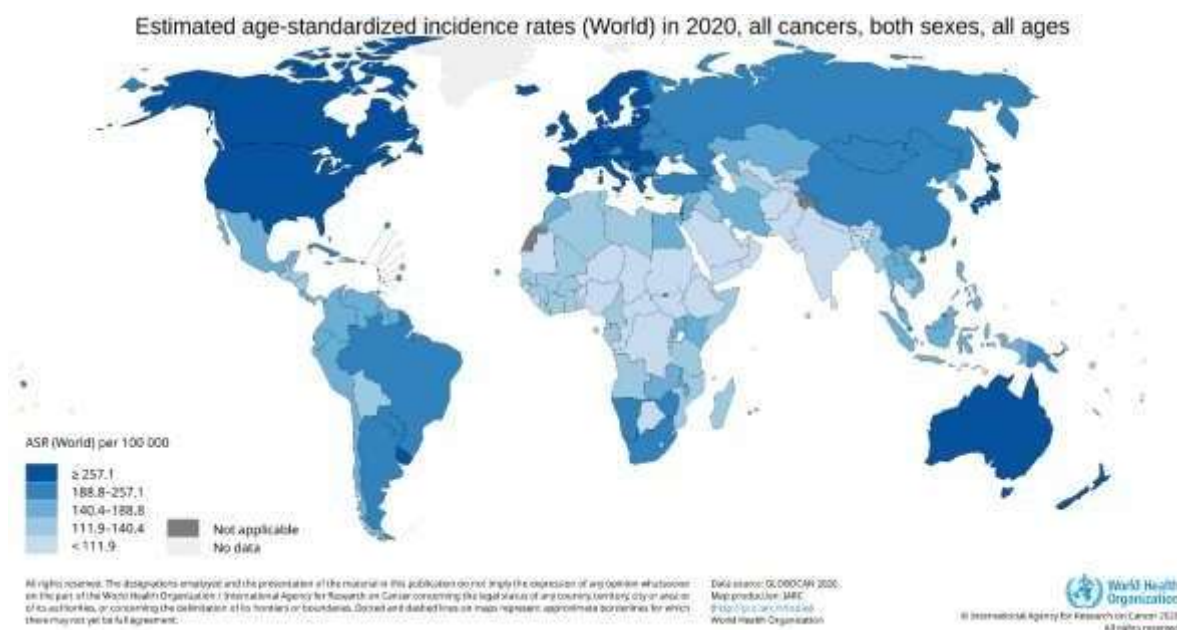


Figura 10. Incidencia del cáncer en la población mundial según la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer [3].

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en la población a nivel mundial (**Figura 11**). Según el informe de la OMS en el año 2020 se diagnosticaron 1,93 millones de casos nuevos de cáncer colorrectal en el mundo, con mayor incidencia en hombres que en mujeres, concretamente se diagnosticaron 1,07 M de hombres con cáncer colorrectal y 865.630 mujeres. En España se sigue la misma tendencia, con una incidencia del cáncer colorrectal de 24.610 casos en hombres y

15.813 casos diagnosticados en mujeres. A nivel mundial, se estima que en el año 2040 el número de casos del cáncer colorrectal alcanzará los 3 millones de nuevos casos [3,105]

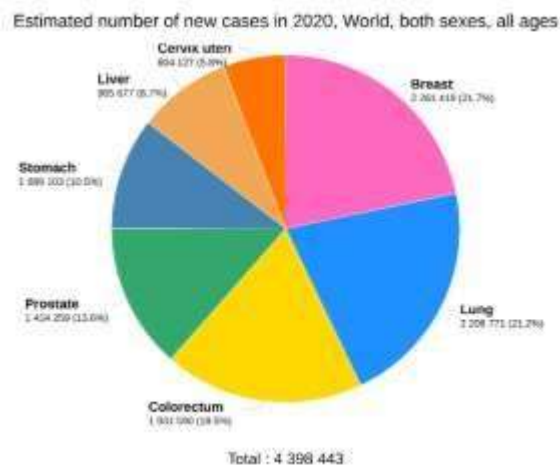


Figura 11. Incidencia del CCR según datos de la OMS [3].

1.2.3 Mortalidad

Según la OMS, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. En 2020, se atribuyeron casi 10 millones de defunciones debido a esta enfermedad [105]. En el primer semestre del año 2023, el 27.1% de defunciones en la población española fueron causa de enfermedades del sistema circulatorio, y el 25.8% debida a tumores [58]. El cáncer de pulmón es el responsable de un mayor número de muertes con un total de 1.8 millones de defunciones, seguido por el cáncer colorrectal, el de hígado, el gástrico y el de mama [105]. Se estima que para el año 2040 el cáncer será responsable de 16.3 millones de defunciones en el mundo [3].

El CCR es el segundo tipo de cáncer con mayor número de defunciones asociadas (**Figura 12**). Según el informe del año 2022 de la OMS, el cáncer colorrectal había sido responsable de 916.000 casos de defunciones en el mundo, concretamente 515.639 hombres y 419.536 mujeres. Se estima que en el año 2040 será responsable de 1.6 millones de defunciones en el mundo.

Número estimado de casos y muertes a nivel mundial, en ambos sexos y edades.

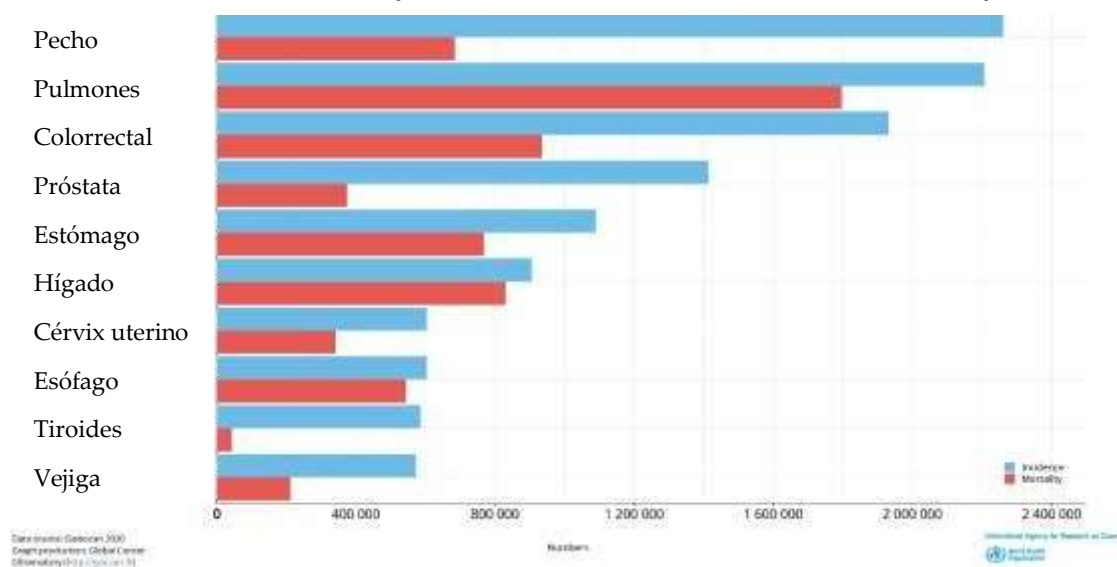


Figura 12. Incidencia y mortalidad del cáncer [3].

Dentro del campo de la oncología, el cáncer colorrectal (CCR), objeto de estudio en esta tesis doctoral, es considerado, por su actual incidencia, mortalidad y por las previsiones de incidencia en los próximos años, un auténtico problema de salud pública.

1.2.4 Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de un CCR se encuentran i) la edad, ya que se diagnostica con mayor frecuencia en pacientes mayores de 50 años; ii) factores predictivos, especialmente la presencia de pólipos intestinales o de enfermedad intestinal inflamatoria; iii) la presencia de un CCR previo; iv) los denominados factores genéticos o familiares, dado que en 25% de los casos existe un antecedente familiar y en el 10% un componente hereditario; v) el estilo de vida, en el que se debe destacar la inactividad física, y vi) por último, los factores dietéticos, que juegan un papel esencial y se encuentran en continua investigación; de hecho, el consumo excesivo de alcohol, el sobrepeso y obesidad y ciertos tipos de alimentos (carne procesada) han sido vinculados a esta patología [106]. El Global Cancer Observatory (GCO) establece una relación causal entre la obesidad y al menos nueve tipos de cáncer. Se estima que a nivel mundial se produjeron unos 85.000 casos de cáncer de colon directamente relacionados con la obesidad [3]. A continuación, se desarrollan

en más detalle los riesgos mencionados anteriormente:

1.2.4.1 Factores de riesgo no modificables

La edad supone uno de los mayores riesgos no modificables en el desarrollo del CCR, ya que la mayoría de cánceres colorrectales se diagnostica en personas mayores de 50 años. El género también influye sobre el desarrollo de CCR, ya que como hemos visto anteriormente su incidencia es mayor en hombres que en mujeres. La media de edad en el diagnóstico de hombres es de 68 años mientras que el CCR se diagnostica principalmente en mujeres mayores de 72. [3]. La presencia de enfermedades inflamatorias como la colitis o la enfermedad de Crohn aumentan la probabilidad de desarrollar CCR debido a la inflamación crónica de la mucosa que incrementa el riesgo de sufrir mutaciones esporádicas. La presencia de otras enfermedades como la diabetes mellitus tipo II también incrementa el riesgo de sufrir CCR. El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) así como sus receptores están incrementados en células cancerígenas. La hiperinsulinemia incrementa el estrés oxidativo y el daño celular, así como la activación de la vía MAPK/PI3K que inducen la proliferación celular. La presencia de enfermedades hereditarias como pólipos adenomatosos (FAP) o el síndrome de Lynch contribuyen a incrementar el riesgo de CCR entre los miembros de la familia. Casi el 100% de los pacientes con FAP desarrollan CCR ya que esta enfermedad es debida a una mutación en ACT, mientras que el síndrome de Lynch es debido a mutaciones en genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos o MMR por sus siglas en inglés *mismatch repair*, y un 60% de los pacientes termina desarrollando CCR [108].

1.2.4.2 Factores de riesgo modificables

Entre los factores de riesgo modificables encontramos la dieta y el estilo de vida. Entre ellos, la obesidad parece tener un efecto directo en el desarrollo del CCR al promover la RI, hiperinsulinemia, un estado de inflamación crónica y estrés oxidativo que puede derivar en daño en el ADN y estimulación de la proliferación celular [108,115].

El consumo de alcohol o de tabaco esta significativamente asociado al riesgo de

desarrollar CCR. Un individuo que consume más de 4 bebidas alcohólicas al día incrementa en un 52% el riesgo de desarrollar CCR. Los metabolitos procedentes del metabolismo del etanol como el acetaldehído causan efectos carcinogénicos en el colon mediante estrés oxidativo, peroxidación lipídica, cambios epigenéticos, disfunción de la barrera epitelial y modulación del sistema inmunológico. El riesgo de desarrollar CCR incrementa proporcionalmente al número de cigarrillos consumidos. Además, los pacientes con CCR que fuman presentan menor tasa de supervivencia que aquellos que no lo hacen [108]. El *consumo de carne roja, fructosa o una dieta alta en grasas* incrementa el riesgo de desarrollar CCR en un 20-30%, mientras que el consumo de vegetales, frutas, legumbres o cereales, así como la realización de ejercicio físico está asociado con una menor incidencia del CCR [105,115].

El *microbioma* juega un papel clave en la iniciación, desarrollo y metástasis del CCR. Se han reportado diferencias significativas entre el microbioma de pacientes sanos y aquellos que han desarrollado CCR [124]. Cambios en el tipo y la abundancia del microbioma incrementan el riesgo de desarrollar CCR, mediante un incremento de bacterias dañinas que promueven factores de virulencia, inflamación, respuesta inmune o cambios epigenéticos [125]. Los metabolitos producidos por estas bacterias como ácido biliar (BAs) o ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) son un componente esencial en la comunicación entre el microbioma y el organismo hospedador, y puede actuar de forma protectora o dañina en el desarrollo del CCR [126].

1.2.5 Sintomatología, detección, diagnóstico y prevención.

Los síntomas que se deben tener en cuenta son el dolor abdominal o pélvico, la alteración del ritmo intestinal (estreñimiento, diarrea o ritmo alternante) y la eliminación de moco o sangre en heces. También puede existir anemia, disminución del apetito, cansancio y pérdida de peso. No obstante, estos síntomas pueden ser vagos e inespecíficos y pueden estar asociadas a otras enfermedades. Para la detección del cáncer colorrectal en personas asintomáticas se ha establecido un cribado de la población con más de 50 años, o a pacientes con condiciones

predisponentes, basado en la detección de sangre oculta en heces para diagnosticar el tumor en una etapa inicial [106]. El desarrollo del cáncer colorrectal conlleva generalmente entre 10 y 15 años, por lo que detectar mediante screening a la población la presencia de pólipos antes de que deriven en tumor es fundamental [108]. Cuando se desarrolla por la vía MSI es algo más rápida y puede generar el tumor en menos años [109].

La colonoscopia es el método más utilizado para el diagnóstico del cáncer colorrectal. Consiste en un endoscopio que presenta en su extremo una cámara, una luz y una pinza que permite visualizar el interior del colon y el recto y coger muestras para la confirmación mediante biopsia. Aunque también se puede diagnosticar por exploraciones radiológicas permitiendo además estudiar el nivel de extensión del tumor por el organismo. Se recomienda siempre la realización de exploración física y una analítica donde se podría detectar un cuadro de anemia o alteraciones en la bioquímica sanguínea que indiquen daños en el hígado o el riñón [106].

Existen biomarcadores que pueden servir como marcadores clínicos para el diagnóstico precoz del CCR o para predecir la respuesta del paciente a un tratamiento específico. Biomarcadores como citoqueratina 20 o el factor de transcripción nuclear específico de epitelio intestinal (CRX-2) que están sobreexpresados en pacientes con CCR, mientras que la citoqueratina 7 se encuentra inhibida. Existen también otros marcadores metabólicos como un incremento en los niveles de la proteína específica del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP2) y piruvato quinasa (PKM2) que se han asociado al desarrollo del CCR. En cuanto a marcadores para el pronóstico de los pacientes diagnosticados con CCR se usa el antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína altamente expresada en CCR, que se relaciona con la recidiva del CCR tras la intervención quirúrgica. Sin embargo, también se encuentra incrementada en la enfermedad inflamatoria del intestino o en la pancreatitis [114]. Los microARNs han ganado importancia en el diagnóstico, tratamiento y evolución del CCR, ya que regulan multitud de procesos biológicos. Hay microARNs que pueden inhibir genes supresores de tumores y

favorecer el desarrollo de este, u otros que inhiben oncogenes e impiden el desarrollo del tumor. Por ejemplo, altos niveles de miR-21 en sangre se asocian con la presencia del tumor, mientras que miR-194 actúa como supresor del CCR [113].

Según el informe de la OMS los casos de cáncer en el mundo se podrían reducir en un 30-50% reduciendo la exposición a factores de riesgo y aplicando estrategias preventivas. La detección precoz y el tratamiento adecuado de cada paciente suponen factores clave en la reducción de la mortalidad de esta enfermedad. Cuando el cáncer se detecta en una fase temprana (diagnóstico precoz) es más probable que responda al tratamiento, aumentando las probabilidades de supervivencia o mejorar la calidad de vida del paciente. Para la detección precoz es necesario que la población sea conocedora de los síntomas de los distintos tipos de cáncer, para que cuando observen cualquier anomalía acudan a los servicios clínicos para su evaluación, diagnóstico y tratamiento oportuno. Otra alternativa sería el tamizaje; se trata de un cribado de un porcentaje de la población para detectar un cáncer o una lesión precancerosa determinada. El cribado se hace sobre personas que no presentan síntomas pero que cumplen con los criterios asociados a la edad o la presencia de otros factores de riesgo [105].

1.2.6 Tratamientos

Existen tres tratamientos principales para tratar el cáncer colorrectal. Como pauta general, el primer tratamiento será la extirpación del tumor primario mediante cirugía, siempre y cuando no suponga riesgo para el paciente. Otro tipo de tratamientos son el tratamiento sistémico en el que se incluye la quimioterapia, los anticuerpos monoclonales, inmunoterapia o el tratamiento con radioterapia. En muchas ocasiones, para aumentar las probabilidades de que el tratamiento sea efectivo, se hace un enfoque multidisciplinar y se combinan distintos tratamientos [106].

1.2.6.1 Tratamientos locales

1.2.6.1.1 Tratamiento quirúrgico

Los tumores localizados pueden ser extirpados completamente mediante la cirugía,

mientras que la extirpación de los tumores que se han extendido a otras estructuras dependerá específicamente de cada caso. En general, la metástasis que se operan con mayor frecuencia son las hepáticas o pulmonares. Este tipo de cirugías presentan complicaciones como fiebre, dolor, infección, sangrado, trombosis o problemas de cicatrización. Además, al extirpar parte del colon, o el colon en su totalidad, se pueden ver modificados los hábitos intestinales del paciente [106].

1.2.6.1.2 Radioterapia

La radioterapia consiste en el uso de radiaciones ionizantes sobre un área en concreto del organismo. La radiación emitida por el acelerador actúa sobre el área tumoral creando daños en el ADN que evitan que las células cancerosas crezcan o proliferen e inducen su muerte. La dosis, la duración y el área a tratar es específica para cada paciente. Es un tratamiento complementario a la cirugía, se puede aplicar antes para reducir el tamaño del tumor o después para evitar la recidiva. Existen distintos tipos de radioterapia: i) *Radioterapia de rayos externos (EBRT)*, dónde la radiación es emitida desde una máquina situada fuera del cuerpo, ii) *Radioterapia interna o braquiterapia*, dónde la fuente radiactiva se coloca dentro del recto, al lado (endocavitaria) o dentro (intersticial) del tumor, reduciendo los efectos nocivos a los tejidos sanos circundantes, y iii) *Radioembolización*, se usa principalmente para tratar el cáncer de colon o de recto que se ha propagado al hígado generando masas tumorales de más de 5cm de ancho. Consiste en la administración de esferas radiactivas en la arteria hepática que se alojarán en los vasos sanguíneos cercanos al tumor y emitirán radiaciones durante varios días. No es un tratamiento que se use habitualmente para tratar el cáncer de colon, generalmente se usa cuándo éste se ha propagado a otras áreas como pulmones, cerebro o huesos. En el cáncer de recto se usa como *tratamiento neoadyuvante* previo a la cirugía para reducir el tamaño y facilitar la extracción del tumor, durante la cirugía como *radioterapia intraoperativa* para eliminar células cancerosas remanentes o tras la cirugía, sola o en combinación con la quimioterapia, para evitar recidivas. También se suele usar para ayudar a controlar el cáncer rectal en aquellas personas que no pueden someterse a cirugía. Como efectos secundarios principalmente se encuentra que también afecta a células normales no tumorales,

irritación de la piel, dificultar para la cicatrización tras la cirugía, fibrosis y adherencias entre los tejidos del área tratada, náuseas, irritación rectal e incontinencia intestinal [106,127].

1.2.6.2 Tratamientos sistémicos

1.2.6.2.1 Quimioterapia

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos con actividad antitumoral. Afectan a las células que se están dividiendo rápidamente, como las células cancerosas, alterando su funcionalidad y favoreciendo su destrucción. Se administra en ciclos, con un periodo de descanso entre los ciclos para permitir la recuperación del paciente ya que es un tratamiento muy agresivo. Según el momento en el que se administre el tratamiento contra el CCR se diferencia en: i) quimioterapia neoadyuvante, la que se administra antes de la cirugía para reducir el tamaño del cáncer; ii) quimioterapia adyuvante, la que se administra tras la cirugía con el objetivo de destruir células cancerosas que hayan podido quedar tras la cirugía o iii) quimioterapia para reducir el tamaño del tumor diseminado en otros órganos y aliviar los problemas del paciente [106].

Los principales fármacos aprobados en España para el tratamiento contra el cáncer colorrectal son:

- 5-Fluoracilo (5-Fu): Según la agencia española del medicamento, el 5-Fu es un análogo del uracilo que es una base nitrogenada del ARN. Interfiere en la síntesis de ADN al inhibir la conversión del uracilo a timina. También puede interferir con la síntesis de ARN y síntesis proteica. Debido a que interfiere en la síntesis de ADN o ARN provoca daños en la división y crecimiento celular lo que deriva en apoptosis. Se administra por vía intravenosa. Se autorizó por primera vez en España en diciembre de 2010 [128].
- Capecitabina: Es un precursor del del 5-Fu. La enzima responsable de la conversión final a 5-Fu se encuentra incrementada en tejidos tumorales. Se administra vía oral. Se autorizó por primera vez en España en el año 2012 [129].

-
- Oxaliplatino: Es un fármaco compuesto por un átomo de platino unido a un diaminociclohexano y a un grupo oxalato. Los metabolitos derivados de su biotransformación interactúan con el ADN formando puentes inter o intracatenarios impidiendo la síntesis de ADN y resultando en actividad antitumoral. Es administrado en combinación con 5-Fu, por vía intravenosa y siempre antes de la administración de 5-Fu [130].
 - Irinotecán: Es un derivado de la camptotecina que actúa como inhibidor específico de la ADN topoisomerasa y produce lesiones en el ADN monocatenario que bloquean la horquilla de replicación del ADN produciendo el efecto citotóxico sobre las células tumorales. Se administra vía venosa solo o en combinación con otros quimiofármacos. Se autorizó por primera vez en diciembre de 2007 [131].
 - TAS-102: Es una combinación de dos fármacos. La trifluridina que se incorpora al ADN y provoca la muerte celular, y el tipiracil hidroclicorídrico que inhibe la enzima encargada de degradar la trifluridina. En estudios preclínicos ha demostrado efecto antitumoral en células cancerosas resistentes al 5-Fu. Los estudios clínicos son consistentes con los estudios preclínicos [132]. Se autorizó por primera vez en España en abril de 2016 [133].
 - Raltitrexed: Presenta un potente efecto inhibitorio frente a la enzima timidilato sintetasa, enzima clave en la síntesis de trifosfato de timidina, un nucleótido requerido para la síntesis del ADN. La inhibición de esta enzima supone la fragmentación del ADN y consecuente muerte celular. Se administra vía intravenosa en combinación con otros quimifármacos. Se autorizó por primera vez en España en marzo de 1997 [134].

1.2.6.2.2 Terapia dirigida

Debido a la gran cantidad de efectos secundarios que derivan de la quimioterapia se han desarrollado alternativas más específicas como la terapia dirigida que se centra en la inhibición de vías distintas vías implicadas en el desarrollo del tumor. Entre ellas encontramos el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que juega un papel fundamental en la supervivencia celular, proliferación y migración del

tumor. El bevacizumab, ramucirumab o el ziv-aflibercept son anticuerpos monoclonales o una proteína recombinante en el último caso, que inhiben al VEGF o su receptor VEGFR2, y por tanto consiguen reducir la angiogénesis. Se usan en combinación con quimioterapia para tratar el cáncer de colon metastásico. El cetuximab y panitumumab se usan para inhibir la activación de la familia de receptores de tirosinas quinasas (EGFR) que cuando se activan estimulan la proliferación celular, angiogénesis, migración, supervivencia y adhesión de las células tumorales. Los pacientes con cáncer de colon y metástasis que peor pronóstico presentan son aquellos que tienen mutado BRAF, el encorafenib es el único fármaco de terapia dirigida aprobado por la FDA para tratar este tipo de metástasis [108,135].

Otro tipo de estrategias innovadoras frente al CCR son la inmunoterapia que no busca atacar directamente la célula tumoral, sino de activar al sistema inmune del organismo para que este la ataque. El fármaco nivolumab es un inhibidor del receptor de muerte programada (PD-1) de las células T del sistema inmune, sobreexpresado en CCR. La terapia génica supone el uso del ácido nucleico en la reparación o sustitución de genes disfuncionales. La principal ventaja que presenta es la capacidad de transferir genes a las células tumorales mediante retrovirus que inhiban el gen mutado y detengan la progresión del tumor. La nanotecnología supone un avance en la liberación del fármaco que ha demostrado ser efectiva en la liberación de diversas moléculas en el microambiente tumoral, suponiendo una reducción de efecto citotóxico y un incremento de su efectividad frente las células tumorales. La mayoría se encuentran aún en desarrollo [108,114].

1.2.6.3 Compuestos naturales en la prevención y/o tratamiento del CCR

Recientes estudios establecen una relación entre distintos compuestos naturales con la prevención y tratamiento del cáncer debido a su efecto sobre la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis y metástasis de células cancerígenas ADN [113,121,136,137]. A continuación, se detallan los mecanismos de acción por el cual diversas moléculas naturales ejercen un efecto antiproliferativo

frente al CCR. Generalmente, no tienen efecto solamente sobre una de las vías mencionadas, sino que son capaces de ejercer su efecto antiproliferativo mediante diversas de ellas:

- Regulación de la proliferación celular: El ciclo celular esta estrictamente controlado con diversos puntos de control secuenciales, para asegurar que la célula se replica de forma correcta. Muchos compuestos naturales han demostrado ser eficaces frente la proliferación descontrolada de células cancerígenas al controlar la mitosis o el ciclo celular. Por ejemplo, el sulforrafano induce la parada del ciclo celular en la fase G2/M de la línea celular HCT116. Lawsonaringenin, un flavonoide induce la parada del ciclo en fase S y apoptosis. El extracto de *Iberis amara* inhibe crecimiento celular al parar el ciclo en G2/M en la línea celular HT-29 al disminuir la concentración de proteínas reguladoras del ciclo celular como son las ciclina A2 o B3 y CDK2, 4, 6 [138].
- Regulación de la migración o invasión de células tumorales: La metástasis es un proceso que conlleva múltiples procesos como la adhesión, migración, invasión y degradación de la matriz extracelular que rodea el órgano objetivo. La curcumina o el α -hederin inhiben la síntesis de IL-6 asociada a la disrupción de la vía JAK/STAT involucrada en la progresión e invasión del tumor [138].
- Regulación de la apoptosis: La apoptosis presenta dos vías de regulación: la intrínseca o vía mitocondrial que supone una cascada de caspasas que liberan citocromo C y producen muerte celular, o la extrínseca que supone la activación de receptores de muerte celular como FasL/CD95 o TRAIL. La mayoría de los compuestos bioactivos actúan mediante la vía intrínseca al generar ROS que induce una pérdida en el potencial de membrana mitocondrial y activa las caspasas que deriva en fragmentación del ADN y apoptosis. Entre las moléculas que han demostrado este efecto se encuentra la quercetina, ricardin, cardol o hederagenin. Aunque también pueden promover la vía extrínseca como las proantocianinas, o inducir ambas vías de

muerte celular [138].

- Regulación de la autofagia: La autofagia es un tipo de muerte celular programada activada en respuesta a diversos estímulos como son el estrés oxidativo, hipoxia, estrés del retículo endoplasmático o acumulación de ROS [138]. Extractos etanólicos de semillas de *Moringa oleífera* y *Tropaeolum tuberosum* produjeron la muerte celular por autofagia en la línea celular HCT-15 [136].
- Regulación de la angiogénesis: La angiogénesis es un proceso de neovascularización para proveer de nutrientes y oxígeno a los tejidos. El VEGF y su receptor, así como moléculas extracelulares como la IL-8, el TNF α , o el PDGF juegan un papel fundamental en la angiogénesis [138]. El Resveratrol reduce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la angiogénesis [121].
- Regulación de cambio epigenéticos: Las moléculas de origen natural pueden regular factores epigenéticos como son la metilación del ADN, la expresión de microARN o la modificación de histonas, que derivan en el desarrollo o crecimiento del tumor. Los glucosinolatos como el sulforrafano (SFN) han demostrado un efecto significativo frente a los cambios epigenéticos que promueven el desarrollo del tumor. Estudios *in vitro* demuestran que el tratamiento con SFN es capaz de reducir la expresión de enzimas responsables de la metilación del ADN como DNMT, promoviendo la apoptosis de las células cancerosas. en la reducción de enzimas desacetilasas, responsables de la desacetilación de las histonas unidas al ADN que reduce la expresión del gen, lo que supone un aumento en la expresión de genes supresores de tumores, inhibiendo el desarrollo del cáncer y promoviendo apoptosis o parada del ciclo celular [112]. Varias moléculas naturales han demostrado un efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas debido a la regulación de microARNs mediante cambios epigenéticos, por ejemplo, la quercetina regula los niveles de microARN de la familia let-7, inhibiendo la proliferación o propagación del tumor. La curcumina es capaz de inhibir la

expresión de oncogén miR-21, y aumentar la expresión de grupos de micro ARN involucrados en la inhibición de la proliferación celular como miR200, miR185b o let-7 [113].

Por otra parte, su capacidad antioxidante protege las células de los radicales libres que podrían causar alteración en el ADN [113,121]. Son capaces de inhibir la vía Wtn/ β -catenina reduciendo la habilidad de las csc de autorrenovarse, este efecto es de suma importancia para prevenir las recidivas, ya que las csc son resistentes a la quimioterapia. Pueden ejercer su efecto al modular el metabolismo de las células cancerígenas al alterar el ciclo del ácido tricarboxílico o la generación de lactato que promueve apoptosis, reduciendo la captación de glucosa de las células cancerígenas y afectando a su crecimiento o la expresión de GLUT1 reduciendo la disponibilidad de carbohidratos en estas células y disminuyendo su capacidad de invasión [139].

Los polifenoles son compuestos ampliamente estudiados que están presentes en la mayoría de los alimentos de origen vegetal, se han descrito como potentes antioxidantes lo que se asocia con mejoras en ciertas enfermedades crónicas como las enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, diabetes o el cáncer. Este efecto es debido principalmente a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria que en el caso del cáncer controla la proliferación celular y actúa como regulador negativo de la mutagénesis. Entre los polifenoles más estudiados en la prevención y o tratamiento del CCR encontramos epigallocatequina gallate (EGCG) que ha demostrado capacidad antiproliferativa frente al CCR al impedir la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) y, en consecuencia, la inhibición del crecimiento del tumor. También ha demostrado un efecto en la reducción de los niveles de β catenina reduciendo la migración tumoral, así como los niveles de COX-2 y citoquinas proinflamatorias como el TNF α . El Resveratrol es otro polifenol que muestra efectos anticancerígenos en los distintos estadios de la carcinogénesis. Principalmente, su efecto antioxidante y antiinflamatorio reduce las lesiones derivadas del estrés oxidativo, además previene la activación del (EGF), reduce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la

angiogénesis [121]. El estudio clínico llevado a cabo por Mori et al. [140] muestra que la ingesta de tres polifenoles derivados del café ha mostrado un descenso significativo en el riesgo de desarrollar CCR.

1.2.6.4 Brasicáceas como fuente de compuestos bioactivos

Las especies vegetales de la familia brasicáceas, también conocida como crucíferas, incluye entre 338-360 géneros y 3709 especies [141]. Es una familia distribuida y consumida mundialmente de gran importancia económica y nutricional. Se han reportado numerosos efectos beneficiosos sobre la salud derivados del consumo de estos vegetales, debido principalmente a su composición fitoquímica. Además, presentan gran valor nutricional con un alto contenido proteico, presencia de vitaminas, fibra y minerales y baja cantidad de grasas y calorías [117].

Entre los compuestos fitoquímicos identificados en esta familia encontramos polifenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenos, alcaloides, fitoesteroles, terpenos y glucosinolatos. Cabe destacar que estos compuestos están presentes de forma natural en las plantas, aunque su presencia o abundancia varía entre especies o incluso en una misma especie que ha sido cultivada bajo diversas condiciones o durante el proceso de germinación [117,142]. Los compuestos fenólicos presentes en la brasicáceas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud debido a su capacidad antioxidante, anticancerogénica, antiagregación y capacidad para inducir las enzimas detoxificantes. Los compuestos fenólicos más representativos son los flavonoides como la quercetina, kaemferol, isorhamnetin y cianidin o los ácidos hidroxicinámicos como el ácido ferúlico, sinapico o cafeico [143]. Los glucosinolatos son los compuestos organosulfurados presentes en todas las brásicaceas, que se activan en respuesta al estrés o daño en la planta y son hidrolizados por la enzima mirosinasa a isotiocianatos (ITCs), a los que se les atribuye la mayoría de los efectos fisiológicos sobre la salud humana. Existen más de 120 tipos, su concentración está determinada por factores genéticos, pero su abundancia la determinan factores ambientales [142–144].

Gracias a estos compuestos bioactivos, los extractos procedentes de brasicáceas, así como sus compuestos fitoquímicos de forma aislada, son capaces de reducir el estado inflamatorio del organismo al inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 o TNF α , promover la concentración de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 o mediante la reducción de la activación de vía de señalización NF-KB. También presentan un efecto antioxidante disminuyendo la presencia de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno por captación, inhibición de su producción o activación de enzimas antioxidantes, favoreciendo así el estado de estrés oxidativo presente en esta patología. Todos estos estudios han sido recopilados recientemente por Cicio et al. [117] dónde se muestra el efecto antioxidante y antiinflamatorio, tanto *in vitro* como *in vivo*, de extractos o moléculas derivadas de las Brasicáceas.

El efecto antiproliferativo *in vitro* frente al cáncer colorrectal de extractos vegetales provenientes de la familia brasicácea, o de sus compuestos aislados, ha sido estudiado por este grupo recientemente mediante revisión bibliográfica. Los principales resultados que se han obtenido son que el género Brásica es sin duda el más estudiado, seguido por el género *Raphanus*, *Lepidium*, *Sinapis* y *Eruca*. El etanol es el solvente más utilizado para la extracción de los principios bioactivos, y la parte más utilizada para la realización de estos extractos son las hojas o las flores. El efecto antiproliferativo de la mayoría de estos extractos se asocia a su capacidad para inducir la apoptosis o la modificación del ciclo celular [144]. En concreto, son capaces de inducir apoptosis de las células tumorales mediante diversos mecanismos: (a) vía mitocondrial, como el extracto procedente de *B. rapa* es al incrementar la expresión de p53 o inhibir la expresión de proteínas antiapoptóticas (bcl-2); (b) vía calpaína; (c)

activación de caspasas o (d) degradación de PARP (Figura 13).

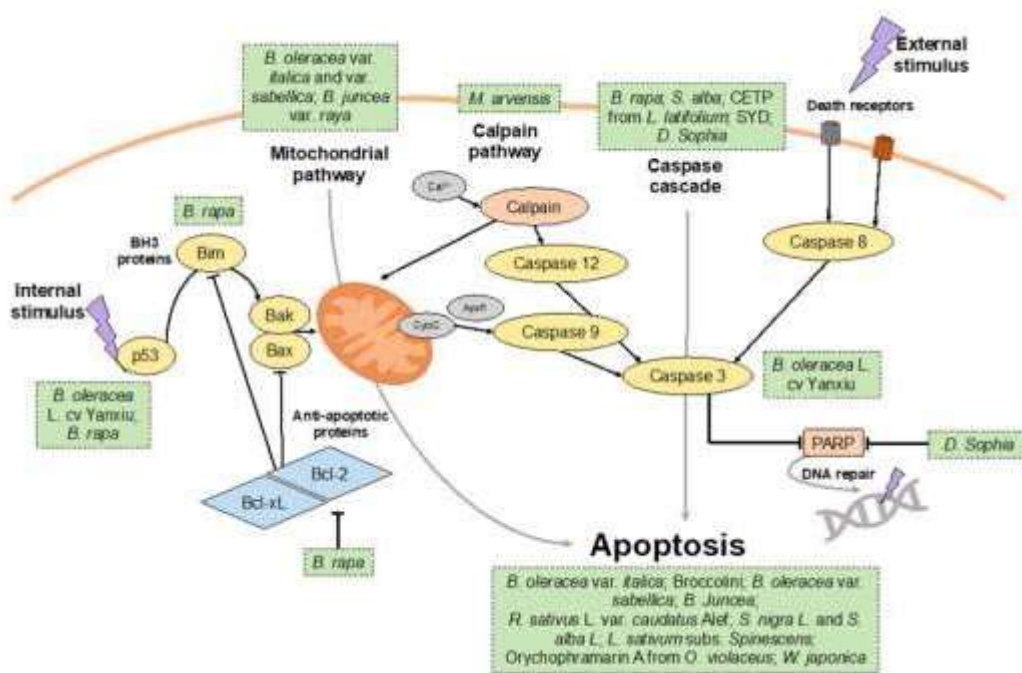


Figura 13. Mecanismos de acción de inducción de apoptosis en extractos vegetales procedentes de Brassicáceas [144].

En la **Figura 14** se muestran el efecto sobre la modulación del ciclo celular en células de cáncer de colon de extractos naturales procedentes de la familia Brassicáceas. Los extractos de *B. oleracea* var. *italica* y var. *sabellica*, *N. officinale*, *D. Sophia* y la molécula Orychophramarin A procedente del extracto de *O. violaceus* inducen la detención del ciclo celular G2/M. Específicamente, *D. Sophia* disminuyó la expresión de cdc2/cdk1 y ciclina B1 y aumentó la expresión de la proteína p21. Los extractos de *B. oleracea* var. *italica* y var. *sabellica* mostraron una detención del ciclo celular G2/M asociados con una disminución en el porcentaje de células en la fase G1/G0. También se ha relacionado un incremento en el porcentaje de células en el sub G1 con extractos de *B. oleracea* var. *italica*.

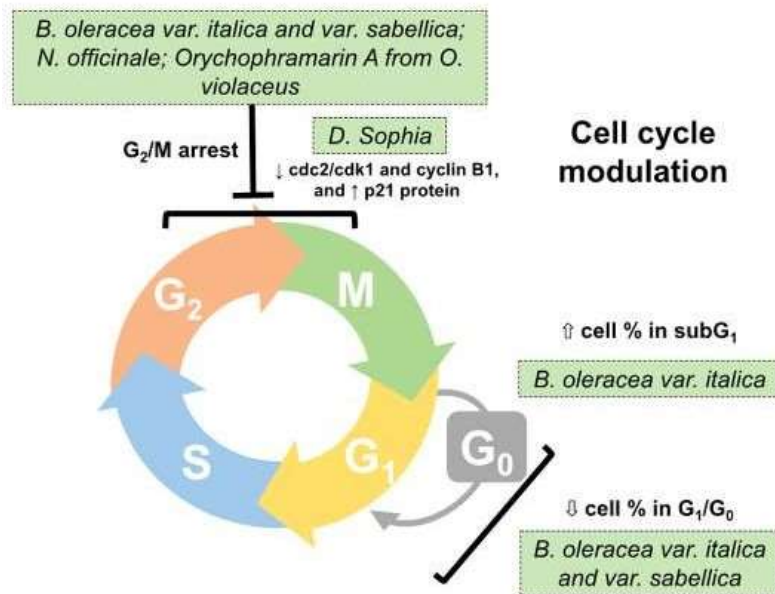


Figura 14. Modulación del ciclo celular en células de cáncer de colon mediante extractos naturales de la familia Brasicáceas [144].

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Dada la alta prevalencia de la obesidad y el cáncer de colon, dos patologías no transmisibles, altamente relacionadas con factores ambientales como la dieta que consumimos y el sedentarismo, se plantea la siguiente **hipótesis**: el uso de extractos funcionales de origen vegetal y la realización de un protocolo de ejercicio físico pueden conformar herramientas claves en la prevención y/o el tratamiento de la obesidad y el cáncer colorrectal.

2.2 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis doctoral es obtener extractos funcionales derivados de *Brasicaeaceas* y otras especies vegetales, que puedan ser usados para la prevención y/o el tratamiento de la obesidad y alteraciones asociadas y del cáncer colorrectal, administrados de forma aislada o en combinación con la realización de un protocolo de ejercicio físico.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener extractos funcionales de *Brasicáceas* y otras especies vegetales procedentes de residuos de la industria agroalimentaria.
2. Estudiar la capacidad antioxidante, el rendimiento de extracción y la capacidad antiproliferativa de las distintas especies vegetales y de *Brasicáceas* crudas y germinadas.
3. Desarrollar nutraceuticos a partir de los extractos con mayor capacidad antioxidante, mayor rendimiento de extracción y mayor capacidad para inducir enzimas detoxificantes.
4. Identificar los principales compuestos bioactivos presentes en los nutraceuticos desarrollados.
5. Determinar la capacidad antioxidante y el potencial de digestibilidad de los nutraceuticos.

-
6. Estudiar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y detoxificante de los nutraceuticos.
 7. Desarrollar en el ratón C57BL/6J modelos experimentales de obesidad y cáncer colorrectal.
 8. Estudiar el efecto de la administración del nutraceutico sobre el metabolismo glucídico y lipídico, parámetros de inflamación y estrés oxidativo y la disbiosis intestinal en el modelo experimental animal de obesidad inducida por la dieta solo o en combinación con un protocolo de ejercicio.
 9. Evaluar el efecto preventivo del nutraceutico desarrollado, de forma aislada o combinado con la realización de un protocolo de ejercicio físico en el modelo experimental animal desarrollado.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Todo el material vegetal usado en esta tesis doctoral fue cedido por el grupo empresarial de biotecnología Beyond Seeds, S.L. (Almería, España). Tras su recepción, todo el material se sometió a un proceso de molido hasta conseguir un tamaño de partícula entre 100 y 150 μm , y se mantuvo a -20°C para su posterior procesado. En esta tesis doctoral, se han estudiado un total de 28 muestras, centrándonos en la familia *Brassicaceae* que supone casi un 30% del total.

Para el estudio del efecto de un nutraceutico sobre la prevención del cáncer de colon, el estudio se ha centrado en la familia *Brassicaceae*, incluyendo tres géneros, tres especies, y tres variedades botánicas de la especie *Brassica oleracea*, sometiéndose todas ellas a un proceso de germinación (**Tabla 5**), mientras que en el caso de los experimentos relacionados con el tratamiento del desarrollo de la obesidad y sus patologías asociadas se incluyeron 9 familias, 16 géneros y 19 especies distintas, recogidas en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Listado de especies estudiadas en el ensayo experimental del CCR.

Familia	Género	Especie	Nombre común
Brassicaceae	Brassica	<i>Brassica oleracea var. sabellica</i>	Kale
		<i>Brassica oleracea var. italica</i>	Brócoli
		<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>	Coliflor
	Eruca	<i>Eruca sativa</i>	Rúcula
	Sinapis	<i>Sinapis alba</i>	Mostaza

Tabla 6. Listado de especies estudiadas en el ensayo experimental de obesidad.

Familia	Género	Especie	Nombre común	Material
		<i>A. ampeloprasum var porrum</i>	Puerro	Semillas
Amarillidaceae	<i>Allium</i>	<i>Allium cepa</i>	Cebolla roja	Semillas
		<i>Allium cepa</i>	Cebolla blanca	Semillas
Apiaceae	<i>Eryngium</i>	<i>Eryngium maritimum</i>	Cardo marítimo	Semillas
		<i>Eryngium bourgatii</i>	Cardo blanco	Semillas
		<i>Eryngium campestre</i>	Cardo corredor	Semillas
Araceae	<i>Lemna</i>	<i>Lemna minor</i>	Lenteja de agua	Planta
	<i>Spirodela</i>	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Lenteja de agua	Planta
Brassicaceae	<i>Camelina</i>	<i>Camelina sativa</i>	Camelina	Semillas
	<i>Brassica</i>	<i>B. oleracea var gemmifera</i>	Col de Bruselas	Semillas
		<i>B. oleracea var gongyloides</i>	Colirrábano	Semillas
Cucurbitaceae	<i>Cucumis</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Pepino	Semillas
	<i>Cucurbita</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	Calabacín	Semillas
Fabaceae	<i>Psoralea</i>	<i>Psoralea corylifolia</i>	Badchi	Semillas
	<i>Cicer</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	Semillas
	<i>Pisum</i>	<i>Pisum sativum</i>	Guisante	Semillas
	<i>Vicia</i>	<i>Vicia sativa</i>	Veza	Semillas
Lamiaceae	<i>Ocimum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca <i>lc.</i>	Semillas
		<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca <i>m.</i>	Semillas
Sapotaceae	<i>Argania</i>	<i>Argania Spinosa</i>	Argán	Fruto
Solanaceae	<i>Capsicum</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Pimiento	Semillas
		<i>Capsicum annuum</i>	Jalapeño	Semillas
	<i>Solanum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	Semillas

lc, ligurecert; m, mammolo.

3.2 GERMINACIÓN

La germinación de las semillas se ha llevado a cabo en el departamento de Agronomía de la Universidad de Almería, en el grupo de investigación AMAZA

Agricultura y Medio Ambiente en Zonas Áridas (RNM151), bajo la supervisión de José Miguel Guzmán Palomino.

Previo a la germinación, las semillas de *Brasica oleracea var. sabellica*, *Brasica oleracea var. itálica*, *Brasica oleracea var. botrytis*, *Eruca sativa* y *Sinapis alba* se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 min y se enjuagaron en agua destilada tres veces para eliminar cualquier patógeno. Después de la desinfección, las semillas se secaron a la sombra durante dos semanas, luego se almacenaron, en condiciones de calor y sequedad de laboratorio (25°C, 50% HR), antes de su germinación [145]. Para la germinación, se colocaron 20g de semillas en cada bandeja de 7.5 x 34cm del germinador Easygreen EGL 55, con un total de 5 bandejas por especie germinada. Se controlaron las condiciones de humedad y oxigenación óptimas para la germinación de las semillas mediante un filtro de aire, y un temporizador que aplicó 3 riegos de 15 min cada 24h, en forma de aspersión.

3.3 EXTRACTOS FUNCIONALES

3.3.1 Extractos etanólicos

Para concentrar y extraer los compuestos fenólicos, se pesaron 5 g de harina de semilla de cada una de las especies vegetales y se mezclaron con 10-20mL de solución extractora, según la capacidad de retención de agua que presentó la muestra. La solución extractora que se utilizó estaba compuesta por 50% etanol, 50% agua bidestilada y 0.25% ácido clorhídrico 12N (50:50:0.25).

La mezcla obtenida, se homogenizó mediante un sonicador (VibraCell 75185), a 54 Hz durante 30 s, para conseguir la disrupción del tejido vegetal, mediante perforación de paredes y membranas celulares, así como una rotura de las partículas. Este proceso se repitió dos veces, dejando 15 s entre cada una de las sonicaciones para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.

La extracción de los compuestos bioactivos se realizó durante 30 min, en agitación constante, a 4°C, pH ácido (pH 2) y en una atmósfera reductora con nitrógeno gaseoso. Trascurrido el tiempo, la solución se dejó reposar durante 5 min, y se

centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, a 4°C. Tras ello, se conservó el sobrenadante y se reutilizó el pellet para repetir el procedimiento de extracción.

Para conocer el rendimiento y la concentración del extracto, se tomaron alícuotas de 1 mL y se evaporó el etanol en un evaporador por vacío (Savant ADN120 SpeedVac Concentrator, ThermoSci) (Eppendorf Concentrator 5301). Se dejó a -20°C durante 24 h para comprobar que se ha producido toda la evaporación del etanol y, se tomaron alícuotas con volumen conocido liofilizándose durante 24 h (liofilizador TELSTAR Cryodos-50). A continuación, se calculó el peso seco del extracto sustrayendo el peso del tubo vacío menos el peso del tubo con la muestra liofilizada para conocer el rendimiento de extracción en mg/mL y teniendo en cuenta el peso de harina utilizada para conocer el rendimiento en mg/g de harina el rendimiento.

3.3.2 Extractos acuosos e Hidrolizados proteicos.

Se procedió a realizar un hidrolizado proteico de todas las harinas de semillas utilizadas en el ensayo relacionado con el cáncer de colon y las especies vegetales utilizadas en el ensayo sobre la obesidad de *Psoralea corylifolia* y *Spirulina polyrhiza*. En concreto, se utilizaron estas dos especies vegetales para los ensayos relacionados con la obesidad por su alto contenido proteico, en comparación con el resto de las especies vegetales y para obtener el mayor rendimiento y mayor concentración de péptidos bioactivos.

Para proceder a la hidrolisis proteica se extrajo previamente la proteína de cada harina y especie vegetal. Para ello, se pesaron 25 g de muestra y se mantuvieron en agitación constante con 100 mL de agua destilada, a pH 8.8 y 37° C, durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se dejó precipitar la mezcla durante 5 min, y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se mantuvo en un baño de agua a 47°C. El pellet se sometió a un nuevo proceso de extracción, y tras finalizar ambos sobrenadantes se mezclaron y se dejaron 15 min a 47°C para comenzar la hidrólisis de las proteínas. Además, se añadieron los cofactores CaCl₂ 0.1M y MgSO₄ 0.1M al 0.1%. Tras ello, se ajustó el pH a 8.8 y se añadió una primera proteasa procedente de *Bacillus licheniformis* (P4860, Sigma Aldrich) en relación 0.3 AU por

gramo de proteína, controlando las condiciones deseadas para su correcto funcionamiento (agitación constante, temperatura de 47 °C y pH \geq 8.5) durante 30 min. Por último, se añadieron 500 U/g proteína de la enzima procedente de *Aspergillus oryzae* (P6110, Sigma Aldrich) bajo las mismas condiciones. Tres alícuotas de volumen conocido, tanto de la extracción proteica como de su posterior hidrolisis, se liofilizaron para conocer la concentración y rendimiento de los diferentes hidrolizados proteicos.

Determinación de la concentración de proteína

La cantidad de proteína presente en cada extracto proteico y en los hidrolizados se determinó mediante el método de [146] con pequeñas modificaciones. Se utilizó una recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) de 0 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El método consistió en añadir a cada pocillo 200 μL del reactivo de Cu alcalino (compuesto por 10 μL de Cu_2SO_4 al 1 %, 10 μL de Potasio Sodio Tartrato 4-hidrato al 2 % y 1000 μL de Na_2CO_3 2%/ NaOH 0.1 N) más 50 μL de muestra o concentración de la recta patrón e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se añadieron 50 μL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua miliQ en relación 1:4 y se incubó durante 30 min. Finalmente se midió la absorbancia a 750 nm. Cada muestra se midió por cuadruplicado y los resultados fueron expresados como μg de proteína/ mg de muestra mediante extrapolación de la absorbancia de la muestra con la recta patrón, la cual se ajusta a un modelo matemático de ecuación polinómica.

3.4 PRUEBAS QUÍMICAS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Todas las pruebas químicas se han determinado por cuadruplicado en cada muestra.

3.4.1 Polifenoles totales

Para la determinación de los polifenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Dewanto et al.[147]. Los polifenoles son capaces de reducir el reactivo de Folin-Coicalteu (formado por dos sales en pH ácido), de color amarillo a color azul cuya intensidad es proporcional al contenido en polifenoles y es medida mediante espectrofotometría. Como referencia se utilizaron diferentes

concentraciones de ácido gálico (0-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para preparar la recta patrón, y los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido gálico (AG) por miligramo de extracto ($\mu\text{g eq AG}/\text{mg extracto}$).

La determinación se llevó a cabo en tubos de ensayo, dónde se mezclaron 500 μL de agua bidestilada, 125 μL de muestra (extracto etanólico, hidrolizado proteico, nutracéutico formulado o productos de la digestión in vitro) convenientemente diluida o concentración de la recta patrón de ácido gálico y 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agitó la mezcla y se dejó incubar durante 6 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 1250 μL de la solución 10% $\text{Na}_2\text{CO}_3/ 1\text{M NaOH}$ y 1000 μL de agua bidestilada. Se procedió a la mezcla de la solución con un vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min evitando su exposición directa a la luz.

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia de cada muestra mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 760 nm utilizándose para ello un espectrofotómetro adaptado para placas de 96 pocillos (MultiskanTMFC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China).

3.4.2 ABTS

Los compuestos cromógenos como el ABTS, son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, ayudando a paliar los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación. El radical libre de ABTS tiene que ser generado tras una reacción química o enzimática, siguiendo el método descrito por Miller et al. [148]. En este caso, el radical ABTS^+ se generó tras la reacción química de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (4.9 mM). El persulfato desaparece el ABTS, formando así el compuesto activo. La decoloración del reactivo ABTS es determinada por la capacidad de los compuestos fenólicos de captar el radical libre de ABTS^+ , es decir, el porcentaje de inhibición del radical. Ambas soluciones se prepararon de forma independiente hasta su completa disolución, se mezclaron y se dejaron incubar durante al menos 4 h a temperatura

ambiente, hasta que todas las moléculas de ABTS reaccionaron y se formó una solución estable de color verde oscuro. Transcurrido el tiempo, la solución se diluyó hasta conseguir una absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 734nm. Una vez estable, se hizo una recta patrón invertida utilizando distintas concentraciones de ácido gálico (0 - 100 µg/mL). Para ello se mezclaron 294 µL de reactivo ABTS en placa de 96 pocillos más 6 µL de cada una de las concentraciones de ácido gálico preparadas para realizar la recta patrón. Después de mezclar la solución se midió su absorbancia a 750 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación del radical ABTS en cada una de las concentraciones de ácido gálico preparadas. Finalmente, tras medir la absorbancia de cada una de las muestras, se extrapola en la recta patrón y se calculó a cada porcentaje de inhibición obtenido qué concentración de equivalentes de ácido gálico correspondían. Los resultados se expresaron finalmente como µg de ácido gálico (µg AG) por mg de extracto.

3.4.3 Capacidad reductora de hierro

Otro método usual para la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto es su capacidad para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . En este caso se utilizó la técnica descrita por Duh et al. [149] con pequeñas modificaciones [150]. Como recta patrón se utilizó ácido gálico a distintas concentraciones, desde 0 a 80 µg/mL. Se mezclaron 500 µL de cada muestra convenientemente diluida o cada una de las concentraciones de ácido gálico utilizadas para construir la recta patrón, con 1.25 mL de tampón fosfato (Na_2HPO_4 / $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) 0.2 M y pH 6.6, y 1.25 mL de ferrocianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) al 1 % en agua bidestilada. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 30 min. Tras la incubación se añadió 1.25 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, se agitaron los tubos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Posteriormente se recogieron 2 mL del sobrenadante y se mezclaron con 2 mL de agua bidestilada y 400 µL de cloruro férrico ($FeCl_3$) al 0.1 %. Por último, se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a 700 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). Los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido gálico por miligramo de extracto usado (µg eq AG/mg extracto).

3.4.4 Capacidad quelante de hierro

Esta prueba mide la capacidad de la muestra para quelar el hierro mediante el protocolo descrito por Decker & Welch [151] con pequeñas modificaciones. Se mezclaron 1630 μL de la solución 2-[4-(2-sulfonilo) piperazin-1-il] ácido etanosulfónico o PIPES 0.15 N pH 6.5 con 335 μL de muestra convenientemente diluida o agua bidestilada que se utilizó como el blanco de la prueba y 35 μL $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el periodo de incubación, las muestras y el blanco se centrifugaron a 3000 rpm durante 7 min a temperatura ambiente. En cada pocillo de una placa de 96, se añadieron 253 μL de sobrenadante, 13 μL de agua bidestilada y 17 μL de ferrocina ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), se agitó e incubó durante 10 min y posteriormente, se midió su absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placas (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). La ferrocina reacciona con el hierro libre que no ha sido acomplejado por la muestra, dando una tonalidad rosa-fucsia. Los resultados se expresaron como unidades de capacidad quelante (UCQ), dónde una unidad correspondió al 50% de inhibición de la captación del hierro libre. El porcentaje de inhibición se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - [100 \cdot (A_1 / A_0)]$$

A_0 = absorbancia del control.
 A_1 = absorbancia de la muestra.

3.4.5 Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos, los cuales son moléculas susceptibles a este proceso al contener en su estructura molecular abundante cantidad de dobles enlaces de hidrógeno. El fundamento de la prueba es determinar la capacidad de inhibición de un determinado compuesto sobre la peroxidación lipídica que se produce en un órgano, en este caso homogeneizado de encéfalo de rata. El homogeneizado de encéfalo, utilizado como aceptor de radicales libres, se preparó siguiendo el método de Ohkawa et al. [152] con pequeñas modificaciones. A partir de 1 – 1.2 g de encéfalo de rata se

homogeneizó en tampón 1.15 % KCl / 0.1 % Tritón X-100, en relación 1:10, es decir 10 mL de tampón por cada gramo de muestra. Posteriormente se procedió al centrifugado de la solución a 2000 rpm a 4 °C durante 8 min y se almacenó el sobrenadante a -20 °C hasta su uso.

Para la determinación de la peroxidación lipídica, las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs), fueron determinadas como marcador de estas pruebas en los homogeneizados de cerebro tal y como fue descrito por Ohkawa et al. [152] con modificaciones que a continuación se detallan. La prueba consta de dos fases: primero, se produce una reacción de oxidación donde el objetivo es oxidar al máximo posible el tejido, generando aldehídos, los cuales son susceptibles de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) que será la segunda fase, formando un producto coloreado que se puede medir por espectrofotometría. Esta coloración es proporcional a la peroxidación lipídica del tejido, de manera que, a mayor coloración, mayor peroxidación se ha producido. Para comprobar la capacidad de inhibir la peroxidación de los extractos funcionales preparados, se realizó una incubación previa a la reacción de oxidación del tejido con cada uno de los distintos extractos.

Reacción de oxidación. En tubos Pírex® con tapón de rosca, se mezclaron 1250 µL de KCl 0.15 %, 150 µL de muestra o KCl 0.15% utilizado para preparar el blanco de la prueba, 150 µL homogeneizado de cerebro, 100 µL FeCl₃ 5mM, y 100 µL H₂O₂ 1mM, utilizados como agentes oxidantes. Los tubos se agitaron en vórtex e incubaron en un baño a 37 °C durante 60 min.

Reacción de formación de TBARs. Para parar la reacción de oxidación, se añadieron a los tubos anteriores después de someterse a la reacción de oxidación 1500 µL de ácido clorhídrico (HCl, 0.25 N) / ácido tricloroacético (TCA) 15 %/ ácido dietilentiainopenta acético (DETAPAC) 1.34 mM / butil hidroxitolueno (BHT) 0.5 %, 300 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 8.1 % y 300 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 3 %. De nuevo los tubos se incuban en un baño a 75 °C durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se enfriaron en un baño con hielo durante 5 min para parar

la reacción y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia a 532nm y determinar la formación de TBARs. Los resultados se expresaron en unidades de actividad antioxidante (UAA)/mg de extracto utilizado, dónde una unidad de actividad antioxidante correspondió al 50% de inhibición en la formación de TBARs con respecto al blanco.

3.5 FORMULACIÓN DE NUTRACÉUTICOS

Los nutraceuticos desarrollados fueron formulados de acuerdo a los siguientes criterios:

- i) Selección de extractos funcionales con mejores resultados en las pruebas *in vitro* (mayor rendimiento, mayor capacidad antioxidante en el caso de los ensayos de obesidad y mayor capacidad de inducir las enzimas detoxificantes en el caso de los ensayos de cáncer de colon).
- ii) Los extractos funcionales seleccionados deben ser física y químicamente compatibles.
- iii) Deben presentar ausencia de citotoxicidad,
- iv) La escalabilidad del producto debe ser viable tecnológicamente y,
- v) Debe mantener su actividad funcional tras un proceso digestivo ya que ambos nutraceuticos debían ser suministrados oralmente.

Para que el producto resultante fuera técnicamente viable es necesario que un mayor porcentaje de este estuviera compuesto por hidrolizados proteicos, ya que además de aportar péptidos funcionales, presentan mejores características fisicoquímicas para su liofilización, facilitando así la inclusión del producto final en las dietas experimentales de los animales.

En este trabajo se desarrollaron cuatro nutraceuticos, en función de las características funcionales que se querían conseguir.

En el caso del estudio *in vivo* para el **estudio de la obesidad** se seleccionaron aquellos extractos funcionales que mejor capacidad antioxidante *in vitro* presentaron, así

como un mayor rendimiento de extracción para hacer posible su escalado a nivel industrial. Así, el nutracéutico se formuló con un 40 % de hidrolizado proteico de la semilla de *Psoralea corylifolia*, un 40 % de hidrolizado proteico de *Spirodela polyrhiza*, 10 % de extracto etanólico de semilla de *Camelina sativa* y un 10 % del extracto etanólico de la pulpa del fruto de *Argania spinosa*. Con respecto a los hidrolizados proteicos, además de presentar buenos resultados de capacidad antioxidante, *P.corylifolia* es una fabácea y como tal, presentó un alto contenido proteico así como *S.polyrhiza* que ha sido descrita con un 40 % aproximadamente de contenido proteico en peso seco [153] por lo cual pueden dar lugar a un alto contenido de péptidos bioactivos. *C.sativa* se seleccionó entre todas las especies estudiadas porque presentó una mayor protección antioxidante en cultivo celular, y *A. spinosa* porque presentó la mayor capacidad antioxidante en todas las pruebas químicas realizadas.

Para el **estudio *in vivo* en los ensayos de cáncer de colon** se analizaron sólo especies vegetales pertenecientes a la familia *Brassicaceae* y por tanto el nutracéutico estaba formulado sólo con extractos funcionales procedentes estas especies. Concretamente, aquellos que mostraron mejores resultados en las distintas pruebas químicas de capacidad antioxidante, así como en su capacidad para inducir *in vitro* la actividad de enzimas detoxificantes. En concreto, dos especies mostraron los mejores resultados, y por tanto se seleccionaron para realizar distintas combinaciones con el objetivo de determinar cuál de ellas conservó mejor sus propiedades tras un proceso de digestión *in vitro* y si su combinación presentaba algún efecto sinérgico que potenciara sus propiedades. Por tanto, la composición de los tres nutracéuticos desarrollados fue la siguiente:

NT1: 80% hidrolizado proteico + 20 % extracto etanólico de semillas de *E. sativa*.

NT2: 80% hidrolizado proteico + 20 % extracto etanólico de semillas de *S. alba*.

NT3: 40% hidrolizado proteico + 10 % extracto etanólico de la semilla de *E.sativa* + (40% hidrolizado proteico + 10 % extracto etanólico de la semilla de *S.alba*), tal y como se muestra en la **Figura 15**.

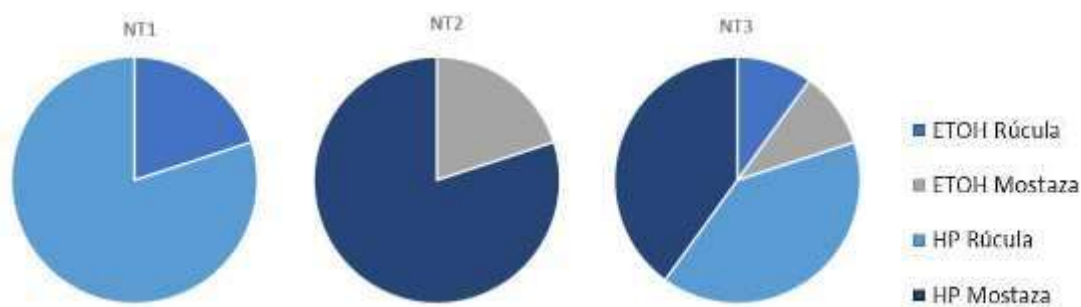


Figura 15. Composición de los distintos nutraceuticos desarrollados para el estudio *in vivo* del cáncer de colon.

3.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.

Para caracterizar el perfil de polifenoles/compuestos bioactivos presentes en los distintos extractos funcionales y nutraceuticos desarrollados se llevó a cabo una cromatografía líquida de alta resolución (UPLC Acquity H Class.Waters) acoplada a un espectrómetro de masas QTOF (Synap G2 Waters), según lo descrito por Martínez et al. [154]. Previo al análisis cromatográfico, cada muestra fue filtrada a través de discos de nylon con un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore). Tras ello, 10 μl de la muestra filtrada se inyectaron en el cromatógrafo consiguiendo la separación analítica de los compuestos bioactivos a través de una columna analítica Acquity Hss T33 (100mm x 2.1mm diámetro interno, 1.8 μm). Para la separación cromatográfica de los compuestos se utilizó un índice de flujo de 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para la fase móvil, y se estableció un gradiente lineal de 18 min hasta alcanzar el 95 % del solvente B, con un tiempo de retraso de 5 min. El gradiente se realizó combinando agua desionizada más 0.5 % de ácido acético (solvente A) con acetonitrilo más 0.5 % de ácido acético (solvente B). Para el análisis espectrofotométrico de alta resolución se llevó a cabo una ionización electronegativa por atomización (ESI-ve, Waters Corporations, Milford, MA, EE. UU.) usando nitrógeno de alta pureza como gas para desolvatación. El espectro resultante fue grabado en un rango de 500-1200 m/z.

Se utilizó para la identificación de compuestos el software MassLynx v4.1. Este programa determina la masa probable que aparece en cada tiempo de retención, así como las diversas fórmulas moleculares que encajan en esa masa, y la probabilidad de que esta fórmula correspondiera con esa masa probable y tiempo de retención. Manualmente se seleccionó la fórmula que mejor se adaptaba a todos los parámetros,

y se obtuvieron sus fragmentos a través de la base de datos ChemSpider® (v2022.0.85.0, Royal Society of Chemistry, Reino Unido). La premisa que se estableció era identificar al menos tres fragmentos para cada compuesto.

3.7 DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

Esta técnica simula las condiciones de una digestión gastrointestinal mediante una técnica en equilibrio de diálisis, y se utilizó para comprobar la digestibilidad o dializabilidad de los nutracéuticos formulados siguiendo el método de Porres et al. [155] y modificado por Martínez et al. [156]. En una primera fase se simuló una digestión gástrica a pH 2, seguida de una compensación de pH hasta pH 7.4, que se haría naturalmente mediante secreción pancreática, y por último digestión y absorción intestinal. Para la digestión gástrica: se pesaron 5 g de cada uno de los nutracéuticos totalmente homogeneizados a los que se adicionaron 100 mL de HCl 0.01 N llevados hasta pH 2 con el mismo HCl 0.1N. Esta solución se dividió en cuatro tubos con 20 mL de la mezcla anterior, y se adicionó 1 mL de solución de pepsina (P-6887, Sigma Aldrich) al 16 % (p/v) diluida en HCl 0.1 N. Esta mezcla se incubó durante dos horas en un baño a 37 °C con agitación constante. Para la compensación del pH y la absorción intestinal se utilizaron membranas de diálisis con un tamaño de poro de 14 kDa (DTV12000.02.30, Medicell Membranes Ltd, Londres) previamente hidratadas en agua doblemente destilada o agua tipo I a 4 °C durante 12 h. Las membranas de diálisis se llenaron con 10 mL de NaHCO₃ con una concentración suficiente para compensar el pH de la solución gástrica y, se colocaron en el interior de cada tubo, incubándose a 37 °C durante 30 min para incrementar el pH hasta 7.4. La proporción de NaHCO₃ y agua necesaria para la compensación del pH se calculó en cada proceso de digestión, porque puede variar según la naturaleza de la muestra utilizada. Seguidamente, se añadieron 5 mL de la solución compuesta por pancreatina y sales biliares para simular la digestión intestinal, concretamente 2.5g de sales biliares y 0.4g de pancreatina en 100mL de NaHCO₃ 0.1N (Sigma-Aldrich). De nuevo los tubos de digestión se incubaron durante 2 h en un baño con agitación a 37 °C. En este punto los componentes digeribles y potencialmente

absorbibles pasaron al interior de la membrana de diálisis (dializados) mientras que el contenido que no absorbible quedó en el exterior de la membrana, estos fueron los retenidos. Estos dos componentes se recogieron y se determinó el pH para comprobar que éste se aproximaba a 7 después del proceso digestivo y se conservaron a -20°C para su posterior análisis. Para esta prueba se utilizó un blanco donde se añadieron todos los componentes, pero en lugar del nutraceutico se añadieron 20 mL de la solución HCl 0.01 N y se sometieron al mismo proceso que el resto de las muestras. Posteriormente se determinaron, tanto el porcentaje de nutraceutico potencialmente absorbible (%), así como la actividad antioxidante mediante las distintas pruebas químicas anteriormente descritas, en los dializados, en los retenidos y en el blanco.

3.8 ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES

Se llevaron a cabo distintos ensayos en diferentes líneas celulares para determinar la capacidad antioxidante, la capacidad antiproliferativa, antiinflamatoria y la capacidad de inducción de la actividad de las enzimas detoxificantes de los extractos funcionales o de los nutraceuticos formulados. Para la determinación de la capacidad antiproliferativa se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de colon humano T84 (sensible a la quimioterapia) que se adquirió de la ATCC (por sus siglas en ingles *American Type Culture Collection*) (Rockville, MD, EE. UU). La línea celular HT-29 Referencia nº. ECACC nº: 91072201 (lote 09K003) fue suministrada por el banco de células del centro de instrumentación científica (CIC) de la Universidad de Granada que también se utilizó para los ensayos de capacidad antioxidante. Para los ensayos de la capacidad antiinflamatoria se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 con número de referencia *TIB-67*, que fue adquirida de la colección americana de cultivos tipo (*ATCC*), concretamente los experimentos con esta línea se llevaron a cabo en el laboratorio de la profesora Stefania Marzocco, de la Universidad de Salerno durante la estancia predoctoral que realicé en su laboratorio.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (D5796, Sigma-Aldrich, Madrid, España) suplementado con un 10 % de

suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (Gibco, Madrid, España) y un 1 % de antibióticos (gentamicina/anfotericina-B+ penicilina/estreptomina) (Sigma Aldrich, Madrid, España). Las distintas líneas celulares se mantuvieron en incubadora a 37 °C y atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.

Para llevar a cabo los experimentos *in vitro* en cultivos celulares se utilizaron los extractos etanólicos con el etanol previamente evaporado, ya que éste resulta tóxico para las células. Los hidrolizados proteicos fueron sometidos a una incubación durante 10 min a 95 °C para inactivar las enzimas proteolíticas usadas durante la hidrólisis.

3.8.1 Ensayos de viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular en los distintos experimentos con cultivos celulares y en función del ensayo que se llevó a cabo se utilizaron diferentes técnicas que se especifican a continuación:

Sulforrodamina B (SRB). Se usó para determinar la supervivencia celular en los experimentos de capacidad antiproliferativa. Brevemente: en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, se añadieron 250 µL de SRB al 0.2 % (Ref. S1402-25G, SigmaAldrich) en ácido acético al 1 %, y se dejó incubar en agitación constante durante 20 min. Después, para que la SRB dejase de actuar las placas se lavaron tres veces con ácido acético al 1 %, el cual se eliminó por decantación y las placas se dejaron secar al aire libre. Por último, se añadieron 250 µL de Trizma® (10 mM, pH 10.5) para solubilizar la SRB, se homogeneizó bien con la pipeta y se midió su densidad óptica a 492 nm (EX-Thermo Multiskan).

Ensayo del Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio, o MTT). Se utilizó para medir el metabolismo celular en las líneas HT-29 y J774A.1 en placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió un 10 % de MTT (0.5%) (Ref. A2231-0005, AppliChem BioChemica) y se dejó actuar durante 3 h, en estufa. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se añadieron 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 25 µL de tampón sorensen (5.8 g de NaOH + 7.5 g de Glicina, pH 10.5 en 100mL de agua bidestilada) en cada pocillo. Se homogenizó

bien con la pipeta para medir su absorbancia a 492 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China).

La viabilidad celular se define como el porcentaje de células vivas y funcionales de una población celular. La viabilidad celular tras el tratamiento con un compuesto se calculó como el porcentaje de células vivas tras la incubación con un compuesto, con respecto al porcentaje total de células vivas sin tratar, y se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Supervivencia celular (\%)} = (\text{Abs células tratadas} / \text{Abs células sin tratar}) \cdot 100$$

3.8.2 Ensayos de capacidad antioxidante *in vitro*

Para conocer la capacidad antioxidante que presenta un extracto frente a un agente oxidante, previamente debemos conocer: i) la concentración máxima del extracto que no produce citotoxicidad, y ii) la concentración del agente oxidante que ocasiona el 50% de la muerte celular. Todas estas determinaciones se llevaron a cabo en la línea celular HT-29, en placa de 96 pocillos en la cual se sembraron 200 μL a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células. Una vez sembradas, las células se incubaron durante 24 h en la estufa para permitir su adhesión y crecimiento, a 37 °C y atmósfera de CO_2 al 5 %. Pasadas las 24 h se cambió el medio completo por medio sin suero bobino fetal, y se incubaron durante otras 24 h. En la **Figura 16** se muestra un esquema del procedimiento.

Determinación no citotóxica del extracto. A las 48 h de la siembra, se añadió el compuesto (extracto o hidrolizado proteico) en concentraciones crecientes, disuelto en medio sin suero, y se dejó incubar durante otras 24 h. Se descartó el medio y se añadió de nuevo medio sin suero durante otras 24 h antes de proceder a la determinación de la viabilidad celular por MTT. Se determinó la concentración máxima del extracto que no induce muerte celular para proceder con los ensayos, es decir la concentración del extracto que no supone menos de un 98% de viabilidad celular.

Determinación de la concentración de agente prooxidante que produce una inhibición celular del 50%. A las 48 h de la siembra, se añadió el agente oxidante

Paraquat o Methyl Viologen Dichloride hydrate (Ref. 856177, Sigma Aldrich) en concentraciones crecientes (5 - 25 mM) en medio sin suero y se dejó incubar durante 24 h antes de medir la viabilidad celular por MTT. Se determinó la concentración de paraquat que produjo la muerte del 50 % de la población celular.

Ensayos de capacidad antioxidante: preincubación. A las 48 h de la siembra, se añadió el extracto a la concentración máxima tolerada que no indujo muerte celular y se dejó incubar durante 24 h. Tras ello, se retiró el medio y se añadió la concentración de Paraquat que inhibió el 50% el crecimiento de la población celular y se incubó durante 24 h. Se retiró el medio y se añadió MTT para medir la viabilidad celular. El grado de protección que el extracto ejerció frente al Paraquat, se midió con respecto al efecto del Paraquat en las células control (sin incubación previa con el extracto).

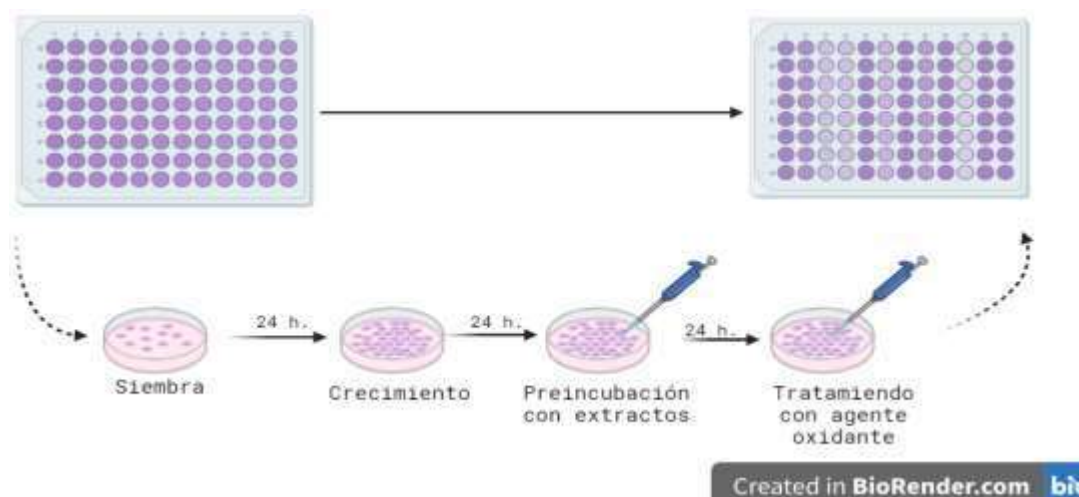


Figura 16. Ensayo de capacidad antioxidante en la línea celular HT-29

3.8.3 Ensayos de capacidad antiinflamatoria

Los ensayos de capacidad antiinflamatoria se llevaron a cabo en la línea celular de macrófagos J774A.1 en placa de 96 pocillos en la cual se sembraron 150 μ L a una densidad de $5 \cdot 10^3$ células / pocillo, en medio de cultivo DMEM y se dejaron incubar 24h para su adhesión y crecimiento. Tras ello, se añadió el extracto a distintas concentraciones no citotóxicas durante 1h. y posteriormente el agente inflamatorio LPS a una concentración de 10 μ g/mL, y se dejan incubar durante 24h más. Finalmente, 100 μ L del sobrenadante del cultivo se mezclaron con 100 μ L del reactivo de Griess formando un complejo con coloración que puede ser medido por

espectrofotometría a 550nm. Como recta patrón se utilizan concentraciones conocidas de NaNO₂.

3.8.4 Ensayos de capacidad antiproliferativa

Los ensayos de capacidad antiproliferativa se llevaron a cabo en ambas líneas celulares (HT-29 y T84), en placa de 48 pocillos en la cual se sembraron 300 µL a una densidad de 5·10³ células / pocillo, en medio de cultivo DMEM. Se dejaron fijar y multiplicar durante 24 h. Tras ello, las células se expusieron a concentraciones crecientes del extracto durante 72 h por triplicado. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se fijaron con 250 µL ácido tricloroacético (TCA) al 10 % durante 20 min a 4 °C. Se eliminó el TCA mediante decantación, y se dejó en una estufa a 37 °C para que el volumen restante se evaporara. Una vez secas, las placas se tiñeron con 250 µL de sulforrodamina B (SRB) para determinar la viabilidad celular. Además, se calculó la IC₅₀ (GraphPad Prism 8 Software, La Jolla, CA, EE. UU).

3.8.5 Determinación de la actividad de enzimas detoxificantes.

Para determinar la actividad de las enzimas detoxificantes glutatión S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR) se recogió la fracción citosólica del cultivo. Este ensayo se realizó en la línea celular HT-29. Para ello se sembraron las células en frascos para cultivo celular de 5 mL (Falcon, Corning) con una densidad de 2.5·10⁶ células·mL⁻¹. Se dejaron incubar durante 24 h para permitir su adhesión y proliferación. Se retiró el medio y las células se lavaron con PBS dos veces, para luego añadir e incubar durante 48 h la máxima concentración del extracto disuelto en medio sin suero, que se calculó previamente como no citotóxica. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se añadió tripsina para poder despegar y recoger las células. Para neutralizar el efecto de la tripsina se añadió el mismo volumen de medio con SBF y cuando se recogieron las células se centrifugaron a 1500 rpm, durante 5 min a 25°C. Se retiró el sobrenadante, mientras que el pellet se volvió a lavar en 500 µL de PBS, y centrifugando bajo las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 µL de

tampón Tris-HCl (25 mM, pH 7.4). Las células se rompieron por sonicación a 54 Hz 3 veces durante 10 s (VibraCell 75185), dejando descansar 10s entre repeticiones para evitar sobrecalentamiento de la muestra. Finalmente se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min a 4 °C y se almacenó el sobrenadante (fracción citosólica) a -80 °C para análisis posteriores. Para cada extracto analizado, se realizaron tres réplicas de forma independiente y el experimento se repitió por triplicado.

3.8.5.1 Determinación de proteína por el método de Bradford.

La concentración de proteínas del sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford (PanReac AppliChem) siguiendo las instrucciones del fabricante para espectrofotómetro de placa. Se utilizó una recta patrón con BSA con concentraciones entre 0 y 500 µg/mL. En cada pocillo se añadieron 200 µL de reactivo Bradford más 20µL de muestra o punto de la recta patrón. Se mezcló e incubó durante 10 min, para posteriormente leer su absorbancia a 595nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China).

3.8.5.2 Determinación de la actividad Glutación-S-Transferasa (GST)

Para la determinación de la actividad de la enzima GST se utilizó 1-cloro2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y glutatión reducido (GSH) como sustratos de la reacción. La GST induce la interacción de ambos sustratos, formando el compuesto GS-CDNB, por lo que su la actividad se mide por un incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Para un volumen de reacción de 1 mL, se preparó una solución con 880 µL de tampón fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$) a 100 mM (pH 6.5), 10 µL de CDNB 100 mM y 10 µL de GSH 100 mM. Esta solución se mezcló y se dejó incubar a 37 °C durante 5 min. En una cubeta de cuarzo semi-micro, 10 mm (Ref. 33910100) se añadieron 900 µL de solución y 100 µL de fracción citosólica del cultivo celular HT-29 (control o tratado con los distintos extractos funcionales, etanolicos o proteicos) o tampón de reacción para el blanco. Se midió la absorbancia de la reacción a 340 nm cada minuto durante 5 min (Evolution 300 UV-Vis Thermo Fisher Scientific™). En cada medida se realizó en paralelo una medida de la muestra y otra medida de la actividad basal del blanco. La actividad se determinó en las diferentes

fracciones citosólicas realizando tres medidas analíticas de cada una de las tres réplicas biológicas. Los resultados se expresaron como unidades de actividad enzimática/mg de proteína. Para conocer la unidad de actividad enzimática se utilizó la siguiente fórmula y posteriormente los resultados se dividieron por los mg de proteína/ mL de cada una de las fracciones citosólicas analizadas:

$$UA/ml = (\Delta Abs/0.0096) * (1/0.1) * Factor\ dilución$$

3.8.5.3 Determinación de la actividad Quinona Reductasa (QR)

En este caso el sustrato utilizado para la determinación de la actividad enzimática de la QR fue el 2,6-dichloroindophenol (2,6-DCIP), que es reducido por la QR. Esta solución presenta un color azul marino, el cual pierde intensidad cuando se reduce. Por tanto, la actividad se mide por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Para una reacción (VF=1mL) se añadieron 881 μ L de tampón Tris-HCl (25 mM, pH 7.4), 60 μ L de albúmina (BSA) 1mg/mL, 2.5 μ L de Tween 20, 5 μ L de Flavina adenina dinucleótido (FAD) 5 mM, 10 μ L de β -nicotianamina adenina dinucleótido (NADH) 0.2 mM y 16 μ L de 2 6-dicloroindophenol (DCIP) 80 μ M. Todos los componentes se mezclaron cuidadosamente y se dejaron incubar durante 5 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 975 μ L de esta solución en una cubeta de cuarzo con fondo negro y 25 μ L de muestra (o tampón para el blanco). Se midió la actividad con una pendiente negativa a 600 nm, cada minuto, durante un total de cinco (Evolution 300 UV-Vis Thermo Fisher Scientific™). En cada medida se realizó en paralelo la medida de la muestra de forma triplicada (réplicas técnicas) de cada una de las tres réplicas biológicas y una medida de la actividad basal del blanco. Los resultados se expresaron como unidad de actividad enzimática por mililitro, calculada usando la siguiente fórmula y finalmente dividiendo entre los mg·mL⁻¹ de proteína de cada fracción citosólica para expresar los resultados como Unidad de actividad (UA):

$$UA/ml = (\Delta Abs/0.0205) * (1/0.025) * FD$$

Donde:

UA: Unidad de actividad· (mg⁻¹ de proteína).

FD: Factor de dilución

3.9 ENSAYOS *IN VIVO*

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales para el Alojamiento y Cuidado de los Animales de Experimentación (European Union Council, 2010). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada (Ref.5/10/2021/148). Para seleccionar el número de animales asignados a cada grupo experimental, se implementó el principio de las 3R [157].

3.9.1 Ensayos para estudios de obesidad

3.9.1.1 Animales de experimentación

Se emplearon un total de 60 ratones macho C57BL/6J de seis semanas de edad con un peso corporal medio entre 21.8 ± 1.4 g. (Charles River Laboratories Inc, Barcelona). Los animales se dividieron de forma aleatoria en seis grupos experimentales de 10 animales cada uno y se alojaron en jaulas grupales de 5 animales por jaula. Las jaulas se encontraban en la unidad de experimentación animal del Centro de Instrumentación Científica de la UGR, con condiciones controladas de temperatura (21 ± 2 °C), humedad (40 – 60 %) y ventilación. Se mantuvo un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 h (20:00 – 8:00h) durante todo el período experimental para que el protocolo de ejercicio físico se realizara durante el período activo de los animales.

3.9.1.2 Dietas experimentales

Para el desarrollo de la obesidad los animales consumieron una dieta alta en grasa en la que el 45% de las calorías totales provenían de la grasa (Teklad Custom Diet TD. 06415. Envigo). Además, se añadió 20% de fructosa en el agua de bebida. En la **Tabla 7** se muestra la formulación y composición nutricional de cada dieta.

La dieta normocalórica, administrada al grupo de animales control (delgados), y utilizada también para la formulación de las dietas experimentales dónde se añadió el nutraceutico diseñado, fue una dieta estándar con un 10% calorías procedentes de la grasa (Teklad Custom Diet TD. 110675. Envigo). Para las intervenciones

nutricionales se incorporó el nutracéutico en la dieta estándar a un nivel de inclusión del 0.6 %.

Tabla 7. Formulación y composición nutricional de las distintas dietas utilizadas.

	Dieta SD	Dieta HF	Dieta SD+NT
Caseína (g/kg)	210	245	210
Almidón (g/kg)	445	85	439
Sacarosa (g/kg)	160	200	160
Maltodextrina (g/kg)	50	115	50
Celulosa (g/kg)	37.2	58	37.2
Minerales (g/kg)	35	43	35
Manteca (g/kg)	20	195	20
Aceite de soja (g/kg)	20	30	20
Vitaminas (g/kg)	15	19	15
L-cisteína (g/kg)	3	3.5	3
Colina Bitartrato (g/kg)	2.8	3	2.8
Fosfato cálcico (g/kg)	2	3.4	2
Nutracéutico (g/kg)	-	-	6
Proteínas (% en peso)	18.6	21.7	18.6
Carbohidratos (% en peso)	63.0	41.4	63.0
Grasas (% en peso)	4.2	22.7	4.2
Kcal/g	3.6	4.6	3.6

Dieta estándar (SD); Dieta alta en grasa (HF); Dieta estándar con inclusión del nutracéutico (SD+NT)

3.9.1.3 Grupos experimentales

El ensayo constó de seis grupos experimentales (**Figura 17**):

1. **SD:** grupo control normocalórico (delgado). Ingerió una dieta estándar para roedores de laboratorio que cubría todas las necesidades nutricionales durante todo el período experimental.
2. **HFHF:** grupo control obeso. Consumió una dieta hipercalórica y fructosa en el agua de bebida durante todo el período experimental.

3. **HF/SD**: consumieron una dieta hipercalórica y fructosa en el agua de bebida durante el período de inducción de la obesidad (9 semanas), y tras este se les aplicó una intervención nutricional cambiando la dieta alta en grasa y fructosa por una dieta estándar.
4. **Ex**: consumieron una dieta hipercalórica y fructosa en el agua de bebida durante el período de inducción de la obesidad (9 semanas). Tras este se les aplicó una intervención nutricional con cambio a dieta estándar y además realizaron un protocolo de ejercicio físico.
5. **NT**: consumieron una dieta hipercalórica y fructosa en el agua de bebida durante el período de inducción de la obesidad (9 semanas), y tras este se les aplicó una intervención nutricional con cambio a dieta estándar con inclusión del nutraceutico desarrollado al 0.6 %.
6. **NT+Ex**: consumieron una dieta hipercalórica y fructosa en el agua de bebida durante el período de inducción de la obesidad (9 semanas). Tras este se les aplicó una intervención nutricional con cambio a dieta estándar más 0.6% de inclusión del nutraceutico y además realizaron el protocolo de ejercicio físico.

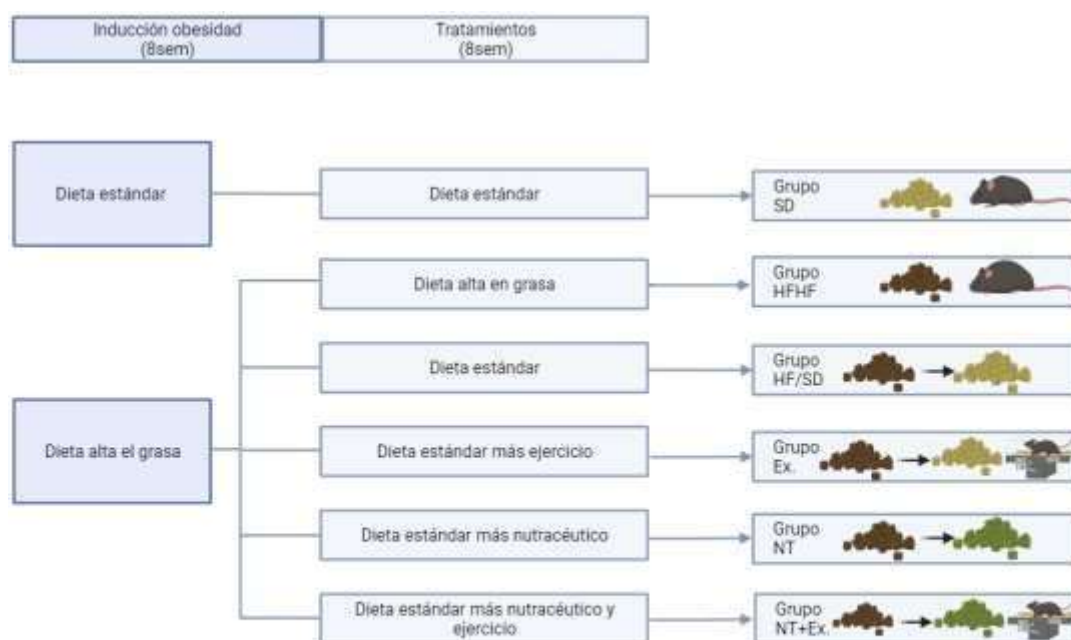


Figura 17. Grupos experimentales para el ensayo *in vivo* del estudio de la obesidad.

3.9.1.4 Período experimental

El período experimental fue de 18 semanas, las primeras 9 semanas se correspondieron con el periodo de inducción de la obesidad y las últimas 9 al período en el que se aplicaron las intervenciones nutricionales y de ejercicio físico (**Figura 18**). Durante el período de inducción de la obesidad, todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* a la dieta y al agua de bebida, a excepción del grupo control normocalórico en el que fueron sometidos a una alimentación *pair fed* de 3 g de dieta por animal y por día. Durante el período en el que se realizaron las intervenciones nutricionales también se aplicó *pair fed* en los animales que pasaron de consumir una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida, a la dieta normocalórica, mientras que el grupo HFHF siguió teniendo una alimentación *ad libitum*. La ingesta de agua y bebida fue controlada diariamente mientras que el peso de los animales se midió semanalmente.

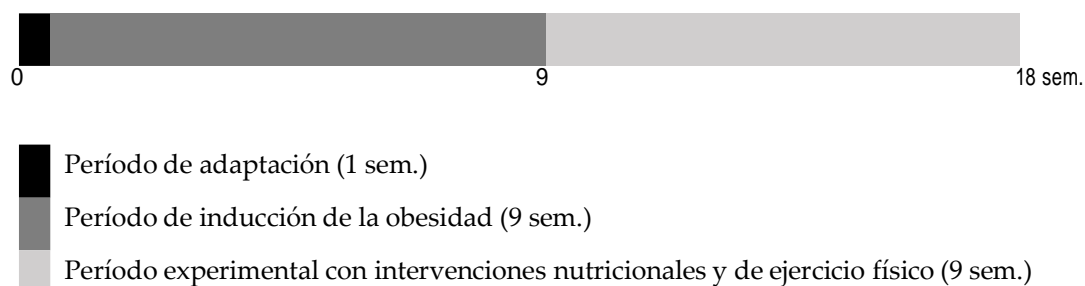


Figura 18. Esquema del período experimental para el ensayo de obesidad

3.9.1.5 Programa de ejercicio físico

El programa de ejercicio físico se llevó a cabo usando una cinta de correr con cinco líneas, con adaptadores diseñados especialmente para ratones (Treadmill LE8710RTS, Panlab/ Harvard Apparatus Inc.Barcelona). Durante la primera semana los animales fueron familiarizados con la cinta mediante entrenamientos de baja intensidad y duración de 10 min al día a una velocidad de 12 cm/s, sin inclinación.

Antes de comenzar los entrenamientos los animales fueron sometidos a *un test incremental* para determinar el consumo máximo de oxígeno con el fin de establecer el protocolo de entrenamiento en función de estos datos. El protocolo propuesto para

esta prueba está basado en el descrito por Yang et al. [158] con algunas modificaciones. Cada animal se posicionó en una cinta de correr individual (Panlab LE8708) conectada a un analizador de gases (Gas Analyzer LE 405. Panlab, Harvard Apparatus, Cornellà, Barcelona, España) para poder determinar los valores de O₂ consumido y CO₂ producido. El flujo de gas hacia el interior de la cinta individual se estableció en 0.4 - 0.6 L·min⁻¹. Al inicio de cada prueba se hizo un calibrado de gases O₂ y CO₂ con patrones de referencia y se registraron en el software Metabolism v2.2.0 (Panlab, Harvard Apparatus, Cornellà, Barcelona, España).

La prueba se inició con un registro de los valores O₂ y CO₂ ambiental durante 5 min, tras ello se registraron los valores en el interior de la cinta de correr individual vacía durante 3 min para posteriormente posicionar al animal en el interior de la cinta de correr. Durante los primeros 5 min se estabilizaron los valores de los gases en el interior de la caja antes de comenzar la prueba. La prueba se inició con una velocidad de 20 cm·s⁻¹, y se incrementó 3 cm·s⁻¹ cada minuto hasta que se alcanzó una velocidad de 100 cm·s⁻¹ o el animal mostraba signos de agotamiento. Los animales fueron pesados antes de iniciar la prueba. En la **Tabla 8** se muestran los cambios en el incremento de velocidad.

Tabla 8. Prueba incremental.			
Tiempo (min)	Velocidad (cm·s ⁻¹)	Tiempo (min)	Velocidad (cm·s ⁻¹)
1	20	15	62
2	23	16	65
3	26	17	68
4	29	18	71
5	32	19	74
6	35	20	77
7	38	21	80
8	41	22	83
9	44	23	86
10	47	24	89
11	50	25	92
12	53	26	95
13	56	27	98
14	59	28	101

El protocolo de ejercicio consistió en un ejercicio de intensidad alta-moderada durante 20 min al día, 5 días a la semana. Se programó el software SEDACOM v2.0 (Panlab, Harvard Apparatus, Cornellà, Barcelona, España), siguiendo los siguientes parámetros: En los primeros 4 min los animales corrieron al 20% de su VO₂ máx para realizar un calentamiento. Seguido por un ciclo de alta intensidad compuesto por tres min de intensidad creciente desde el 30 % al 65 % de su VO₂ máximo, y 1 min más dónde se mantuvo esta intensidad. Tras ello se repitieron 4 ciclos de intensidad moderada dónde el incremento progresivo de la velocidad duró 1'30'', el mantenimiento al 65% del VO₂ máximo fue de 30s y además los animales tuvieron 1' de descanso entre series (**Tabla 9**).

Todos los grupos fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales, por lo que los grupos sedentarios fueron expuestos durante el mismo período de tiempo a la cinta, al 20 % de su consumo máximo de oxígeno.

Tabla 9. Programa de ejercicio físico.

Fase	Tiempo	% VO ₂ máx
Calentamiento	4'	20
Protocolo de ejercicio		
1X	3'	30 → 65
	1'	65
4X	1'30''	30 → 65
	30''	65
	1'	rest

3.9.1.6 Análisis realizados.

Al final del periodo experimental los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (70/ 10) mg por kg de peso de animal. Una vez bajo los efectos de la anestesia, la sangre fue recolectada mediante punción cardíaca usando heparina como anticoagulante. Una alícuota de 0.1 mL fue usada para la determinación de parámetros hemáticos, mientras que el resto se centrifugó a 1458 g durante 15 min a 4°C para separar el plasma. El plasma se alícuotó en eppendorf que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para ser almacenados a -80 °C hasta su análisis. Los órganos extraídos fueron inspeccionados visualmente y procesados

antes de sumergirse en nitrógeno líquido para su congelación y posterior conservación a -80°C.

3.9.1.6.1 Peso corporal, ingesta y peso de los órganos

El peso de los animales fue registrado semanalmente, mientras que la ingesta de agua y comida fue determinada diariamente. La ingesta se determinó como la diferencia de peso entre el comedero/bebedero lleno menos el comedero/bebedero vacío o su peso tras 24 h. La ingesta calórica se determinó sumando el aporte calórico de cada dieta con el aporte calórico aportado en el agua de bebida. Al final del período experimental los distintos órganos y tejidos se extrajeron, lavaron en solución salina (NaCl 0.9%), se secaron y pesaron por separado (corazón, bazo, riñones, hígado, colon y ciego). También se midió la grasa epididimal y abdominal y los músculos *plantaris* y gastrocnemio. Además, se inspeccionaron visualmente para verificar la ausencia de daños macroscópicos.

3.9.1.6.2 Parámetros hemáticos

Se utilizó un analizador hematológico automatizado (KX-21 Automated Hematology Analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japón) del centro de instrumentación científica de la universidad de Granada para determinar plaquetas (PLT), leucocitos (WBC), eritrocitos (RBC), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), y la amplitud de distribución eritrocitaria (*RDW) en sangre.

3.9.1.6.3 Parámetros bioquímicos plasmáticos

Parte del plasma fue utilizado para determinar parámetros bioquímicos mediante un analizador químico Shenzhen Midray BS-200 (Bio-Medical Electronics) de la unidad de bioanálisis del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: TG, fosfolípidos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, albúmina, fósforo, calcio, creatinina, aspartato aminotransferasa (AST/GOT), alanina aminotransferasa (ALT/GTP), glutamiltransferasa gamma (γ -GT), CK-MB y fosfatasa alcalina.

3.9.1.6.4 Prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa

Los animales fueron mantenidos en ayunas durante las 4h previas al inicio de la prueba, y no realizaron ejercicio físico durante al menos 48 h antes. El mismo día de la prueba los animales se pesaron para calcular, en función del peso de cada animal, la cantidad de glucosa que sería administrada. Para realizar la prueba se siguió el método descrito por Prieto et al. [159] con pequeñas modificaciones. La prueba se inició con la determinación de la glucosa basal de cada animal. Para ello se realizó una pequeña incisión en el extremo distal de la cola y se dio un masaje hasta recolectar una pequeña gota de sangre que se posicionó en la tira de medición del glucómetro Bayer Breeze 2® (Bayer Healthcare, Spain). Tras ello, se administró por sonda gástrica metálica 6.9 μ moles de glucosa por gramo de peso del animal de una solución de D-glucosa disuelta en solución salina (NaCl 0.9%). Se volvió a determinar la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min desde la administración de la sobrecarga. Los resultados fueron representados como la media \pm el error estándar de la media de cada grupo. Además, se determinó el área bajo la curva y se expresó en unidades arbitrarias como la media de cada grupo \pm error estándar de la media. El área bajo la curva se determinó usando el modelo trapezoide con el programa Excel®, basándonos en la siguiente fórmula [160]:

$$AUC1 = \left[\sum_{i=1}^{n-1} \frac{(m_{(i+1)} + m_i) \cdot t}{2} \right] - (m_i \cdot \sum_{i=1}^{n-1} t_i)$$

Donde:

m: medida

t: distancia en tiempo entre medias

n: número total de medias

3.9.1.6.5 Análisis de la composición corporal e índices antropométricos

El último día del período experimental, y tras 4 horas de ayuno, la composición corporal de los animales se determinó mediante el dispositivo EchoMRI™ (EMS 181, Echo Medical Systems, Houston). El equipo mide la masa grasa, tejido magro, agua libre (no unida a tejidos como la de la orina y el plasma) y agua total mediante un

método validado de resonancia magnética nuclear. Se trata de un método no invasivo, que realiza mediciones certeras en un corto período de tiempo [161].

Para determinar los índices antropométricos de los animales se midió la circunferencia abdominal (AC) y la longitud del cuerpo como la distancia entre el hocico y el final de la cola. Se usaron para determinar los siguientes índices:

$$\text{Índice de masa corporal (IMC)} = \text{Peso del animal (g)} / \text{longitud}^2 \text{ (cm}^2\text{)}$$

$$\text{Índice de Lee} = \sqrt{\frac{\text{Peso del animal (g)}}{\text{longitud (cm)}}}$$

3.9.1.6.6 Determinación de capacidad antioxidante mediante ABTS en plasma

Se determinó la actividad antioxidante en el plasma de los distintos animales mediante la prueba de ABTS, según lo descrito en el apartado 3.4.2.

3.9.1.6.7 Determinación de marcadores plasmáticos mediante inmunoensayo

Para la cuantificación de distintos analitos se utilizó un panel de ensayo MILLIPLEX (Mouse Metabolic Hormone Expansion Panel, MMHE-44K), en la que se cuantificaron simultáneamente la concentración de insulina, leptina, irisina, resistina, péptido YY, péptido similar al glucagón (GLP-1), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF α) mediante la determinación de la absorbancia en la plataforma Luminex XYP (S/N LXY09117102) del CIC de la UGR. Para que la heparina no interfiera en los resultados fue importante no exceder de 10 UI·mL⁻¹ de sangre recogida, además se añadió el inhibidor de dipeptidil peptidasa 4 (DPP-IV. Ref.DPP4, Sigma-Aldrich, Madrid, España) para determinar el GLP-1 activo.

Reconstitución de reactivos del kit. Todos los reactivos fueron reconstituidos. Se añadieron 10 mL de agua bidestilada al polvo liofilizado de Serum Matrix. Para preparar la solución que contenía todos analitos (Beads Mix), primero se sonicó cada anticuerpo durante 30 segundos y luego se agitó vigorosamente utilizando un vórtex durante 1min para finalmente transferir 150 μ L de cada uno a un nuevo vial. Se añadió la solución de dilución de los analitos hasta un volumen final de 3 mL. Los controles de calidad de la reacción se reconstituyeron al añadir 250 μ L de agua

bidestilada a cada estándar, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 min, luego se transfirieron a un tubo antifugas de propileno.

Preparación del patrón estándar. Las soluciones estándar de hormonas metabólicas de ratón se reconstituyeron en 250 μL de agua bidestilada y se hicieron diluciones seriadas en tampón Assay Buffer (Cat n°. LE-ABGLP3). En cada solución estándar se obtuvieron las siguientes concentraciones de cada anticuerpo (**Tabla 10**):

Tabla 10. Concentración en $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de las soluciones estándar Milliplex MMHE-44K

	TNF α	PYY	IL-6	GLP-1	Leptina	Insulina	Resistina
ST1	1.4	8.2	34	41	82	137	206
ST2	4.1	25	103	124	247	412	617
ST3	12	74	309	370	741	1235	1852
ST4	37	222	926	1111	2222	3704	5556
ST5	111	667	2778	3333	6667	11111	16667
ST6	333	2000	8333	10000	20000	33333	50000
ST7	1000	6000	25000	30000	60000	100000	150000

Resultados expresados en pg/mL . Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), péptido tirosina-tirosina (PYY), interleucina 6 (IL-6), péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1).

Procedimiento. Las muestras de plasma fueron completamente descongeladas, mezcladas en vórtex y centrifugadas a 3000 g durante 5 min. Todos los reactivos necesarios para el inmunoensayo se dejaron a temperatura ambiente antes de su uso. En primer lugar, se añadieron 200 μL de tampón en cada pocillo, la placa se selló herméticamente y se mezcló en una placa con agitación durante 10 min a temperatura ambiente. El tampón se retiró mediante el volcado vigoroso de la placa para luego añadir 10 μL de tampón, solución estándar o muestra correspondiente más 25 μL de la solución de BeadsMix en cada pocillo. La placa se selló y se incubó durante 16-18 h en agitación a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se decantó el contenido mediante volcado vigoroso de la placa y se lavó cada pocillo tres veces con 200 μL de tampón de lavado.

Posteriormente, se incubó de nuevo 1 h con 50 μ L de la solución de anticuerpo primario, y media hora más con el anticuerpo secundario (Streptavidin-Phycoerythrin), a temperatura ambiente y con agitación. Por último, se decantó el contenido, se hicieron tres lavados con 200 μ L de tampón de lavado y se añadieron 150 μ L de tampón de lectura (Sheath Fluid PLUS) para la medición de la absorbancia en LUMINEX XYP (S/N LYX 09117102). Los parámetros de lectura se fijaron en 100 μ L de volumen, y 50 medidas por analito. Los resultados finalmente se expresaron como la media \pm el error estándar de la media de ocho animales.

3.9.1.6.8 Índices aterogénicos e índice HOMA

Índices aterogénicos. Los índices aterogénicos son indicadores bioquímicos que nos permiten identificar la salud de un sujeto y su predisposición a desarrollar enfermedades metabólicas. Se determinaron con las siguientes fórmulas:

$$\text{COL.T/COL. HDL} = \text{Colesterol total (mg/ dL)} / \text{Colesterol HDL (mg/ dL)}$$

$$\text{TyG} = \ln [\text{Triglicéridos (mg/ dL)} \cdot (\text{Glucosa (mg/ dL)} / 2)]$$

$$\text{No HDL} = \text{Colesterol total (mg/ dL)} - \text{Colesterol HDL (mg/ dL)}$$

$$\text{TG / HDL} = \text{Triglicéridos (mg/ dL)} / \text{Colesterol HDL (mg/dL)}$$

$$\text{LDL / HDL} = \text{Colesterol LDL (mg/ dL)} / \text{Colesterol HDL (mg/ dL)}$$

$$(\text{COL.T} - \text{HDL}) / \text{HDL} = (\text{Colesterol total} - \text{Colesterol HDL}) / \text{Colesterol HDL (mg/ dL)}$$

$$\ln (\text{TG/HDL}) = \ln (\text{Triglicéridos (mg/ dL)} / \text{Colesterol HDL (mg/dL)})$$

Índice Homa. El modelo HOMA es una herramienta ampliamente utilizada para determinar la sensibilidad a la insulina y la función de las células β -pancreáticas, a partir de los niveles de insulina y glucosa basal [11]:

$$\text{Índice HOMA} = \frac{\text{Insulina basal (mU/L)} \cdot \text{Glucosa basal (mmol/L)}}{22.5}$$

*Los valores de insulina y glucosa basal hacen referencia a la medida tomada en el plasma de los animales tras 4h de ayuno.

3.9.1.6.9 Parámetros hepáticos

Humedad y grasa hepática. El porcentaje de humedad se determinó en las muestras de hígado mediante la diferencia de peso entre el hígado fresco y el hígado tras su liofilización. Los resultados se expresaron como la media del grupo \pm error estándar de la media. Para determinar el porcentaje de grasa se siguió el método de Folch et al. [162], con pequeñas modificaciones [150]. Se pesaron 200 mg de hígado liofilizado y se mezclaron con 1 mL de NaCl 0.9 % y 3 mL de EtOH/ BHT 0.01 %. Se homogeneizó (ART moderne labortechnik) tres veces durante 10 s para posteriormente sonicar (VibraCell 75185), a 54 Hz durante 10 s otras tres veces. Tras ello se añadieron 0.5 mL de una solución compuesta por EtOH/BHT 0.01 % y KOH 11 N en relación 10:1 y se incubó en un baño de agua durante 40 min a 60 °C para la saponificación de la grasa. Trascurrido el tiempo de incubación se añadió a cada tubo de ensayo 2 mL de hexano al 95 % y se agitó durante 1.5 min, este paso se repitió dos veces. Tras ello se añadieron 0.5 mL de agua destilada, se agitó y centrifugó a 3000 rpm durante 5 min para recoger la fase superior incolora (fase orgánica con el hexano y la grasa extraída) con una pipeta Pasteur de vidrio y se transfirió a un nuevo tubo de ensayo previamente pesado. El hexano se evaporó bajo una corriente de gas nitrógeno y se pesó el tubo donde se encontraba la grasa adherida a sus paredes. Los resultados se expresaron como porcentaje de grasa, teniendo en cuenta la cantidad de hígado inicial utilizado durante el proceso de extracción.

Enzimas antioxidantes. Para la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado, 200 mg de tejido fueron homogeneizados en 2 mL de tampón fosfato (50mM, pH 7.8) / Triton X-100 0.1% / DETAPAC (1.34 mM) a 18.000 rpm durante 30 s usando un homogeneizador Micra D-1 (ART moderne labortechnik). A continuación, la solución se sonicó tres veces por ultrasonido (Sonoplus HD 2070, Bandelin) al 50 % de potencia durante 10 s. Finalmente, la solución se centrifugó a 16.000 rpm durante 40 min a 4 °C (BECKMAN, Allegra 64R) y se guardó el sobrenadante a -80 °C hasta su posterior uso en las distintas determinaciones.

La concentración de proteínas de los homogeneizados de hígado se determinó mediante el método de Bradford (PanReac AppliChem) siguiendo las instrucciones descritas en el apartado 3.8.5.1.

Determinación de la actividad enzimática Catalasa (CAT). Para determinar la actividad de la enzima catalasa (CAT) se siguió el método descrito por Cohen et al. [163] el cual se basa en la reacción del H₂O₂ con el Fe²⁺ que se transforma en Fe³⁺, susceptible de reaccionar con el tiocianato de potasio (KSCN) dando una coloración rojiza medible a una absorbancia de 450 – 460 nm. La enzima catalasa hidroliza el H₂O₂ por lo que ocurrirá menor transformación de Fe²⁺ en Fe³⁺, y por tanto menor coloración. La enzima cataliza el H₂O₂ en una reacción cinética que dura 4 min y da lugar a dos moléculas de agua y una de dióxido de carbono.

La determinación consistió en mezclar 1650 µL tampón fosfato (10 mM, pH 7.0) con 100 µL agua bidestilada, 50 µL muestra y 200 µL H₂O₂. Se agitó e incubó durante 4 min en hielo. Al minuto 1 y minuto 4 de incubación, se retiran 50 µL de la solución de reacción y se añadió cada uno en un nuevo tubo de ensayo cuyo contenido eran 2mL de H₂SO₄ (0.6 N) para parar la reacción y 500µL FeSO₄ (10 mM). A cada uno se le añadieron 200 µL de KSCN (2.5 M) e incubaron durante 3 min en oscuridad. Se transfirieron 250 µL de cada tubo a una placa de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 460 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). Los resultados se expresaron como unidades enzimáticas por milígramo de proteína, calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades enzimáticas} = \frac{\ln (A_1/A_2) / \Delta t}{\text{mg proteína / mL}}$$

Donde:

Ln: Logaritmo neperiano.

A₁: Absorbancia tiempo incubación 1min.

A₂: Absorbancia tiempo incubación 4min.

A: Diferencia de tiempo entre los dos puntos.

Determinación de la actividad enzimática Glutatión peroxidasa (GPx). La actividad enzimática de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se determinó siguiendo el

método descrito anteriormente por Lawrence et al. [164] con pequeñas modificaciones. La enzima GPx cataliza la oxidación de dos moléculas de glutatión reducido (GSH) en una de glutatión oxidado (GSSG) reduciendo a su vez una molécula de H₂O₂ en dos de agua. La glutatión reductasa revierte la oxidación de GSSG utilizando como sustrato nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADPH). A mayor velocidad de reacción mayor concentración de GPx en la muestra.

Para la determinación se llevan a cabo dos reacciones en paralelo, una catalizada por la enzima glutatión reductasa y otra no catalizada. Para la reacción no catalizada se mezclaron 240 µL NADPH (2 mM) en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4, 1 mM ácido etildiaminotetraacético (EDTA), 10 -20 µL muestra y 10 µL de cumeno hidroperóxido (22 mM). Para la reacción catalizada se mezclaron 240 µL de tampón fosfato 50 mM, pH 7.4 1 mM EDTA, complementado con 0.014 g de acida sódica (4.3 mM), 0.066 g de glutatión reducido (4.3 mM), 0.089 g NADPH (2mM), más 10 -20 µL muestra, 4.5 µL GR (0.04 mU/mL) y 10 µL de cumeno hidroperóxido (22mM). Cada reacción se midió por cuadruplicado a una absorbancia de 340 nm cada 15 s durante 4 min y 37 °C en espectrofotómetro de placa Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). Los resultados se expresaron como nanomoles de NADPH utilizado por min y miligramo de proteína, para lo cual se usaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{nmol NADPH / min / mL} = \left(\frac{\text{Abs R.catalizada} - \text{Abs R.no catalizada}}{0.062} \right) \times \left(\frac{\text{V.total}}{\text{V.muestra}} \right)$$

$$\text{nmol NADPH / min / mg proteína} = \left(\frac{\text{nmol NADPH / min / mL}}{\text{mg proteína / mL}} \right)$$

Determinación de la actividad enzimática Superóxido dismutasa (SOD). Se siguió el método colorimétrico descrito por Ukeda et al. [165] para la determinación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que fue adaptado para su lectura en un espectrofotómetro de placa Multiskan™ (FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). La enzima SOD cataliza la dismutación del ion superóxido en O₂ y H₂O₂. La técnica se basa en el sistema xantina/ xantina oxidasa (XO) donde se crean iones superóxido los cuales reaccionan con el aceptor de

superóxido 3'-(1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4 tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic Acid Hydrate (XTT) para formar un complejo soluble en agua, de color anaranjado. Por lo tanto, a menor coloración mayor actividad de la enzima SOD total tendrá la muestra.

Para la determinación de la SOD total se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 1 mL: 740 µL de tampón fosfato (50 mM, pH 7.8), 38 µL de DETAPAC (3 mM), 55 µL de XTT (0.0007 g·mL⁻¹ de tampón) y 167 µL de xantina oxidasa (70 mU·mL⁻¹). La reacción se llevó a cabo en placa multipocillo de 96 pocillos en los cuales se añadieron 150 µL de mezcla de reacción, 35 µL de la muestra o tampón fosfato para el control y 55 µL de xantina (3mM). Se midió la absorbancia a 492 nm cada minuto durante un total de 15.

Para obtener la actividad enzimática de la enzima SOD dependiente de Mn que se encuentra en la mitocondria celular, se llevó a cabo el mismo protocolo, pero con una incubación previa de las muestras con cianuro de potasio (KCN) 120 mM durante 30 min en hielo para inhibir la actividad de la SOD dependiente de Cu/Zn. Esta última se obtiene por diferencia entre la actividad SOD total – SOD dependiente de Mn.

Los resultados fueron expresados como unidad de actividad enzimática (UAE) por milígramo de proteína. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la reducción de XTT.

3.9.1.6.10 Expresión génica

Tras la extracción de los distintos órganos y tejidos del ensayo *in vivo* para el estudio de la obesidad, el músculo *plantaris* y una pequeña porción del hígado se introdujeron en una solución preservadora de ARN (ARN later, Invitrogen™ AM7024).

Extracción del ARN. El tejido se homogeneizó en un homogeneizador para tejidos (FastPrep®-24, MP Biomedicals). Para ello, 100 mg de tejido se mezclaron con 1mL de reactivo Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) en tubos específicos que contienen esferas cerámicas de 1.4 mm para la rotura del tejido (Ref. 6913100, MP Biomedicals) y se

incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le añadieron 200 μL de cloroformo para uso en biología molecular, se agitó durante 15 s y se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C para separar las distintas fases (ADN, proteína y ARN). La fase superior acuosa obtenida donde se encontraba el ARN se transfirió a un nuevo tubo donde se incubó durante 10 min con 500 μL de isopropanol. Posteriormente se procedió a centrifugar nuevamente durante 10 min en las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante, y el pellet (ARN) se lavó con etanol al 70 %. Por último, se centrifugó a 12000 g durante 1.5 min a 4 °C, se descartó de nuevo el sobrenadante y el pellet se disolvió en 20-100 μL agua desionizada tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) y se determinó tanto la pureza como la concentración de ARN de cada una de las muestras mediante NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) calidad del ácido nucleico se determinó mediante el ratio 260/280 y se estableció entre 1.9 y 2.0.

Purificación ARN. Para eliminar cualquier resto de ADN presente en la muestra, el ARN total extraído se trató con el kit ADNsa (Applied Biosystems, Ref: AM1907) según las especificaciones del fabricante. Se añadieron 5 μL de tampón de la reacción y 0.5 μL de ADNsa por cada 50 μL de volumen de ARN. Se incubó durante 20 min a 37 °C. Para parar la reacción se añadieron 5 μL de reactivo de inactivación de ADNsa y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 10000 g durante 1.5 min para recolectar y almacenar el sobrenadante en un nuevo tubo.

Retrotranscripción. Un total de 100 - 500 ng de ARN se retrotranscribieron a ADNc de acuerdo con el protocolo estándar para el Termociclador Lifepro (Bioer Servs Life, China). Para que los hexámeros aleatorios (50 μM , Ref.N8080127) se alinearan con la hebra de ARN se mezcló 1 μL de ambos en un volumen final de 10 μL en agua libre de nucleasas y se calentó durante 5 min a 65 °C. Tras ello se añadieron 5 μL de tampón de reacción, 5 μL mezcla de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) (2.5mM, Ref.R72501), 1.25 μL de inhibidor ARNsa (Ref.10777019), 1.25 μL de transcriptasa inversa SuperScript™ IV (Ref.18090050), 1.25 μL de DTT y 1.25 de μL agua libre de nucleasas para un volumen final de 25 μL de reacción. El protocolo consistió en una

incubación a 25 °C durante 10 min para la estabilización, seguido de la reacción a 42 °C durante 50 min y por último 15 min a 70 °C para inactivar la enzima y parar la reacción. El ADNc se conservó a -80 °C hasta su posterior análisis.

RT-PCR cuantitativa. Para realizar la PCR a tiempo real se usó el equipo QuantStudio 12K Flex de Applied Biosystems. Se usaron placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp™ Optical Fast (Ref. 4346906). En cada pocillo se añadieron 6.25µL de TaqMan™ Fast Advanced sin UNG (A44360), 4.5 µL de agua DEPC, 0.5 µL ADNc y 1.25µL primer/ sonda. Como control interno se usó el gen de referencia para la β-actina (Mm01205647_g1) y los resultados fueron expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con respecto al grupo control.

En hígado se usaron *primers/sondas* para genes involucrados en el metabolismo oxidativo como *sod1* (Mm01344233_g1), *sod2* (Mm01313000), *cat* (Mm00437992), *gpx2* (Mm01286848), genes codificantes de enzimas detoxificantes como *noq1* (Mm00500822_g1) y *gsta2* (Mm03019257_g1), marcadores de procesos inflamatorios como *tnfa* (Mm00443258_m1), *IL-1b* (Mm00434228_m1) e *IL-6* (Mm00446190_m1) y genes involucrados en el metabolismo glucídico y lipídico como *ppara* (Mm00440939_m1), *lpl* (Mm00434764_m1), *cd36* (Mm00432403_m1), *scd1* (Mm00772290_m1) y *fasn* (Mm00662319_m1) de Applied Biosystems. En el músculo además de cuantificar genes involucrados en el metabolismo oxidativo (*sod1*, *sod2*, *cat*, *gpx*) se determinan genes involucrados en el metabolismo glucídico y lipídico como *ppara*, *cd36*, *glut4* (Mm00436615_m1), *igf1* (Mm00439560_m1), *lipin* (Mm00550511_m1) y *pten* (Mm01212532_m1) de Applied Biosystems.

3.9.1.6.11 Metagenómica

El contenido cecal se recolectó al final del periodo experimental y se introdujo en nitrógeno líquido y posteriormente a -80 °C para el posterior aislamiento de ADN genómico (ADNg). La preparación de bibliotecas, agrupación y secuenciación de mini secuencias fue realizada por el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La extracción se llevó a cabo usando el kit QIAamp® PowerFecal® y siguiendo las

instrucciones del fabricante para la automatización del proceso con el robot QIAcube. La cuantificación del ADN genómico se realizó por fluorimetría (qubit) y se analizó mediante secuenciación de la región V4 (233 pb) de los genes del ARN ribosómico 16S (ARNr) utilizando el sistema MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU).

El análisis bioinformático de las muestras 16S fue llevado a cabo por el departamento de bioinformática del IPBLN, CSIC, Granada, siguiendo las recomendaciones de Terrón-Camero et al.[166]. Tras el análisis de calidad de 2x275 secuencias de pares de bases usando fastqc [167] y el software Multiqc v1.14 [168], se usó el software Qiime2 [169]. Esta herramienta proporciona un análisis basado en una base de datos de genes ribosomales, en este caso en concreto, centrado en la región 16S de bacterias. Se incluyó DADA2 [170] como plugin externo para filtrar, agrupar y eliminar el ruido de las secuencias, cortando tanto la región 3' como la 5' para eliminar las regiones con secuencias adaptadoras y las que mostraban una disminución de la calidad de secuenciación (trim-left-f and r 5, p-trunc-len-f 267, p-trunc-len-r 275). A continuación, se agruparon las muestras para comprobar su reproducibilidad mediante la aplicación Emperor. Este análisis permitió identificar una muestra atípica, que se eliminó del estudio. Una vez identificados los microorganismos, se obtuvo la matriz de abundancia a nivel de familia, género y especie. La base de datos utilizada como referencia ha sido SILVA v. 138-99 [171]. También se realizó el cálculo de la diversidad alfa y beta.

Posteriormente, se utilizó el paquete metagenomeSeq R [172] para realizar la abundancia diferencial en cada grupo con respecto al grupo normocalórico SD). Para ello, el software eliminó las especies raras, que eran aquellas que no se detectaban en ninguna muestra, lo que significaba que su suma de lecturas era igual a 0. A continuación, para abordar las variaciones en el número de lecturas entre las muestras, el número de secuencias se normalizó mediante el método de escala de suma acumulativa (CSS), que es un algoritmo que divide los recuentos brutos por la suma acumulativa de recuentos hasta un percentil que captura la distribución de

recuentos relativamente invariable en el conjunto de datos. Se prefirió este método porque es más sensible que otros métodos de normalización para medir la abundancia de taxones [172]. Por último, los datos normalizados se sometieron a pruebas de abundancia diferencial basadas en el modelo gaussiano cero-inflado integrado en metagenomeSeq para identificar los cambios de taxones.

3.9.2 Modelo experimental *in vivo* para el cáncer de colon

3.9.2.1 Animales de experimentación

Se emplearon un total de 55 ratones hembra C57BL/6J de cuatro semanas de edad con un peso corporal medio entre 15.3 ± 1.1 g. (Charles River Laboratories Inc, Barcelona). Los animales se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales de 15 animales cada grupo, a excepción del grupo control negativo, que estuvo compuesto por 10 animales. Se alojaron en jaulas grupales (5 animales por jaula) y las jaulas se encontraban en la unidad de experimentación animal del centro de instrumentación científica de la UGR, con condiciones controladas de temperatura (21 ± 2 °C), humedad (40 – 60 %) y ventilación. Se mantuvo un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 h (20:00 – 8:00h) durante todo el período experimental para que el protocolo de ejercicio físico pudiera realizarse durante el período activo de los animales. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a la dieta y al agua de bebida durante todo el período experimental.

3.9.2.2 Dietas experimentales

Todos los animales consumieron la dieta especialmente diseñada para cubrir los requerimientos nutricionales de los animales (2014, Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Envigo). Para las intervenciones nutricionales de prevención en el desarrollo del cáncer de colon, se incorporó el nutracéutico desarrollado en la dieta (2014, Envigo) a un nivel de inclusión del 0.6%. La ingesta de los animales se controló diariamente mientras que el peso se midió semanalmente.

El contenido energético total de la dieta fue de 2.9 kcal por gramo, donde un 20% de estas calorías provenía del contenido proteico, un 13 % de las grasas y un 67 % de los carbohidratos. En la **Tabla 11** se muestra la información nutricional de cada dieta:

Tabla 11. Composición nutricional de las dietas usadas en el ensayo experimental para el cáncer de colon.

	Dieta 2014S (%)	Dieta 2014S + NT (%)
Proteínas	14.3	14.3
Grasas	4.0	4.0
Carbohidratos	48.0	46.7
Fibra	4.1	4.1
Fibra detergente neutra	18.0	18.0
Minerales, aminoácidos, vitaminas	6.9	6.9
Nutracéutico	-	1.3
Cenizas	4.7	4.7

3.9.2.3 Grupos experimentales

El ensayo se compuso de cuatro grupos de experimentación, divididos en:

- **CT-:** grupo control negativo (n=10). Animales donde no se indujo el tumor y no tuvieron tratamiento nutricional.
- **CT+:** grupo control positivo (n=15). Ratones a los que se le indujo el tumor, pero no se les aplicó ninguna intervención nutricional ni de ejercicio físico
- **NT:** grupo nutraceutico (n=15). Ratones a los que se le indujo el tumor y durante todo el período experimental ingirieron el nutraceutico incluido en la dieta.
- **NT+Ex:** grupo nutraceutico más ejercicio (n=15). Ratones a los que se le indujo el tumor y durante todo el período experimental ingirieron el nutraceutico incluido en la dieta y además realizaron el programa de ejercicio físico.

3.9.2.4 Período experimental

El período experimental se muestra en la **Figura 19**. Este período constó de un total de 20 semanas, en la cual la primera fue empleada como período de adaptación de

los animales y el resto correspondió a la fase de experimentación, que se divide a su vez en:

- **Prevención:** los animales de los grupos NT y NT+Ex ingirieron el nutraceutico y además el grupo NT+Ex realizó el programa de ejercicio físico. Se mantuvo durante todo el período experimental.
- **Inducción del tumor:** constó de 8 semanas en las que se administró a todos los ratones, excepto al grupo control negativo, una inyección intraperitoneal de Azoximetano (AOM) y se añadió Sulfato Sódico Dextrano (DSS) en el agua de bebida. Se adaptó el protocolo de ejercicio físico en aquellos animales que mostraban un comportamiento anómalo como encorvamiento, pelo erizado, ojos entrecerrados o movilidad reducida debido al tratamiento con DSS.
- **Desarrollo del tumor:** se compone de otras ocho semanas necesarias para que se desarrolle el tumor inducido en el colon.

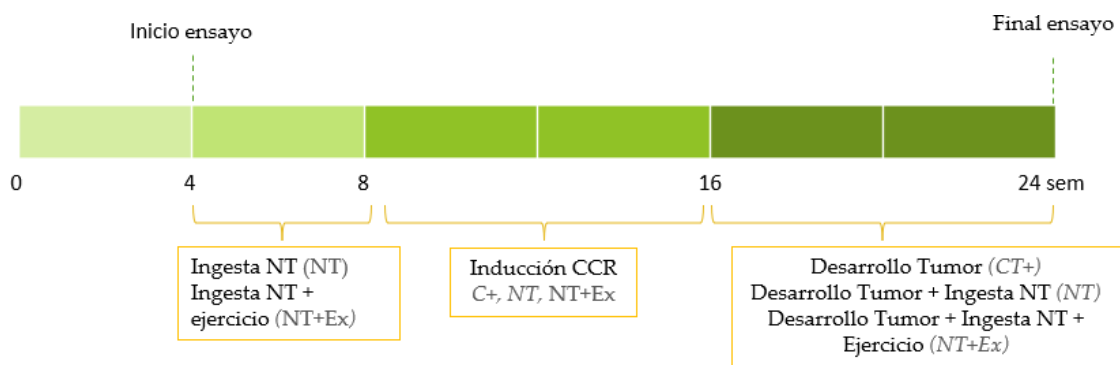


Figura 19. Esquema del período experimental para el ensayo *in vivo* del CCR.

3.9.2.5 Inducción del cáncer colorrectal *in situ*

Para la inducción del tumor de forma localizada en el colon se siguió el protocolo descrito por Mesas et al. [137] que consistió en la administración mediante inyección intraperitoneal de Azoximetano (Ref. A5486, Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una dosis de 12 mg por kg de animal a los ratones del grupo CT+, NT y NT+Ex. Tras 48 h se añadió al agua de bebida DSS al 2 % (Ref.42867-100MG, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se mantuvo durante 5 días. Tras ello, se suministró de nuevo agua de bebida durante 15 días para que los animales se recuperasen. Este proceso se repitió

dos veces más con dosis de DSS al 2 % y 3 % respectivamente, tal y como se muestra en la **Figura 20**.

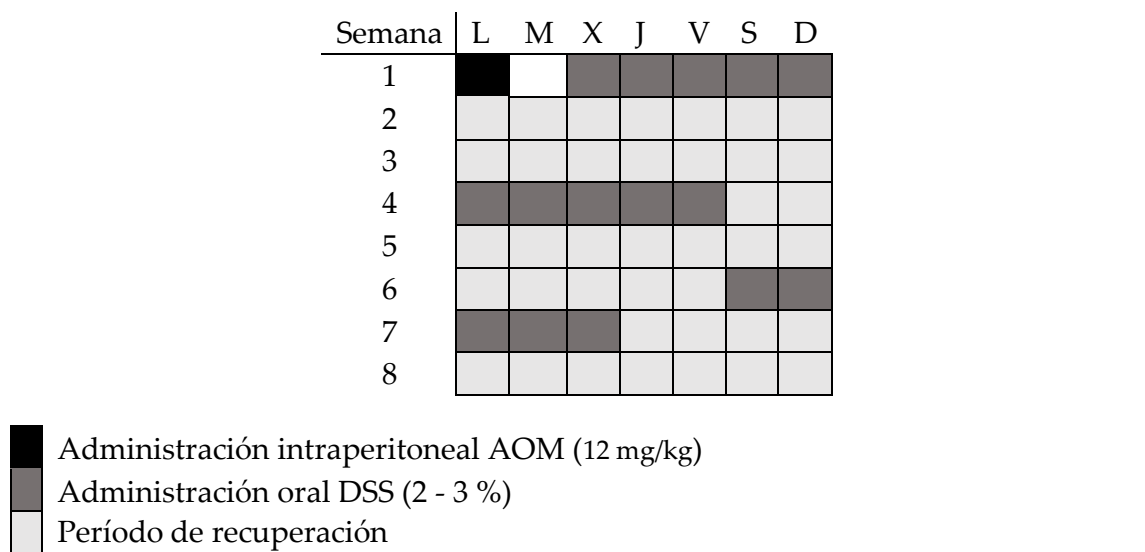


Figura 20. Esquema representativo del protocolo utilizado para la inducción del cáncer colorrectal.

3.9.2.6 Programa de ejercicio físico

El programa de ejercicio físico se ha llevado a cabo usando la cinta de correr descrita en el apartado 3.9.1.5. Durante la primera semana los animales fueron familiarizaron con la cinta mediante entrenamientos de baja intensidad y duración: 10 min al día a una velocidad de 12 cm/s, sin inclinación.

El protocolo de ejercicio físico consistió en la realización de 20 min de ejercicio al día de intensidad moderada durante 5 días a la semana. Los primeros 4 min fueron para el calentamiento al 20 % de su VO₂ máx. Seguido por 1.5 min dónde la intensidad se incrementó gradualmente desde el 20 % al 45 % de su consumo máximo de oxígeno (VO₂ máx) manteniendo esta intensidad durante dos min. Después se bajó la intensidad al 30 % de su VO₂ máx. y se mantuvo durante 1 min. Estos dos últimos pasos se repitieron 3 veces más y finalmente se procedió bajar progresivamente la intensidad hasta parar completamente el movimiento (**Tabla 12**).

Todos los grupos fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales, por lo que los grupos sedentarios fueron expuestos durante el mismo período de tiempo a la cinta, pero a velocidades mucho más bajas.

Tabla 12. Programa de ejercicio físico usado en la experimentación *in vivo* para el cáncer de colon.

Fase	Tiempo	% VO ₂ máx
Calentamiento	5'	20
Protocolo de ejercicio		
	5'	20
1X	1'30''	20 → 45
	1'	45
	2'	45
4X	1'	30
	1'30''	rest

3.9.2.7 Análisis realizados

Al final del periodo experimental los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina/ xilacina (70/ 10) mg por kg de peso de animal. Una vez bajo los efectos de la anestesia, la sangre fue recolectada mediante punción cardíaca usando heparina como anticoagulante. Los órganos extraídos fueron inspeccionados visualmente y procesados antes de sumergirse en nitrógeno líquido para su congelación y posterior conservación a -80°C, o en formaldehído para su análisis histológico.

3.9.2.7.1 Peso corporal, ingesta y peso de los órganos

El peso de los animales fue registrado semanalmente, mientras que la ingesta de agua y comida fue determinada diariamente. La ingesta se determinó tal y como se describe en el apartado 3.9.1.6.1. Al final del período experimental los distintos órganos y tejidos se extrajeron, lavaron en solución salina (NaCl 0.9%), secaron y pesaron (corazón, bazo, riñones, hígado, colon y ciego). También la grasa epididimal y abdominal y los músculos *plantaris* y gastrocnemio. Los pulmones se sumergieron en formaldehído. Todos se inspeccionaron visualmente para verificar la ausencia de daños macroscópicos.

3.9.2.7.2 Parámetros hemáticos

Los parámetros hemáticos fueron analizados según lo descrito en el apartado 3.9.1.6.2.

3.9.2.7.3 Número de pólipos y distribución

El colon se extrajo de los ratones, se limpió con solución salina y se abrió por la mitad para tomar una fotografía que después fue procesada con ImageJ 1.54d (National Institutes of Health, USA) para medir el número de pólipos, longitud y área total del colon, así como el área ocupada por los distintos pólipos encontrados. El área total del colon se analizó utilizando la herramienta "ROI manager", para ello se determinó una escala conocida para tener entre las distintas muestras la misma referencia de tamaño y posteriormente se configuró la imagen en 8-bits y el threshold se configuró manualmente hasta que se seleccionase toda el área del colon (**Figura 21**). En el caso de los pólipos fueron analizados de forma manual tal y como se muestra en la **Figura 22**. Se utilizó la misma escala de tamaño que la configurada para determinar el área total.

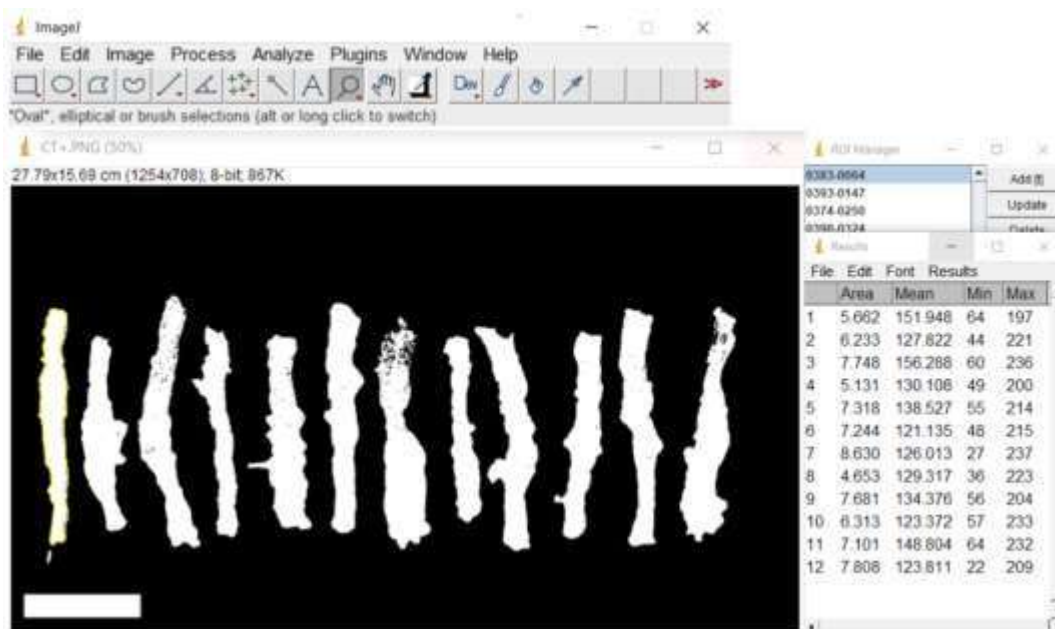


Figura 21. Análisis del área total del colon con la herramienta Roi Manager de Image J.

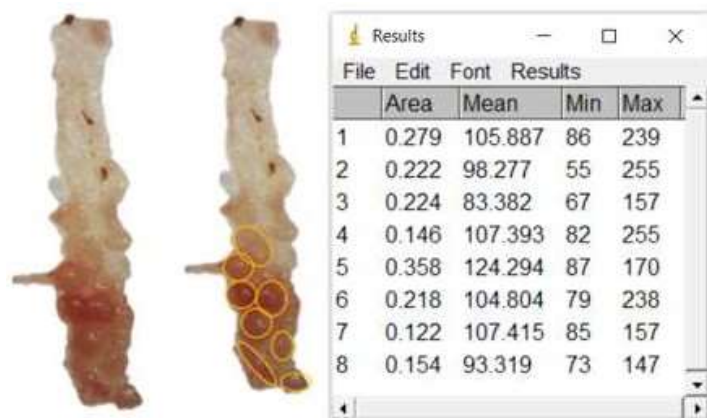


Figura 22. Análisis en Image J del área ocupada por cada pólipo desarrollado.

3.9.2.7.4 Análisis histológico

Al finalizar el ensayo experimental se extrajeron y sumergieron en formaldehído al 4% (Ref. 9713.9010, VWR Chemicals, Barcelona, España) el corazón, bazo, riñones, pulmones, hígado y colon durante 24h para la fijación y conservación de su morfología. Para el colon, después de tomar las fotografías oportunas, se utilizó la técnica swiss-rolling para facilitar la visualización de la morfología epitelial intestinal [173]. Tras ello, las muestras fueron totalmente deshidratadas mediante su inmersión en diversas soluciones crecientes de etanol, comenzando por etanol al 70%, seguido de etanol al 90% y por último etanol absoluto. Posteriormente, se sumergieron en xileno como líquido intermediario, para finalmente ser incluidas en parafina líquida, con un procesador automático (Tissue Processors Slee MTP). Se obtuvieron los bloques de parafina líquida usando un centro de inclusión de tejidos LEICA (EG1150C) y se consiguieron secciones de 5 μm de los bloques de parafina usando un microtomo (Leica, Wetzlar, Alemania). Todo el instrumental usado pertenece al Centro de Instrumentación Científica del Centro de Investigaciones Biomédicas de la UGR. Las secciones se tiñeron con distintas metodologías y se analizaron en el microscopio fotográfico Nikon Eclipse Ni (Melville, USA). La **Figura 23** muestra un esquema en detalle de todo el proceso.

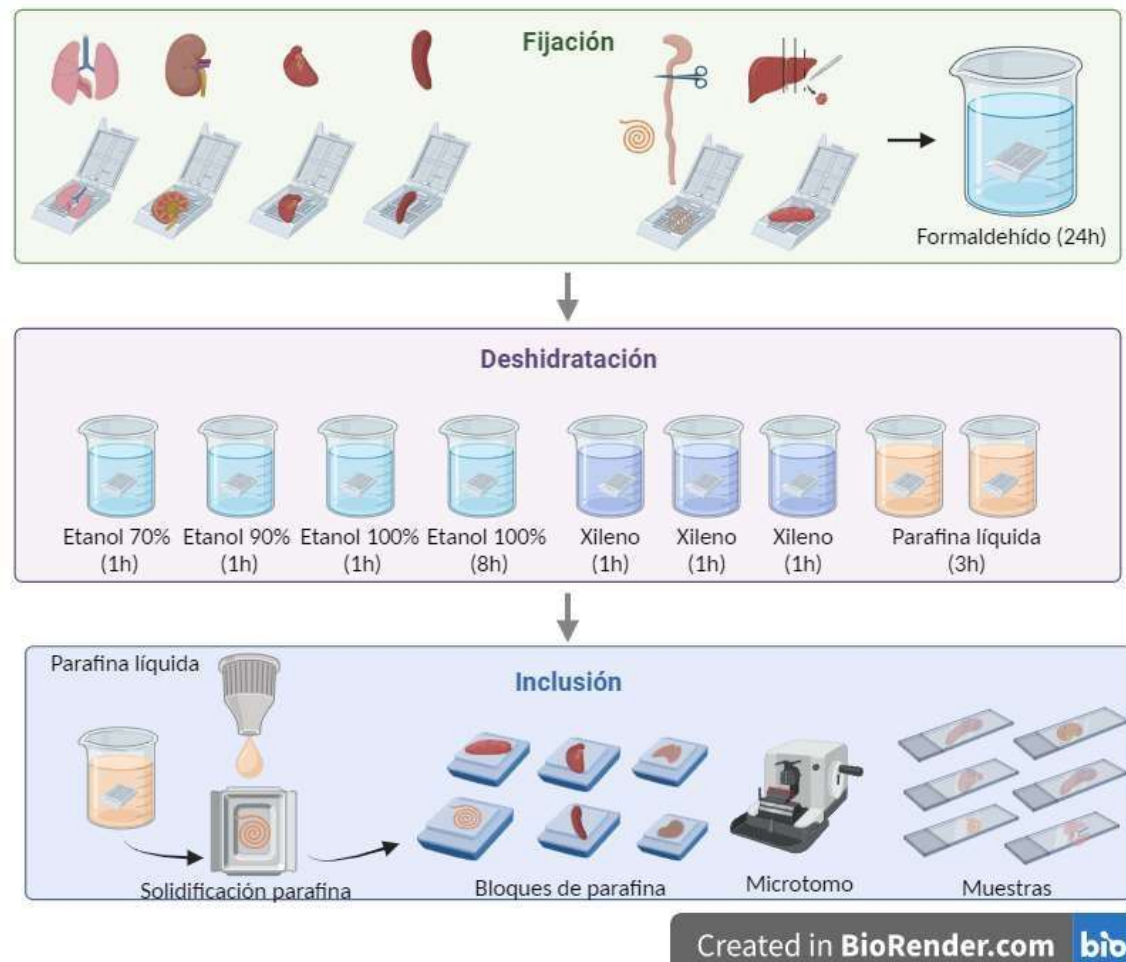


Figura 23. Esquema de los procesos de fijación, deshidratación e inclusión seguidos en el análisis histológico.

3.9.2.7.4.1 *Tinción mediante hematoxilina-Eosina*

Esta tinción ayuda a identificar diferentes tipos de células de los distintos tejidos, así como a detectar cualquier cambio morfológico de la muestra. La hematoxilina tiñe de un violeta intenso los ribosomas y la cromatina, mientras que la eosina tiñe de rosa el citoplasma y tejido conjuntivo, entre otros [174].

Para eliminar la parafina de la muestra, éstas ya cortadas y montadas sobre portaobjetos se sumergieron en una solución de Xileno 100% durante 10min, dos veces. Tras ello, la muestra se hidrató nuevamente sumergiéndola durante 5 min en soluciones decrecientes de etanol, y por último en agua destilada. Para su tinción, se sumergieron las muestras durante 10 min en el reactivo de Harris (Harris Hematoxilina, Ref.253949, PanReac AppliChem, España) y luego en eosina (Ref. 251299, PanReac AppliChem, España) durante 5 min más. Tras cada tinción las

muestras se lavaron durante 5 min con agua. Por último, se secaron usando soluciones crecientes de etanol hasta llegar al xilol, dónde se mantuvieron hasta su montaje con el líquido de montaje (Organo/limonene Mount, O8015 Sigma Aldrich). Tras el montaje, las muestras se dejaron secar al aire y ya estaban dispuestas para su análisis microscópico.

3.9.2.7.4.2 Método de tinción pentacrómico

Se usó el método pentacrómico descrito por Doello [175]. Los cortes histológicos se desparafinaron y rehidrataron de la misma forma que la usada en la sección anterior. Una vez hidratadas, las muestras se sumergieron durante 5 min en las siguientes soluciones: ácido clorhídrico al 5 %, solución de azul de toluidina y por último en solución roja Picro Sirius (Ref. ab246832, Abcam) Tras cada tinción, las muestras se lavaron con agua bidestilada. Por último, se dejaron secar a temperatura ambiente, para luego lavarlas tres veces con una solución de xilol 100 %, y montarlas con líquido de montaje Organo/limonene Mount (Ref. O8015, Sigma Aldrich).

3.9.2.7.5 Expresión génica

La extracción, purificación, retrotranscripción y PCR cuantitativa se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.9.1.6.10, con la excepción de que en este caso se usaron los siguientes cebadores: Para la expresión génica de transcritos del colon se usaron cebadores para genes involucrados en el metabolismo oxidativo como *cat* (Mm00437992), *gpx2* (Mm01286848), *sod2* (Mm01313000), genes codificantes de enzimas detoxificantes como *noq1*(Mm00500822_g1) y *gsta2* (Mm03019257_g1), marcadores de procesos inflamatorios como *IL-1b* (Mm00434228_m1) e *IL-6* (Mm00446190_m1), y genes involucrados en el desarrollo del cáncer como *Cadm1* (Mm00457551_m1), *Cdc42* (Mm01194005_g1), *Pik3cd* (Mm00435674_m1), *slc20* (Mm00489378_m1). En el músculo se determinaron marcadores de procesos inflamatorios como *tnfa* (Mm00443258_m1), *IL-1b* (Mm00434228_m1) e *IL-6*.

3.9.2.7.6 Metagenómica

El contenido cecal se recolectó al final del periodo experimental y se introdujo en nitrógeno líquido y posteriormente a -80 °C para el posterior aislamiento de ADN

genómico (ADNg). La preparación de bibliotecas, agrupación y secuenciación de mini secuencias fue realizada por el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La extracción se llevó a cabo usando el kit QIAamp® PowerFecal® y siguiendo las instrucciones del fabricante para la automatización del proceso con el robot QIAcube. La cuantificación del ADN genómico se realizó por fluorimetría (qubit) y se analizó mediante secuenciación de la región V4 (233 pb) de los genes del ARN ribosómico 16S (ARNr) utilizando el sistema MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU).

3.10 ESTADÍSTICA

Las diferencias significativas de los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se utilizó la prueba de Tukey para detectar diferencias entre las medias de los tratamientos o grupos experimentales. Los resultados se presentan como valores medios \pm error estándar de la media de tres réplicas para los ensayos *in vitro*, y de diez animales para los estudios *in vivo*. Excepto para el análisis de expresión génica, en el que se utilizaron ocho animales. Se aplicó específicamente la prueba t de Student para comprobar las diferencias significativas en el experimento de digestión *in vitro*. El análisis se realizó con Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS for Windows®, versión 22.0, Armonk, NY). El nivel de significación se fijó en $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAYOS EN MODELO DE OBESIDAD

4.1.1 Caracterización de los extractos vegetales

Un total de 19 especies de plantas pertenecientes a 9 familias distintas fueron analizadas con el objetivo de extraer y concentrar los compuestos fenólicos presentes en ellas, así como determinar aquellas con mayor capacidad antioxidante y rendimiento de extracción. El rendimiento de extracción y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos realizados se muestran en la **Tabla 13**. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo en el extracto de la pulpa liofilizada de *Argania spinosa*, seguido de *L.minor* (338.7 vs 300.0), *S.polyrhiza* (263.5 ± 7.2), *C.sativa* (166.1 ± 4.9) y *P.corylifolia* (145.8 ± 2.1). La mayor concentración de polifenoles totales, así como la mayor capacidad para inhibir la formación del radical libre de ABTS⁺ se obtuvo en el extracto de *A.spinosa*. El extracto de semillas de *O.basilicum* también mostró alta capacidad antioxidante, sin embargo, su rendimiento de extracción fue significativamente más bajo que la mayoría de los extractos. El extracto etanólico de las semillas de *P.corylifolia* así como el extracto de las especies pertenecientes a la familia Araceae (*L.minor* y *S.polyrhiza*) mostraron una alta concentración de polifenoles totales con 61.3, 44.7 y 58.8 µg equivalentes de AG/mg respectivamente. Sin embargo, la capacidad de inhibir la formación del radical libre de ABTS fue significativamente más elevada en especies como *Brassica oleraceae*. La mayor capacidad para quelar el hierro se encontró en el extracto etanólico de *L.minor*, seguido de *O. basilicum* LC, dos especies de la familia Apiaceae (*E.bourgatii* y *E. maritimum*), *C.sativa* y *S.polyrhiza*. Finalmente, la mayor capacidad de inhibir la peroxidación lipídica o formación de TBARs se encontró en el extracto de *O.basilicum* LC con 3.25 ± 0.15 unidades de actividad antioxidante (UAA) por miligramo de extracto, seguido de los extractos de *E.campestre* (2.10 ± 0.12), *S.lycopersicum* (1.56 ± 0.03), *C.sativa* (1.45 ± 0.09) y *S.polyrhiza* (1.43 ± 0.06).

Tabla 13. Rendimiento y capacidad antioxidante de los extractos etanólicos realizados a partir del material vegetal estudiado en el estudio de la obesidad.

Familia	Especie (n=23)	Material	Rendimiento (mg·g ⁻¹ harina)	Polifenoles (µg AG·mg ⁻¹)	ABTS (µg AG·mg ⁻¹)	CQFe (UCQ·mg ⁻¹)	TBARs (UAA·mg ⁻¹)
Amarillidaceae	<i>A. ampeloprasum var. porrum</i>	Semillas	52.8 (0.9) ^{cdef}	4.6 (0.5) ^a	2.34 (0.06) ^{abc}	0.67 (0.01) ^a	0.46 (0.01) ^{abc}
	<i>Allium cepa</i>	Semillas	57.6 (1.1) ^{defg}	6.0 (0.1) ^{ab}	1.36 (0.04) ^{ab}	0.92 (0.00) ^b	0.37 (0.01) ^{abc}
	<i>Allium cepa</i>	Semillas	69.8 (0.4) ^{fgh}	5.8 (0.1) ^{ab}	1.45 (0.01) ^{ab}	0.82 (0.01) ^{ab}	0.22 (0.00) ^{ab}
Apiaceae	<i>Eryngium maritimum</i>	Semillas	53.4 (0.6) ^{cdef}	26.8 (0.4) ^e	2.29 (0.03) ^{abc}	3.74 (0.03) ^k	0.22 (0.00) ^{ab}
	<i>Eryngium bourgatii</i>	Semillas	39.3 (0.4) ^{abc}	35.2 (0.3) ^f	4.93 (0.13) ^{de}	4.64 (0.04) ^m	1.14 (0.04) ^{de}
	<i>Eryngium campestre</i>	Semillas	38.7 (0.8) ^{abc}	28.0 (0.3) ^e	3.31 (0.08) ^{bcd}	1.70 (0.04) ^{fg}	2.10 (0.12) ^{gh}
Araceae	<i>Lemna minor</i>	Planta completa	300.0 (3.8) ⁿ	44.7 (0.3) ^g	4.31 (0.06) ^{cd}	5.91 (0.06) ⁿ	0.83 (0.03) ^{cd}
	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Planta completa	263.5 (7.2) ⁿ	58.8 (0.8) ⁱ	7.49 (0.35) ^{fg}	3.38 (0.16) ^j	1.43 (0.06) ^{ef}
Brassicaceae	<i>Camelina sativa</i>	Semillas	166.1 (4.9) ^l	37.8 (0.9) ^f	5.40 (0.17) ^{def}	3.95 (0.08) ^k	1.45 (0.09) ^{ef}
	<i>B. oleracea var. gemmifera</i>	Semillas	129.5 (3.6) ^k	28.6 (0.7) ^e	11.60 (0.10) ^{hi}	1.60 (0.02) ^{ef}	0.48 (0.01) ^{abc}
	<i>B.o var. gongyloides</i>	Semillas	105.1 (1.0) ^j	27.8 (0.3) ^e	11.37 (0.11) ^h	1.74 (0.01) ^{fg}	0.45 (0.03) ^{abc}
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Semillas	26.7 (0.4) ^a	4.0 (0.1) ^a	0.46 (0.01) ^a	0.82 (0.02) ^{ab}	-
	<i>Cucurbita pepo</i>	Semillas	50.3 (4.5) ^{cdef}	6.7 (0.1) ^{abc}	1.90 (0.05) ^{ab}	2.49 (0.06) ^h	1.53 (0.09) ^{ef}
Fabaceae	<i>Psoralea corylifolia</i>	Semillas	145.8 (2.1) ^k	61.3 (0.5) ⁱ	1.82 (0.03) ^{ab}	2.87 (0.01) ⁱ	0.61 (0.03) ^{bc}
	<i>Cicer arietinum</i>	Semillas	107.9 (2.4) ^j	2.7 (0.0) ^a	0.33 (0.03) ^a	1.78 (0.01) ^{fg}	0.13 (0.01) ^{ab}
	<i>Pisum sativum</i>	Semillas	83.7 (2.5) ^{hi}	6.7 (0.1) ^{abc}	0.37 (0.01) ^a	1.24 (0.01) ^{cd}	0.23 (0.01) ^{ab}

	<i>Vicia sativa</i>	Semillas	87.9 (1.0) ⁱ	23.2 (0.4) ^e	7.12 (0.27) ^{efg}	1.81 (0.03) ^{fg}	0.27 (0.03) ^{ab}
<i>Lamiaceae</i>	<i>O. basilicum Ligure Cert</i>	Semillas	46.9 (0.7) ^{bcde}	62.9 (5.3) ⁱ	14.99 (0.29) ^j	4.84 (0.01) ^m	3.25 (0.15) ^h
	<i>O. basilicum Mammolo</i>	Semillas	53.6 (1.6) ^{cdef}	60.6 (3.0) ⁱ	8.96 (0.05) ^g	2.30 (0.03) ^h	1.62 (0.05) ^{efg}
<i>Sapotaceae</i>	<i>Argania Spinosa</i>	Pulpa	338.7 (2.8) ^o	100.3 (0.9) ^j	51.2 (1.6) ^l	2.42 (0.04) ^h	0.64 (0.01) ^{bcd}
<i>Solanaceae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Semillas	30.1 (1.2) ^{ab}	24.7 (8.7) ^e	0.43 (0.05) ^a	1.68 (0.03) ^{fg}	0.57 (0.01) ^{abc}
	<i>C annuum Jalapeño</i>	Semillas	65.4 (1.2) ^{fg}	12.3 (4.3) ^{cd}	0.05 (0.01) ^a	1.24 (0.03) ^{cd}	0.20 (0.00) ^{ab}
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Semillas	65.2 (2.5) ^{efg}	7.3 (0.3) ^{abc}	0.40 (0.01) ^a	0.61 (0.03) ^a	1.56 (0.03) ^{ef}

Capacidad para quelar el hierro libre (CQF), capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs). Unidades equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g AG}$), unidades de actividad antioxidante (UAA). Resultados expresados como la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Medias con distintas letras (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o) muestran diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$) tras realizar un test de Tukey.

4.1.2 Diseño y caracterización del nutraceutico

4.1.2.1 Capacidad antioxidante

Los extractos que forman parte del nutraceutico fueron seleccionados en base a su capacidad antioxidante, alto rendimiento de extracción y elevada concentración de proteínas y péptidos bioactivos en los hidrolizados proteicos, ya que este además de presentar buenas propiedades biofuncionales debía ser tecnológicamente viable. Por tanto, el nutraceutico desarrollado se compuso de un 10% de extracto etanólico de pulpa de *Argania spinosa*, un 10% de extracto etanólico de semillas de *Camelina sativa*, un 40% de hidrolizado proteico de semillas de *Psoralea corylifolia* y un 40% de hidrolizado proteico de la planta completa de *Spirodela polyrhiza*. La siguiente tabla muestra los resultados de capacidad antioxidante de las diferentes pruebas químicas realizadas en el nutraceutico y de los distintos extractos usados para la formulación de este (Tabla 14).

El nutraceutico desarrollado consiguió incrementar significativamente la capacidad para quelar el hierro, así como la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, en comparación con los extractos constituyentes de forma individual. También se consiguió un incremento en la concentración de polifenoles totales y capacidad para reducir hierro con respecto a 3 de sus componentes.

Tabla 14. Capacidad antioxidante del nutraceutico desarrollado, y de los distintos extractos usados para la formulación del mismo.

	EtOH AS	EtOH CS	HP PC	HP SP	NT
Polifenoles ($\mu\text{g AG}\cdot\text{mg}^{-1}$)	76.4 (0.2) ^e	36.0 (0.8) ^c	23.9 (0.3) ^a	31.9 (0.7) ^b	40.9 (0.1) ^d
ABTS ($\mu\text{g AG}\cdot\text{mg}^{-1}$)	26.0 (1.2) ^d	9.1 (0.1) ^a	18.8 (0.1) ^c	16.0 (0.6) ^b	16.1 (0.4) ^{bc}
CQF ($\text{UCQ}\cdot\text{mg}^{-1}$)	3.2 (0.0) ^c	2.1 (0.0) ^b	2.2 (0.0) ^b	1.0 (0.0) ^a	3.5 (0.0) ^d
CRF ($\mu\text{g AG}\cdot\text{mg}^{-1}$)	54.2 (0.1) ^e	23.1 (0.1) ^c	15.7 (0.1) ^b	13.0 (0.1) ^a	25.4 (0.4) ^d
TBARs ($\text{mUAA}\cdot\text{mg}^{-1}$)	6.7 (0.2) ^a	11.6 (0.6) ^{ab}	11.0 (0.8) ^{ab}	15.7 (0.3) ^b	36.7 (3.9) ^c

Capacidad quelante del hierro (CQF); capacidad reductora del hierro (CRF), nutraceutico (NT), extracto etanólico de *Argania spinosa* (EtOH AS) o *Camelina sativa* (EtOH CS), hidrolizado proteico de *Spirodela polyrhiza* (HP SP) y *Psoralea corylifolia* (HP PC). Resultados expresados como la media más la desviación estándar de la media de tres réplicas. Medias con distintas letras (a, b, c y d) muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.05$).

4.1.2.2 Digestión *in vitro*

En la **Tabla 15** se presentan los resultados obtenidos en la prueba de digestión *in vitro*. En primer lugar, observamos que el 86.6% del nutracéutico formulado era potencialmente absorbible, lo que indica una alta digestibilidad. Además, la capacidad antioxidante del nutracéutico se mantuvo tras someterlo a este proceso, ya que en todas las pruebas realizadas la capacidad antioxidante fue significativamente superior a la del blanco de prueba, tanto en los dializados (componente potencialmente absorbible), como en los retenidos (componente que no es potencialmente absorbible y por tanto llegaría hasta el intestino grueso).

Tabla 15. Digestibilidad y capacidad antioxidante del nutracéutico tras un proceso de digestión *in vitro*.

	Dializado		Retenido	
	Blanco	NT	Blanco	NT
Digestibilidad (%)		86.6 (1.9)		
Polifenoles ($\mu\text{g AG}\cdot\text{mg}^{-1}$)	7.2 (0.2)	39.8 (0.7)***	8.2 (0.4)	43.7 (2.1)***
ABTS ($\mu\text{g AG}\cdot\text{mg}^{-1}$)	9.0 (0.2)	34.5 (0.5)***	7.1 (0.3)	21.7 (0.4)***
Cap quelante ($\text{UCQ}\cdot\text{mg}^{-1}$)	0.6 (0.0)	3.0 (0.1)***	0.4 (0.0)	3.87 (0.1)***
Cap reductora ($\text{UAR}\cdot\text{mg}^{-1}$)	0.8 (0.1)	10.1 (0.5)***	1.5 (0.2)	11.1 (0.4)***
TBARs ($\text{UAA}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.7 (0.0)	1.7 (0.0)***	0.9 (0.2)	3.3 (0.1)***

Resultados expresados como la media más error estándar de la media de tres réplicas. Medias con (***) muestran diferencias significativas ($p < 0.001$).

4.1.2.3 Citotoxicidad.

La citotoxicidad del nutracéutico desarrollado para el ensayo experimental del tratamiento de la obesidad, y de los distintos extractos usados para la formulación de este se muestra en la **Figura 24**. Se representa el porcentaje de proliferación a distintas concentraciones del compuesto, frente la línea celular T84 sin tratar (Control). Ni el nutracéutico, ni el extracto etanónico de *C.sativa* mostraron citotoxicidad en ninguna de las concentraciones probadas. Sin embargo, cuando se analizaron de forma aislada el resto de componentes se encontró una capacidad para inhibir la proliferación el 50% de la proliferación celular de $752.8 \pm 38.9 \mu\text{g/mL}$ del

hidrolizado proteico de *S.polyrhiza*, $366.0 \pm 36.9 \mu\text{g/mL}$ en el caso del hidrolizado proteico de *P.corylifolia* y $155.0 \pm 28.6 \mu\text{g/mL}$ para el extracto etanólico de *A.spinosa*.

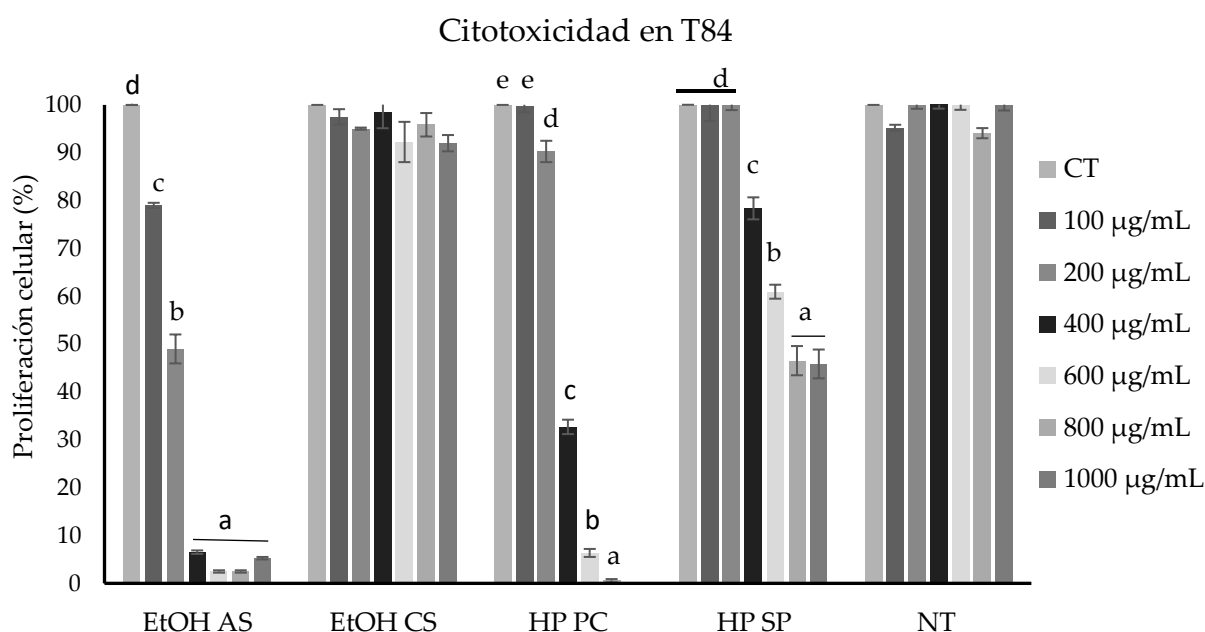


Figura 24. Capacidad de inhibir el crecimiento celular ensayado en la línea celular T-84 para el nutraceutico y los extractos usados en su formulación.

4.1.2.4 Capacidad antioxidante y antiinflamatoria en cultivo celular

La capacidad antioxidante y antiinflamatoria del nutraceutico, en las líneas celulares HT-29 y J774A.1 respectivamente, se muestra en la **Figura 25**. El porcentaje celular de HT-29 que sobrevivió tras la incubación con el agente oxidante paraquat (PQ) es del $50.1 \pm 1.0 \%$, mientras que cuando esta línea celular se preincubó con el nutraceutico se consiguió incrementar la supervivencia celular hasta un $67.1 \pm 2.8\%$, por lo que se consiguió un efecto antioxidante del 17% frente al paraquat en la línea celular HT-29.

La capacidad del nutraceutico para inhibir la formación de óxido nítrico inducida por la incubación de la línea celular de macrófagos J774A.1 con LPS, fue concentración-dependiente. Llegando a reducir la producción de óxido nítrico a más de la mitad cuando se coincubó el LPS con $50 \mu\text{g/mL}$ de NT, en concreto, se redujo la producción de 15.5 ± 0.2 a $6.1 \pm 0.4 \mu\text{moles}$.

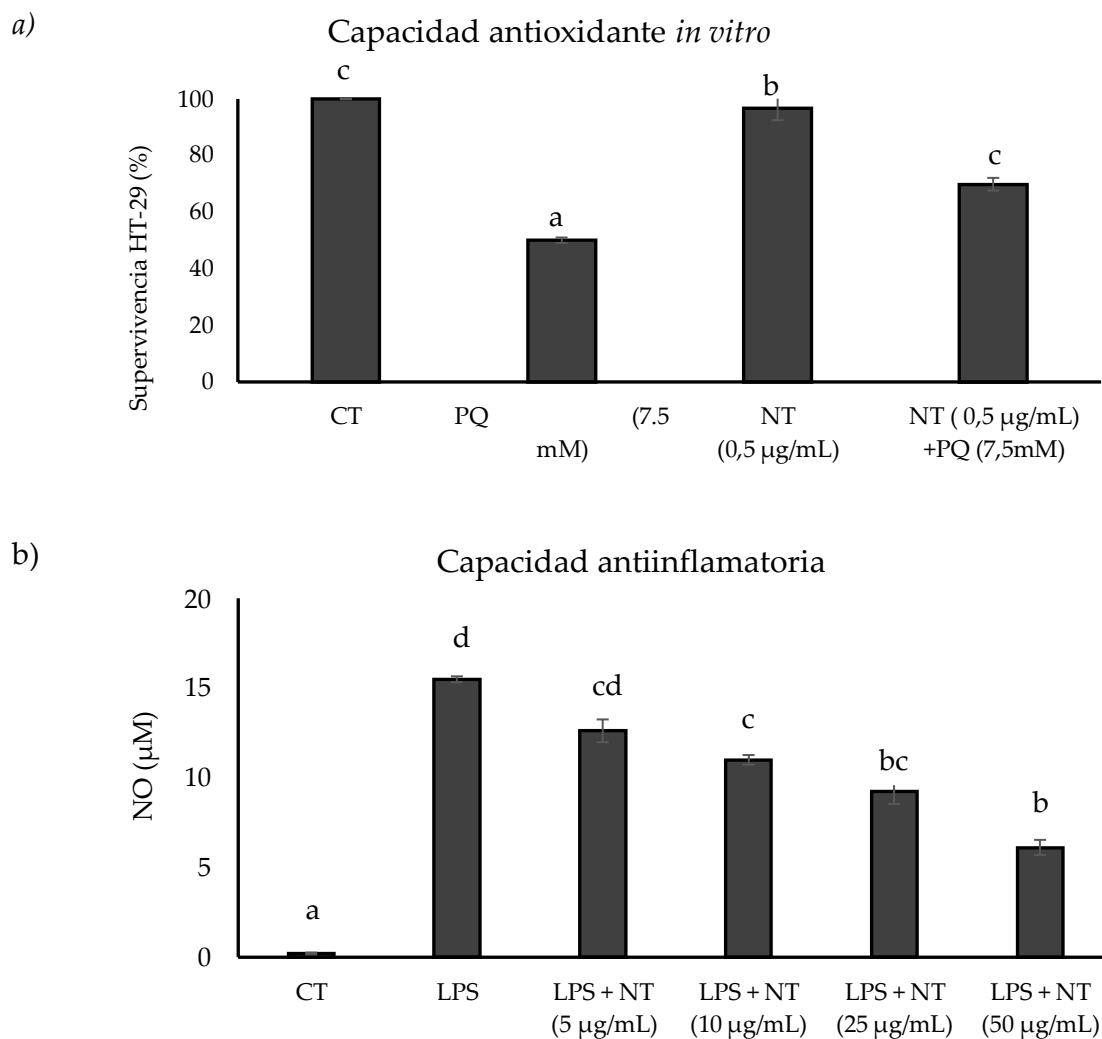


Figura 25. Capacidad antioxidante y antiinflamatoria del nutraceutico. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de ocho réplicas. Control (CT), paraquat (PQ), nutraceutico (NT), lipopolisacárido (LPS), óxido nítrico (NO).

4.1.2.5 Identificación de compuestos bioactivos

La identificación tentativa de los principales compuestos bioactivos presentes en los distintos extractos usados para la formulación del nutraceutico se muestra en la **Tabla 16**. En total se identificaron 51 compuestos diferentes en el nutraceutico. Con un mayor número de compuestos bioactivos (16) procedentes del hidrolizado proteico de semillas de *Psoralea corylifolia* y del extracto etanólico de la pulpa *Argania spinosa*, seguido del extracto etanólico de semillas de *Camelina sativa* y el hidrolizado de *Spirodela polyrhiza*, con 14 y 6, respectivamente.

Se identificaron un total de 51 compuestos, de entre los cuales, los más representativos fueron los flavonoides con 23 compuestos ((R)-naringenina, ácido flavólico, quercetina, sophoraflavanona B, barbatoflavona, volkensiflavona, dalmaisione D, dracoflavan A, lethedosido C, isoamoritin, avicularina, vitexina, xantoangelol, hesperidina, procianidina b2, catequina, rhoifolina, gossipina, rutina, isoquercetina, avicularina, quercetina-3-O-soforósido, prodelfinidina B4), seguidos de los terpenoides (apodantósido, acuosósido C, rosmanol, blumeósido C, picróside II, acevaltrato, tingenina B) y cumarinas (dihidrosa-midina, escoparona, glabranina, murpanicina, bergapteno), con 7 y 5 componentes, respectivamente. Además, se identificaron cuatro compuestos que pertenecen a los isoflavonoides (hemerocallona, alpinumisoflavona, 4' - O - metilglabridin, mirificin) y lignanos (4'-Demetilepipodohilotoxina β -D-glucósido, hidnocarpina, glucozaluzanina C, mirislignano), tres a los fenilpropanoides (curcumina II, 6-Deoxijacareubina, clorogenato de metilo) y dos a las quinonas (Rhein, monoacereín). Otros compuestos también identificados, como la vacciheína A, el ácido 2-O-cafeoilglucárico y el ácido cafeico 3-o-glucuronido, pertenecen a la superclase de los policétidos aromáticos, los derivados del ácido glucárico y de compuestos glicosilados, respectivamente.

Tabla 16. Compuestos bioactivos identificados en los distintos extractos usados en el NT.

TR	MS	COMPUESTO	FM	ppm	FIT	FRAGMENTOS			TIPO
<i>Argania spinosa</i>									
0.85	377.0927	Vacciheïn A	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	14.3	99.17	306.0615	263.0520	180.0443	Policétido
0.96	215.0361	Bergapteno	C ₁₂ H ₇ O ₄	7.9	66.72	197.0269	165.0546	159.0010	Cumarina
1.10	367.0999	Metil clorogenato	C ₁₇ H ₁₉ O ₁₉	-9.0	91.45	293.0556	239.0853	225.0683	Fenilpropanoide
1.38	609.1829	Hesperidina	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	1.6	94.06	556.2178	321.0901	294.0371	Flavonoide
2.18	371.0624	Ácido 2-O-cafeoilglucárico	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	2.7	78.14	253.1168	239.0847	207.0574	Policétido
3.26	577.1346	Procianidina b2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	9.0	94.94	321.1044	293.0450	275.0511	Flavonoide
3.76	289.0748	Catequina	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	12.5	97.48	275.0543	239.0788	225.0721	Flavonoide
4.00	577.1549	Rhoifolin	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	-1.4	83.53	321.0618	294.0135	275.0415	Flavonoide
4.10	479.0853	Gossypin	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	5.6	67.63	321.0564	207.0600	179.0671	Flavonoide
4.32	609.1522	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	10.8	4.56	307.0088	275.0408	239.0822	Flavonoide
4.60	463.0957	Isoquercetina	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	17.3	2.22	294.0232	179.0413	159.0064	Flavonoide
4.87	433.0853	Avicularina	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	18.9	0.22	329.0309	226.9883	159.0125	Flavonoide
5.39	625.1421	Quercetina 3-O-soforósido	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	2.6	98.19	293.033	239.0834	226.9906	Flavonoide
6.10	609.1296	Prodelfinidina B4	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	8.5	22.78	239.0906	225.0728	207.058	Flavonoide
6.52	547.1502	Mirificin	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₃	9.1	52.18	293.0367	239.0920	225.0791	Isoflavona
6.55	301.0388	Quercetina	C ₁₅ H ₉ O ₇	13.3	86.01	-	-	-	Flavonoide

<i>Camelina sativa</i>									
1.05	539.1401	Blumeósido C	C ₂₄ H ₂₇ O ₁₄	7.4	41.36	401.1378	387.1347	293.132	Glucósido
2.58	309.0763	6-Deoxyjacareubina	C ₁₈ H ₁₃ O ₅	-19.7	98.91	207.008	119.0434	251.0351	Fenilpropanoide
2.76	511.1494	Picrósido II	C ₂₃ H ₂₇ O ₁₃	9.2	95.61	251.051	227.0063	465.1489	Terpeno
2.87	519.2805	Acuósido C	C ₂₅ H ₄₃ O ₁₁	-19.3	96.93	253.1953	311.1444	441.2035	Terpeno
3.14	401.1084	Apodantósido	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₁	18.7	82.39	207.0605	173.0217	227.0172	Glucósido
4.37	523.1417	Barbatoflavona	C ₂₄ H ₂₇ O ₁₃	-5.5	0.01	227.0092	112.9958	251.048	Flavonoide
4.96	623.1917	Volkensiflavona	C ₃₆ H ₃₁ O ₁₀	-11.9	95.81	297.1126	227.0249	207.0365	Flavonoide
6.43	561.1456	Dalmaisione D	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₃	-8.0	36	311.1276	251.0369	441.1584	Flavonoide
7.06	793.3013	Dracoflavona A	C ₄₉ H ₄₅ O ₁₀	-6.6	33.63	652.2723	648.2186	653.2513	Flavonoide
7.65	479.1917	Acevaltrato	C ₂₄ H ₃₁ O ₁₀	13.6	87.99	293.1738	251.0464	311.1239	Terpeno
7.89	505.1346	Lethedosido C	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₂	8.7	28.56	254.028	227.0302	172.9797	Flavonoide
10.56	345.1702	Rosmanol	C ₂₀ H ₂₅ O ₅	-10.0	20.26	265.1567	251.0438	293.1656	Terpeno
11.99	435.2535	Tingenina B	C ₂₈ H ₃₅ O ₄	-6.0	43.33	353.204	325.189	266.1237	Terpeno
13.04	505.259	Isoamoritin	C ₃₁ H ₃₇ O ₆	7.0	82.88	397.2039	266.1328	239.0678	Flavonoide

<i>Psoralea corylifolia</i>									
2.71	355.0758	Hemerocallona	C ₁₉ H ₁₅ O ₇	-16.9	99.81	299.0195	215.0769	191.0442	Isoflavona
3.09	355.0722	Ác. cafeico 3-o-glucuronido	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	16.1	61.17	177.0213	172.9834	149.0190	Policétido
4.46	561.1682	Demetilepipodohilotoxina*	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₃	13.2	97.83	425.1482	365.1107	253.0942	Lignano
4.77	463.1098	Hidnocarpina	C ₂₅ H ₁₉ O ₉	14.9	90.55	251.0421	172.9791	128.0853	Lignano
5.57	271.0623	(R) - naringenina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	6.3	98.82	149.0234	128.0166	119.0434	Flavonoide
5.99	369.0630	Ácido flavódico	C ₁₉ H ₁₃ O ₈	5.4	98.38	267.0968	253.0851	179.0181	Flavonoide
6.45	283.0291	Rhein	C ₁₅ H ₇ O ₆	17.0	98.00	215.0053	205.0340	159.0141	Quinona
6.59	387.1494	Dihidrosamidina	C ₂₁ H ₂₃ O ₇	12.9	99.70	325.1483	265.1486	239.0964	Cumarina
6.73	301.0381	Quercetina	C ₁₅ H ₉ O ₇	11.0	99.61				Flavonoide
6.79	205.0539	Escoparona	C ₁₁ H ₉ O ₄	18.5	98.79	191.0283	164.0036	147.0019	Cumarina
7.45	325.0388	Monoacerein	C ₁₇ H ₉ O ₇	12.3	99.22	239.0745	172.9973	137.0322	Quinona
7.74	337.1111	Curcumina II	C ₂₀ H ₁₇ O ₅	10.4	99.15	128.02	119.0404	112.9984	Fenilpropanoide
10.6	339.1272	Sophoraflavanona B	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	11.8	97.07	323.1285	307.0518	173.0191	Flavonoide
10.74	335.0958	Alpinumisoflavona	C ₂₀ H ₁₅ O ₅	11.6	95.31	267.0569	240.0162	227.0439	Isoflavona
11.41	323.1334	Glabranina	C ₂₀ H ₁₉ O ₄	15.8	97.5	279.0573	253.0786	137.0235	Cumarina
11.79	337.1401	4' - O - Metilglabridin	C ₂₁ H ₂₁ O ₄	-11.6	98.3	309.1794	254.0658	251.0394	Isoflavona

<i>Spirodela polyrhiza</i>									
3.44	433.0771	Avicularina	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	5.8	12.1	226.9891	205.0535	161.0407	Flavonoide
4.22	431.0978	Vitexina	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	11.1	44.4	293.1036	226.9904	205.0513	Flavonoide
6.34	407.1706	Glucosaluzanina C	C ₂₁ H ₂₇ O ₈	17.7	91.84	343.1792	265.145	239.087	Lignano
6.97	391.1909	Xantoangelol	C ₂₅ H ₂₇ O ₄	-14.8	99.26	265.122	173.0271	159.0364	Flavonoide
7.92	373.1651	Mirisignano	C ₂₁ H ₂₅ O ₆	17.7	99.99	301.135	190.0971	173.0159	Lignano
15.99	303.1232	Murpanicina	C ₁₇ H ₁₉ O ₅	-6.6	73.6	265.1399	258.0806	226.9929	Cumarina

TR: tiempo de retención, FM: formula molecular, MS: masa molecular, FIT, ajuste (%).

* 4- Demethylepipodohyllotoxin β-D-glucoside

4.1.3 Ensayos *in vivo*

4.1.3.1 Peso e ingesta de los animales

El peso de los animales se muestra en la **Figura 26**. Como podemos observar, el desarrollo de obesidad se estableció a partir de la tercera semana del período experimental, en la que el peso del grupo de animales que consumieron una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida (HFHF) fue superior al doble de error estándar del grupo normocalórico (SD). Este incremento de peso siguió aumentando hasta la semana 9 de período experimental donde comenzaron a realizarse las distintas intervenciones. Se observó, que el cambio desde una dieta obesogénica alta en grasa y fructosa en el agua de bebida, a una dieta estándar produjo una disminución significativa del peso corporal de los animales que además fue más pronunciada cuando se combinó con la realización de un protocolo de ejercicio físico. Sin embargo, la inclusión del nutraceutico en la dieta no supuso una reducción del peso corporal con respecto a los animales que consumieron la dieta estándar sin incluir el nutraceutico.

Peso corporal

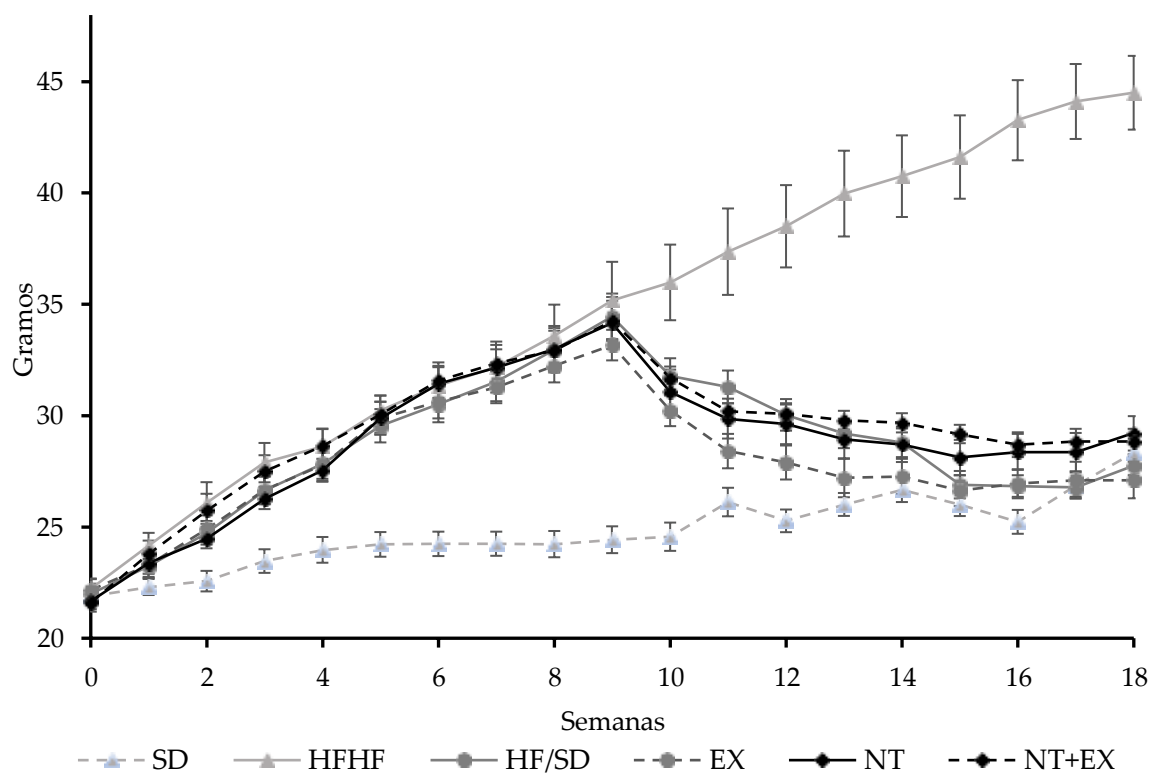
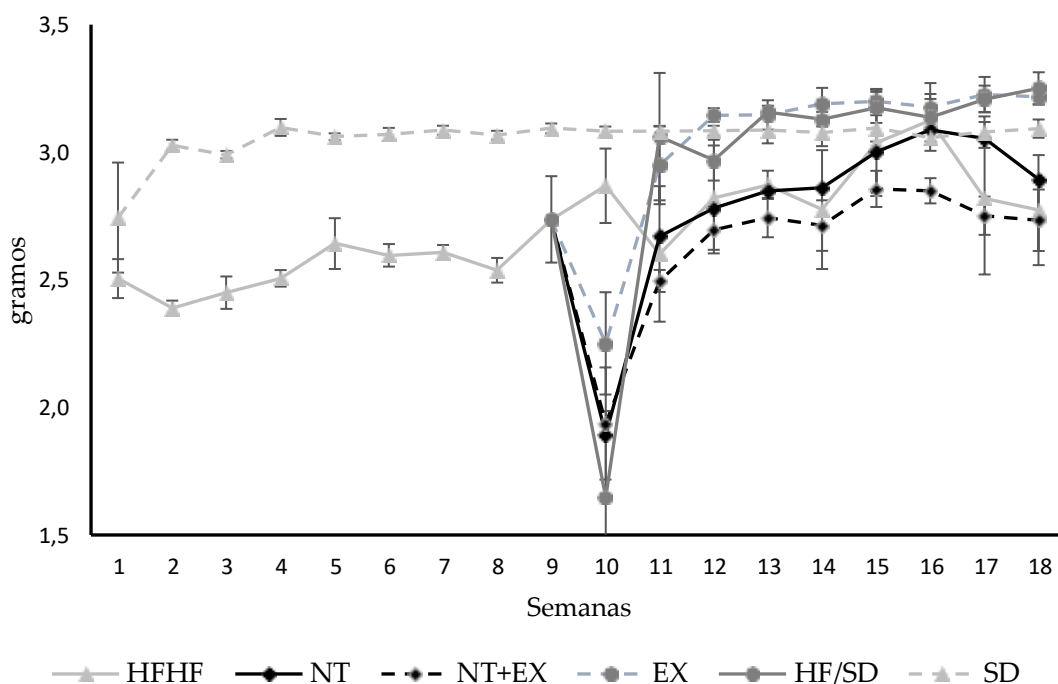


Figura 26. Evolución del peso de los animales durante todo el período experimental. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutrácéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutrácéutico combinada con ejercicio. Los resultados son medias de 10 ratones \pm error estándar de la media representado por barras verticales.

En cuanto a la ingesta de alimento y bebida, esta se presenta en las **Figura 26** y **Figura 27** respectivamente. Los animales que consumieron la dieta rica en grasa y fructosa en el agua de bebida presentaron una ingesta de alimento significativamente menor en comparación con los animales alimentados con la dieta normocalórica. Los grupos de animales que cambiaron a una dieta normocalórica combinada o no con el protocolo de entrenamiento (HF/SD y Ex) tuvieron una ingesta de alimentos similar a la del grupo que consumió la dieta estándar durante todo el periodo experimental ya que se sometieron a un *pair fed*. Los animales que incluyeron el nutraceutico en la dieta tuvieron una menor ingesta de alimento en comparación con el grupo SD, y esta ingesta de alimento fue aún menor cuando la inclusión del nutraceutico se combinó con ejercicio. En relación con el agua de bebida se observó que a partir de la semana 9 del período experimental se produjo un mayor consumo en aquellos animales que fueron alimentados con una dieta alta en grasa, y que tenían incluida en el agua de bebida fructosa al 20% y en aquellos animales que cambiaron a una dieta estándar y realizaron ejercicio físico, mientras que disminuyó en aquellos que cambiaron a una dieta estándar (HF/SD) y en aquellos que cambiaron a una dieta estándar con inclusión del nutraceutico, sola o en combinación con el protocolo de ejercicio físico (NT y NT+Ex).

Ingesta de alimento



Ingesta bebida

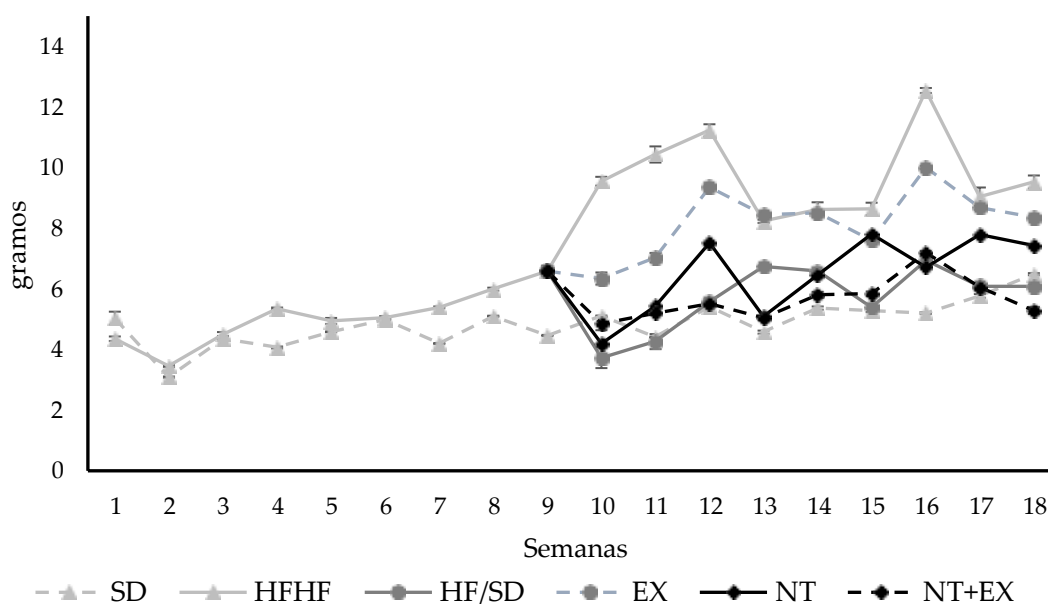


Figura 27. Evolución de la ingesta de alimento y agua de bebida durante todo el periodo experimental. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutrácéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutrácéutico combinada con ejercicio. Los resultados son medias de 10 ratones \pm error estándar de la media representado por barras verticales.

La ingesta calórica, calculada como el resultado de las calorías consumidas por la dieta más las calorías administradas como fructosa libre en el agua de bebida, en el caso del grupo HFHF, se muestra en la **Figura 28**. Con este cálculo se mostró, que, aunque los animales que ingirieron una dieta alta en grasa consumieron menos gramos de dieta, las calorías ingeridas fueron significativamente superiores a las del resto de grupos experimentales. Tras aplicar las distintas intervenciones el consumo de calorías disminuyó para todos los grupos que consumieron la dieta estándar ya que se realizó un *pair fed* para estos animales, intentando asemejar el estilo de vida a lo que ocurriría tras someterse a una restricción calórica

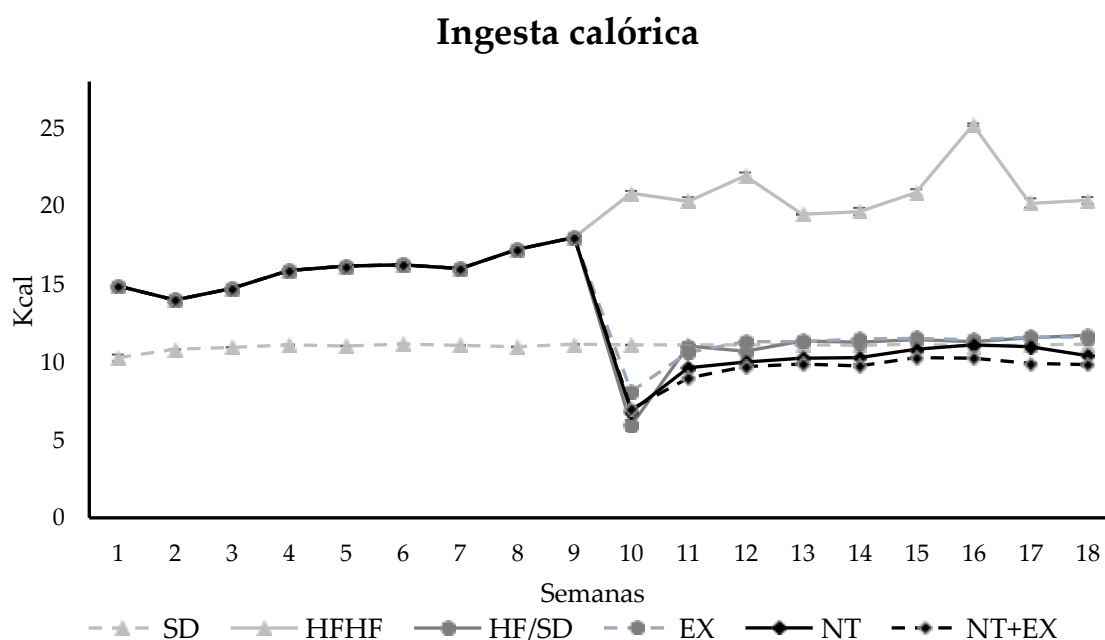


Figura 28. Evolución de la ingesta total de kilocalorías. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los resultados son medias de 10 ratones \pm error estándar de la media representado por barras verticales.

4.1.3.2 Test incremental de consumo máximo de O₂

Se realizaron dos pruebas incrementales para determinar el consumo máximo de oxígeno de los animales; uno al inicio del ensayo experimental para diseñar el protocolo de ejercicio físico y otro al final del período experimental para comprobar cómo había evolucionado este parámetro en los animales tras las intervenciones. El primer test se realizó con 8 animales elegidos al azar. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 17**. El peso medio de los animales cuando se realizó la prueba era de 29.51 ± 0.22 g, se alcanzó una velocidad máxima de 73cm/s, pero en promedio la velocidad fue de 61.50 ± 2.86 cm/s. lo que correspondía a un volumen de oxígeno máximo (VO₂ máx) de 332.67 ± 8.62 mL/min/kg y un coeficiente respiratorio (RQ) de 0.90 ± 0.02 .

Tabla 17. Test incremental al inicio del ensayo experimental.

Peso (g)	VO ₂ máx. (ml/min/kg ^{0.75})	Vel. máx. (cm/ s)	Distancia (cm)	RQ	Tiempo (min)
30.5	346.33	60	35591.6	0.84	19:40
29.9	369.67	61	36184.8	0.83	19:29
29.2	354.49	54	27709.0	0.88	17:02
29.1	334.85	70	46403.0	0.95	22:08
30.2	323.44	68	43844.4	0.91	21:27
29.5	314.11	55	29184.0	0.95	17:28
28.9	291.91	51	24508.8	0.89	16:01
28.7	326.59	73	51671.4	0.93	23:18

Consumo máximo de oxígeno (VO₂ máx), velocidad máxima alcanzada (vel. máx), coeficiente respiratorio (RQ). Resultados expresados por animal individual.

La última semana del período experimental se repitió la prueba incremental de velocidad en todos los animales, encontrándose diferencias significativas (**Tabla 18**). El VO₂ máximo fue significativamente inferior en los animales obesos, mientras que no existieron diferencias significativas entre el resto de los grupos.

Tabla 18. Test incremental al final del ensayo experimental.

	Peso (g)	VO ₂ máx. (mL/min/kg ^{0.75})	Vel. máx. (cm/ s)	Distancia (cm)	RQ	Tiempo (min)
SD	28.3 (0.6) ^a	230.7 (3.5) ^{bc}	58.5 (2.1) ^{ab}	330.5 (24.1) ^{ab}	0.86 (0.02) ^a	18:3 (0.7) ^a
HFHF	41.7 (1.1) ^b	176.1 (3.5) ^a	56.9 (1.9) ^{ab}	312.9 (20.9) ^{ab}	0.92 (0.01) ^{ab}	17:6 (0.6) ^a
HF/ SD	26.3 (0.5) ^a	223.4 (6.9) ^{bc}	61.1 (2.8) ^{ab}	363.2 (31.7) ^{ab}	0.84 (0.02) ^a	19:8 (1.2) ^a
EX	27.0 (0.9) ^a	243.7 (11.1) ^c	51.2 (3.7) ^a	250.4 (41.2) ^a	0.96 (0.02) ^b	15:8 (1.2) ^a
NT	28.4 (0.9) ^a	234.1 (4.6) ^c	64.6 (2.4) ^b	407.3 (33.7) ^b	0.87 (0.02) ^a	19:0 (1.2) ^a
NT+Ex	28.8 (0.6) ^a	194.7 (17.6) ^{ab}	58.6 (3.4) ^{ab}	346.1 (46.7) ^{ab}	0.97 (0.02) ^b	18:0 (0.9) ^a

SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Consumo máximo de oxígeno (VO₂ máx), velocidad máxima alcanzada (velocidad máx), coeficiente respiratorio (RQ). Resultados expresados como la media de 10 animales más error estándar de la media entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA p<0.05).

4.1.3.3 Parámetros hemáticos

El efecto de la obesidad y de las distintas intervenciones nutricionales y de ejercicio físico sobre los parámetros hemáticos analizados se muestra en la **Tabla 19**. La obesidad produjo una disminución significativa sobre los niveles de hemoglobina (HGB), que fueron recuperados tras la realización de ejercicio físico, y sobre todo tras combinar la práctica de ejercicio físico con el consumo del nutraceutico. El volumen corpuscular medio (MCV) también disminuyó al consumir la dieta alta en grasa y la fructosa en el agua de bebida, pero ninguna intervención pudo recuperar este parámetro. Los niveles de plaquetas que disminuyeron con el desarrollo de la obesidad (aunque no de forma significativa) se consiguieron revertir cuando los animales combinaron la ingesta de nutraceutico con la práctica de ejercicio físico.

Tabla 19. Efecto de la obesidad y las distintas intervenciones nutricionales y de ejercicio físico sobre los parámetros hemáticos.

	SD	HFHF	HF/SD	Ex	NT	NT + Ex
PLT	744.0 (52.5) ^{bc}	498.8 (80.2) ^{ab}	619.2 (61.9) ^{abc}	406.4 (76.2) ^a	466.8 (62.6) ^{ab}	800.8 (52.5) ^c
WBC	1.44 (0.17) ^{ab}	1.79 (0.34) ^b	1.11 (0.13) ^{ab}	1.64 (0.27) ^{ab}	0.85 (0.13) ^a	1.13 (0.1) ^{ab}
RBC	8.09 (0.17) ^a	6.94 (0.56) ^a	8.30 (0.18) ^a	7.12 (0.35) ^a	7.61 (0.32) ^a	8.02 (0.16) ^a
HGB	12.8 (0.2) ^c	10.4 (0.8) ^{ab}	10.1 (0.2) ^{ab}	11.3 (0.5) ^{bc}	9.03 (0.4) ^a	13.0 (0.2) ^c
HCT	37.0 (0.6) ^c	32.6 (1.1) ^{abc}	35.2 (0.75) ^{bc}	30.2 (1.4) ^a	31.8 (1.5) ^{ab}	33.7 (0.6) ^{abc}
MCV	45.6 (0.5) ^b	41.2 (0.8) ^a	42.2 (0.6) ^a	41.8 (0.7) ^a	41.8 (0.4) ^a	41.9 (0.2) ^a
MCH	15.7 (0.1) ^b	15.3 (0.7) ^b	12.1 (0.2) ^a	16.0 (0.2) ^b	12.0 (0.1) ^a	16.4 (0.3) ^b
MCHC	34.7 (0.2) ^b	37.3 (2.1) ^b	28.6 (0.13) ^a	38.3 (0.96) ^b	28.6 (0.4) ^a	38.3 (0.1) ^b
RDW	16.2 (0.4) ^a	17.0 (0.5) ^a	16.3 (0.14) ^a	17.3 (0.45) ^a	16.5 (0.3) ^a	16.6 (0.3) ^a

SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. PLT, plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); WBC, leucocitos; ($10^3/\mu\text{L}$); RBC, eritrocitos($10^3/\mu\text{L}$); HGB, hemoglobina (g/dL); HCT, hematocrito (%); MCV, volumen corpuscular medio (fL); MCH, hemoglobina corpuscular media (pg); MCHC, concentración MCH (g/dL); RDW, amplitud distribución eritrocitaria. Resultados expresados como la media de 10 animales más error estándar de la media entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA $p<0.05$).

4.1.3.4 Parámetros bioquímicos

El efecto de la obesidad sobre los parámetros bioquímicos analizados se muestra en la siguiente tabla (Tabla 20). El grupo que consumió durante todo el periodo experimental una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida, y desarrolló obesidad, mostró valores de CK-MB y colesterol LDL significativamente superiores al grupo que ingirió una dieta normocalórica (grupo control delgado). Estas diferencias fueron revertidas con todas las intervenciones nutricionales y de ejercicio físico realizadas, de manera que los grupos que consumieron el nutraceutico de forma aislada o combinado con la realización de un protocolo de ejercicio físico (NT y NT+Ex) y aquellos animales que después de consumir la dieta alta en grasa y fructosa, cambiaron a una dieta normocalórica (HF/SD), mostraron valores significativamente inferiores en los niveles de colesterol LDL, incluso por debajo a los del control normocalórico. Además, los animales que consumieron el nutraceutico de forma aislada aumentaron significativamente los niveles plasmáticos de Colesterol HDL. Con respecto a los niveles de TG, pudimos observar que aquellos animales que consumieron el nutraceutico y además realizaron el protocolo de ejercicio físico mostraron niveles significativamente inferiores en TG y fosfolípidos que el resto de los grupos experimentales. Además, la realización de ejercicio físico de forma aislada provocó un aumento significativo en los niveles de ácido úrico plasmático.

Tabla 20. Efecto sobre parámetros bioquímicos de la obesidad, así como de las distintas intervenciones nutricionales y de ejercicio físico.

	SD	HFHF	HF/SD	Ex	NT	NT + Ex
LDH (U/L)	1260 (143) ^a	1157 (152) ^a	1209 (90) ^a	1427 (45) ^a	948 (127) ^a	1156 (147) ^a
CK-MB (U/L)	206.7 (36.6) ^a	454.6 (82.2) ^b	216.1 (15.1) ^a	302.5 (27.8) ^a	190.1 (25.5) ^a	192.2 (25.5) ^a
ACE (U/L)	320.2 (27.7) ^a	291.5 (11.7) ^a	308.5 (6.4) ^a	349.6 (30.1) ^a	307.4 (12.8) ^a	294.6 (14.4) ^a
Colesterol total (mg/dL)	95.8 (3.8) ^a	165.5 (13.5) ^b	102.3 (1.9) ^a	87.8 (9.2) ^a	106.5 (2.4) ^a	100.4 (5.7) ^a
Colesterol HDL (mg/dL)	40.0 (4.6) ^a	46.8 (0.2) ^{ab}	48.2 (2.4) ^{ab}	46.8 (3.9) ^{ab}	55.5 (2.6) ^b	48.4 (4.4) ^a
Colesterol LDL mg/dL)	10.7 (0.53) ^b	22.0 (2.5) ^c	6.17 (0.69) ^a	8.93 (0.39) ^{ab}	5.89 (0.62) ^a	5.48 (0.39) ^a
A. Úrico (mg/dL)	1.10 (0.07) ^{ab}	0.69 (0.03) ^a	0.89 (0.11) ^{ab}	1.86 (0.14) ^c	1.50 (0.12) ^{bc}	1.24 (0.20) ^{abc}
Albúmina (g/dL)	3.43 (0.17) ^a	3.61 (0.24) ^a	3.52 (0.18) ^a	3.83 (0.04) ^a	3.65 (0.11) ^a	4.10 (0.19) ^a
Creatinina (mg/dL)	0.12 (0.02) ^a	0.43 (0.15) ^a	0.07 (0.01) ^a	0.08 (0.03) ^a	0.30 (0.14) ^a	0.31 (0.14) ^a
Fósforo UV (mg/dL)	9.52 (0.58) ^a	9.59 (0.61) ^a	8.46 (0.72) ^a	8.32 (0.42) ^a	8.11 (0.59) ^a	8.28 (0.80) ^a
Calcio ARS (mg/dL)	8.74 (0.40) ^a	9.06 (0.61) ^a	8.17 (0.96) ^a	9.29 (0.84) ^a	9.48 (0.64) ^a	9.53 (0.25) ^a
Triglicéridos (mg/dL)	43.1 (1.1) ^{bc}	40.5 (2.2) ^{abc}	33.2 (3.2) ^{ab}	36.6 (2.2) ^{ab}	46.8 (2.8) ^c	31.5 (2.0) ^a
Fosfolípidos (mg/dL)	53.3 (1.9) ^b	53.8 (1.2) ^b	52.7 (2.6) ^b	36.8 (2.6) ^a	61.6 (2.0) ^b	39.0 (0.9) ^a

SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutracéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutracéutico combinada con ejercicio. Enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), creatina quinasa (CK-MB) y la convertidora de angiotensina (ACE). Resultados expresados como la media de 10 animales más error estándar de la media, entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA $p < 0.05$).

4.1.3.5 Inmunoensayo

La concentración (pg/mL) de los distintos parámetros plasmáticos analizados se muestra en la **Tabla 21**. En relación con los marcadores inflamatorios analizados, el desarrollo de la obesidad aumentó significativamente la concentración plasmática de TNF α y resistina. La concentración plasmática de TNF α se redujo significativamente en los animales que realizaron ejercicio físico y/o consumieron el nutraceutico, mientras que la resistina plasmática disminuyó significativamente en los animales en los que se sustituyó la dieta HFHF por la dieta normocalórica (HFSD). Además, el ejercicio físico y especialmente el consumo del nutraceutico o la combinación de ambos disminuyeron significativamente este parámetro. La interleucina IL-6 no se vio afectada por el desarrollo de la obesidad bajo nuestras condiciones experimentales, pero la realización de ejercicio o la ingesta del nutraceutico, así como la combinación de ambas intervenciones, disminuyeron significativamente este parámetro.

Con respecto a los marcadores relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico, el desarrollo de la obesidad supuso un incremento en los niveles de insulina y leptina. Este efecto se consiguió revertir con todas las intervenciones realizadas, alcanzando una disminución más pronunciada con el nutraceutico y el protocolo de ejercicio. En el caso de la concentración plasmática de PYY y GLP-1 no se encontraron diferencias significativas con el desarrollo de la obesidad, pero los niveles de PYY fueron significativamente reducidos cuando los ratones realizaron ejercicio físico, y en el caso del GLP-1 este parámetro disminuyó con todas las intervenciones realizadas.

Tabla 21. Efecto del desarrollo de obesidad y de distintas intervenciones para revertirla sobre la concentración de citoquinas y hormonas.

	SD	HFHF	HF/ SD	Ex	NT	NT+Ex
TNF α	2.86 (0.14) ^b	3.82 (0.24) ^c	3.36 (0.23) ^{bc}	1.21 (0.01) ^a	1.44 (0.09) ^a	1.69 (0.07) ^a
Resistina	14099 (673) ^d	19345 (967) ^e	12071 (698) ^{cd}	10574 (498) ^{bc}	7022 (337) ^a	8540 (500) ^{ab}
IL-6	20.5 (0.4) ^b	20.3 (0.8) ^b	17.5 (0.8) ^b	12.0 (1.2) ^a	10.4 (0.5) ^a	11.2 (1.0) ^a
Insulina	600.7 (53.2) ^b	1096.0 (105.2) ^c	353.8 (33.5) ^a	315.0 (28.0) ^a	244.3 (11.3) ^a	204.2 (13.0) ^a
Leptina	2504.0 (204.0) ^b	7330.6 (325.1) ^c	665.4 (63.9) ^a	213.7 (14.0) ^a	585.2 (49.6) ^a	237.2 (13.2) ^a
GLP-1	15.7 (0.4) ^c	15.2 (1.2) ^c	9.4 (0.3) ^a	10.0 (0.2) ^{ab}	12.4 (0.5) ^b	10.5 (0.4) ^{ab}
PYY	44.2 (3.2) ^b	47.1 (2.8) ^b	52.0 (3.1) ^b	23.7 (1.7) ^a	48.7 (3.2) ^b	26.9 (3.6) ^a

SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Resultados expresados como pg/mL de la media de 10 animales más error estándar de la media, entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c,d,e) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA p<0.05).

4.1.3.6 Índices biológicos determinados

En la **Tabla 22** se muestra la longitud y circunferencia corporal de los animales, el índice de masa corporal, índice de Lee y los distintos índices aterogénicos calculados. Todos estos índices, fueron significativamente incrementados con el desarrollo de la obesidad a excepción de la relación entre los TG y el colesterol HDL. Aunque todas las intervenciones consiguieron revertir el efecto de la obesidad sobre estos parámetros, se consiguió un efecto más pronunciado en aquellos animales que ingirieron el nutraceutico en la dieta y además combinaron esta intervención con la realización del protocolo de ejercicio físico. Sobre todo, los índices de TG/HDL y Ln (TG/HDL), ya que además consiguió disminuirlos a niveles inferiores a los obtenidos en el grupo de animales normocalórico. Al igual que ocurrió con el índice LDL/HDL donde la ingesta de nutraceutico disminuyó este parámetro incluso por debajo de los valores del grupo SD.

Tabla 22. Efecto de la obesidad y de las intervenciones nutricionales o de ejercicio físico sobre índices antropométricos, aterogénicos e índice de Lee.

	SD	HFHF	HF/ SD	Ex	NT	NT+Ex
Longitud (cm)	9.66 (0.07) ^a	9.96 (0.05) ^b	9.70 (0.09) ^{ab}	9.48 (0.02) ^a	9.57 (0.10) ^a	9.50 (0.00) ^a
AC (cm)	8.50 (0.27) ^b	9.53 (0.13) ^c	7.97 (0.06) ^{ab}	8.09 (0.06) ^{ab}	7.74 (0.08) ^a	7.80 (0.19) ^a
IMC	0.31 (0.00) ^a	0.42 (0.01) ^b	0.30 (0.01) ^a	0.32 (0.01) ^a	0.31 (0.01) ^a	0.33 (0.00) ^a
Lee	0.56 (0.01) ^a	0.64 (0.01) ^b	0.55 (0.01) ^a	0.57 (0.00) ^a	0.56 (0.01) ^a	0.57 (0.00) ^a
HOMA	4.93 (0.38) ^b	11.8 (1.0) ^c	2.45 (0.20) ^a	2.51 (0.24) ^a	1.78 (0.08) ^a	1.67 (0.13) ^a
COL/ HDL	2.32 (0.15) ^a	3.53 (0.23) ^b	2.17 (0.11) ^a	2.23 (0.08) ^a	1.94 (0.06) ^a	2.05 (0.06) ^a
TyG	7.78 (0.10) ^{bc}	8.10 (0.06) ^c	7.39 (0.05) ^a	7.60 (0.12) ^{ab}	7.76 (0.03) ^b	7.50 (0.04) ^{ab}
No HDL	56.2 (2.6) ^a	118.6 (11.0) ^b	54.2 (2.6) ^a	57.2 (1.9) ^a	49.6 (2.1) ^a	47.7 (1.5) ^a
TG/HDL	0.92 (0.04) ^b	0.92 (0.03) ^b	0.81 (0.02) ^{ab}	0.83 (0.04) ^b	0.81 (0.02) ^{ab}	0.67 (0.05) ^a
LDL/HDL	0.23 (0.01) ^b	0.37 (0.07) ^c	0.16 (0.01) ^{ab}	0.17 (0.02) ^{ab}	0.10 (0.01) ^a	0.11 (0.01) ^a
(C-HDL)/ HDL	1.19 (0.08) ^a	2.50 (0.14) ^b	1.22 (0.10) ^a	1.28 (0.06) ^a	0.94 (0.06) ^a	1.04 (0.06) ^a
Ln (TG/ HDL)	-0.04 (0.02) ^b	-0.04 (0.02) ^b	-0.09 (0.01) ^b	-0.09 (0.02) ^b	-0.10 (0.01) ^{ab}	-0.17 (0.02) ^a

Circunferencia abdominal (AC), índice de masa corporal (IMC). SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Resultados expresados como la media de 10 animales más error estándar de la media, entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c,) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA $p < 0.05$).

/

4.1.3.7 Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG)

En la última semana del período experimental se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Antes de la administración de la sobrecarga oral de glucosa se midió la glucosa basal de los ratones de los distintos grupos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 29** y **Tabla 23**. Con relación a la glucemia basal, se pudo observar que el desarrollo de la obesidad mediante la administración de la dieta hipercalórica incrementó significativamente los valores de glucemia basal con respecto al resto de grupos experimentales. Tras 15 min de la sobrecarga oral de glucosa se observó un incremento significativo en los niveles de glucemia de los animales de los grupos HFHF, HF/SD y SD, con respecto a los grupos de animales que consumieron el nutraceutico, realizaron ejercicio o combinaron ambas intervenciones. A los 30, 60, 90 y 120 min el nivel de glucosa del grupo de animales que desarrolló la obesidad siguió siendo significativamente superior al resto de grupos. A partir de los 90 min los niveles de glucosa del grupo SD se equipararon a los de los grupos experimentales mientras, el resto de los grupos consiguió alcanzar los niveles de glucemia basal prácticamente a los 120 min después de la sobrecarga oral de glucosa.

Tras finalizar la prueba los resultados se transformaron y representaron como datos arbitrarios para obtener el área bajo la curva de cada grupo experimental (**Figura 30**).

El desarrollo de la obesidad produjo un aumento significativo del área bajo la curva con respecto al resto de grupos experimentales. El grupo HF/SD presentó unos valores equiparables al grupo control normocalórico, mientras que la realización del ejercicio físico y la administración del nutraceutico redujeron significativamente este

parámetro, y más aún cuando las dos intervenciones se combinaron.

OGTT

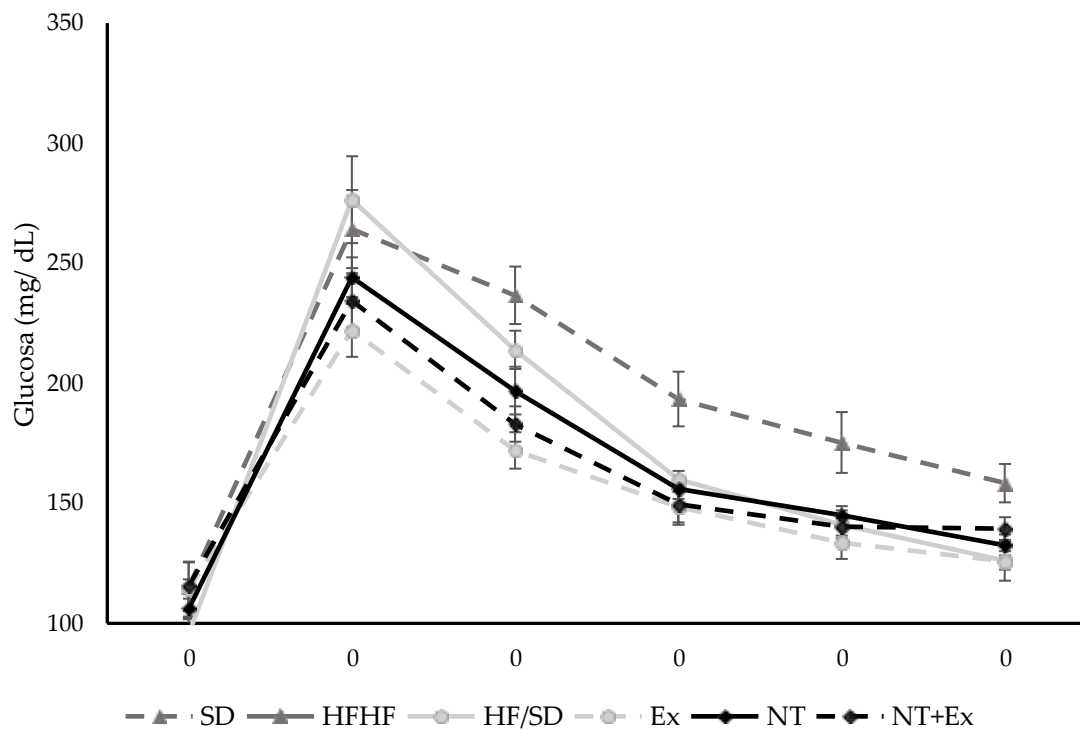


Figura 29. Evolución de los niveles de glucemia basal y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min de una sobrecarga oral de glucosa. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los resultados son medias de 10 ratones más el error estándar de la media representado por barras verticales.

Tabla 23. Valores de glucemia basal y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min del TTOG.

	Basal	15min	30min	60min	90min	120min
SD	115.2 (10.2) ^a	264.2 (16.3) ^{ab}	236.6 (12.0) ^b	193.4 (11.4) ^{bc}	175.3 (12.7) ^b	158.3 (8.0) ^b
HFHF	155.6 (6.6) ^b	324.0 (15.7) ^b	312.9 (18.1) ^c	221.3 (13.5) ^c	231.7 (8.6) ^c	229.7 (12.2) ^c
HF/SD	95.8 (6.0) ^a	276.4 (18.1) ^{ab}	213.9 (8.0) ^{ab}	159.9 (3.5) ^{ab}	141.2 (5.8) ^a	126.2 (3.8) ^{ab}
Ex	114.2 (11.4) ^a	222.0 (11.0) ^a	172.0 (7.6) ^a	148.4 (6.4) ^a	133.7 (6.9) ^a	125.9 (8.1) ^a
NT	106.2 (4.1) ^a	244.1 (8.3) ^a	196.9 (9.9) ^{ab}	156.1 (4.3) ^{ab}	145.0 (3.8) ^{ab}	132.6 (4.4) ^{ab}
NT+Ex	115.7 (2.6) ^a	234.3 (11.4) ^a	183.0 (7.4) ^a	149.6 (8.6) ^a	140.1 (3.6) ^a	139.4 (4.8) ^{ab}

SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutracéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutracéutico combinada con ejercicio. Resultados expresados en mg/dL de la media de 10 animales más error estándar de la media entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA p<0.05).

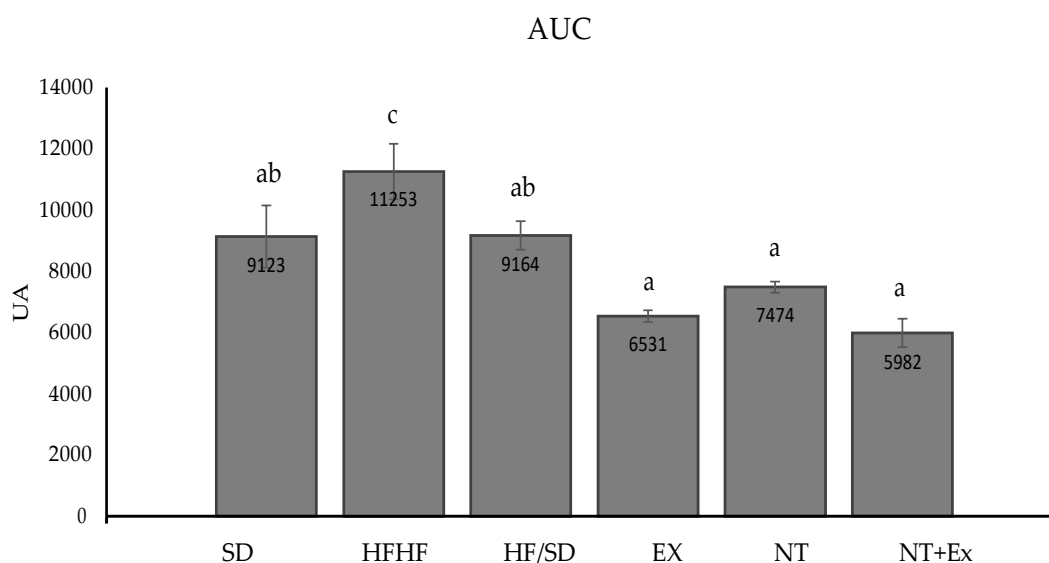


Figura 30. Efecto de la obesidad e intervenciones sobre los valores del área bajo la curva (AUC) después de realizar un test de tolerancia oral a la glucosa. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutracéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutracéutico combinada con ejercicio. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) de la media de 10 ratones más el error estándar de la media representado por barras verticales. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA p<0.05).

4.1.3.8 Composición corporal

El efecto del desarrollo de la obesidad y las distintas intervenciones sobre la composición corporal se muestra en la **Tabla 24**. Se pudo observar que el grupo de animales que consumieron la dieta hipercalórica y la fructosa en el agua de bebida durante todo el período experimental (HFHF) presentó valores significativamente superiores en el porcentaje de grasa, disminuyendo en consecuencia el porcentaje de agua y masa magra. Esto fue revertido con las distintas intervenciones consiguiendo equiparar el porcentaje de grasa a la del grupo normocalórico (SD) con la intervención nutricional de cambio a una dieta normocalórica sola (HF/SD) o en combinación con el nutracéutico (NT). Esta disminución fue incluso más remarcada, mostrando valores significativamente inferiores en los animales que realizaron el programa de ejercicio físico. Paralelamente, el porcentaje de masa magra se incrementó en todos los grupos con intervenciones (HF/SD, Ex, NT y NT+Ex) aunque de forma más pronunciada en aquellos que realizan ejercicio físico (Ex, NT+Ex).

Tabla 24. Composición corporal de los distintos grupos experimentales.

	Grasa (%)	Masa magra (%)	Agua Total (%)
SD	11.9 (0.6) ^b	88.1 (0.6) ^b	72.3 (1.0) ^b
HF	33.8 (1.2) ^c	67.6 (1.6) ^a	54.1 (1.6) ^a
HF/ SD	11.6 (0.7) ^b	88.4 (0.7) ^{bc}	70.1 (0.7) ^b
EX	8.7 (0.5) ^a	91.7 (0.6) ^c	71.3 (1.1) ^b
NT	11.7 (0.3) ^b	88.0 (0.4) ^{bc}	69.6 (0.4) ^b
NT+Ex	8.1 (0.3) ^a	91.9 (0.3) ^c	71.3 (1.1) ^b

SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutracéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutracéutico combinada con ejercicio. Resultados expresados como la media de 10 animales más error estándar de la media entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA $p < 0.05$).

4.1.3.9 Peso de los órganos

El efecto del desarrollo de la obesidad, así como de las distintas intervenciones realizadas, sobre el peso de los órganos se muestran en la **Tabla 25**. El desarrollo de la obesidad tuvo un impacto significativo en el peso de los diferentes órganos, aumentando el tamaño del colon, la grasa abdominal y la grasa epididimal. Aunque no de forma significativa, el desarrollo de la obesidad también supuso un aumento del tamaño del hígado, los riñones, el corazón y el bazo, mientras que el peso del ciego se redujo en los animales obesos. El aumento del tamaño del hígado, la grasa epididimal y la grasa abdominal se invirtió completamente con todas las intervenciones aplicadas: cambio de dieta, realización del protocolo de ejercicio e ingesta del nutraceutico. Por último, el cambio de dieta a una dieta normocalórica y la inclusión del nutraceutico en la dieta produjo un aumento significativo del peso del ciego.

Tabla 25. Efecto del desarrollo de la obesidad, así como de las distintas intervenciones realizadas, sobre el peso de los órganos analizados

	SD	HF	HF/ SD	Ex	NT	NT + Ex
Hígado	5.13 (0.08) ^{bc}	5.29 (0.23) ^c	4.70 (0.07) ^{ab}	4.58 (0.13) ^a	4.62 (0.10) ^{ab}	4.40 (0.12) ^a
Riñones	0.68 (0.01) ^a	0.71 (0.01) ^{ab}	0.76 (0.01) ^b	0.75 (0.01) ^b	0.72 (0.01) ^{ab}	0.68 (0.01) ^a
Corazón	0.60 (0.02) ^a	0.64 (0.01) ^a	0.62 (0.01) ^a	0.62 (0.02) ^a	0.64 (0.01) ^a	0.60 (0.01) ^a
Bazo	0.32 (0.03) ^{ab}	0.38 (0.02) ^b	0.33 (0.02) ^{ab}	0.30 (0.02) ^a	0.32 (0.01) ^{ab}	0.33 (0.03) ^{ab}
Ciego	0.24 (0.01) ^{ab}	0.19 (0.01) ^a	0.26 (0.01) ^b	0.20 (0.02) ^a	0.25 (0.01) ^b	0.26 (0.01) ^b
Colon	0.38 (0.01) ^a	0.50 (0.02) ^{bc}	0.46 (0.02) ^b	0.54 (0.01) ^{bc}	0.48 (0.02) ^b	0.56 (0.01) ^c
Gr. epid.	2.71 (0.33) ^a	8.67 (0.52) ^b	2.89 (0.26) ^a	2.63 (0.34) ^a	3.53 (0.47) ^a	2.68 (0.37) ^a
Gr. abd.	0.65 (0.12) ^a	2.99 (0.32) ^b	0.70 (0.09) ^a	0.67 (0.15) ^a	1.08 (0.17) ^a	0.84 (0.20) ^a
Gastroc.	0.55 (0.01) ^{ab}	0.57 (0.01) ^{ab}	0.57 (0.01) ^{ab}	0.55 (0.01) ^{ab}	0.58 (0.01) ^b	0.54 (0.01) ^a
Plantaris	0.08 (0.00) ^a	0.08 (0.00) ^a	0.08 (0.00) ^a	0.07 (0.00) ^a	0.08 (0.00) ^a	0.08 (0.00) ^a

Grasa epididimal (Gr.epid.), grasa abdominal (Gr.abd.), gastrocnemius (gastroc). SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Resultados expresados en gramos como la media de 10 animales más error estándar de la media entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b, c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA p<0.05).

4.1.3.10 Parámetros hepáticos

4.1.3.10.1 Porcentaje de grasa y humedad

El efecto del desarrollo de la obesidad, así como de las distintas intervenciones realizadas, sobre el porcentaje de grasa y humedad en el hígado se muestran en la **Figura 31**. El hígado del grupo de animales obesos mostró un porcentaje significativamente mayor de grasa de 11.63 ± 0.52 y, en consecuencia, un menor porcentaje de humedad (64.5 ± 1.8) que el resto de los grupos. Todas las intervenciones produjeron una disminución significativa del porcentaje de grasa hepática obteniendo valores similares al grupo de animales que consumieron la dieta estándar durante todo el periodo experimental.

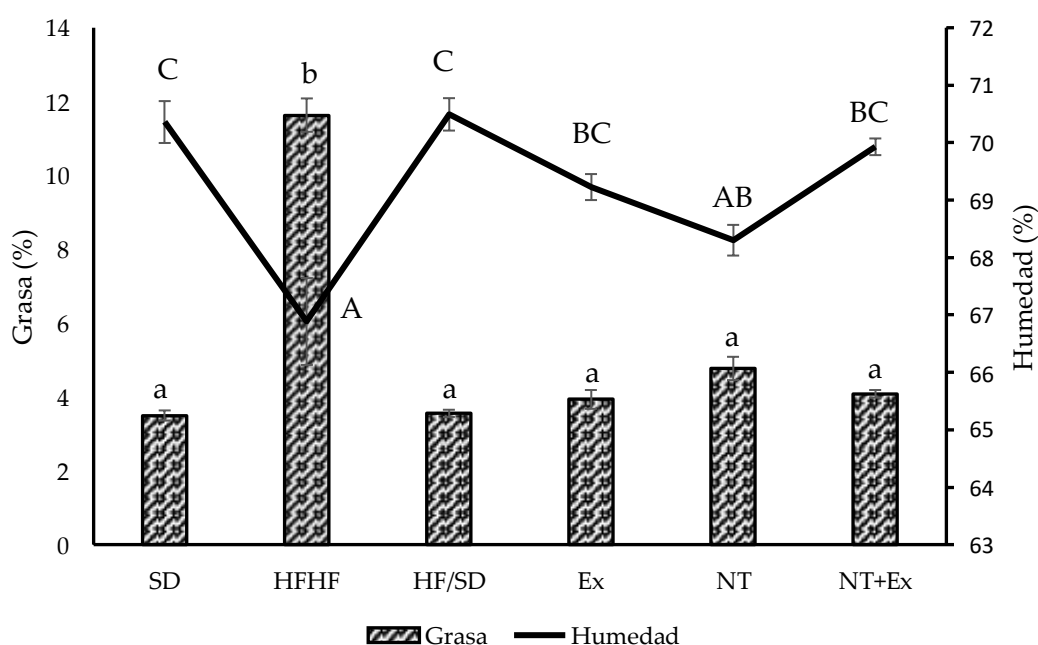


Figura 31. Efecto del desarrollo de la obesidad, así como de las distintas intervenciones realizadas, sobre el porcentaje de grasa y humedad en el hígado. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los resultados son medias de 10 ratones más el error estándar de la media representado por barras verticales. Medias con distintas letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al porcentaje graso (a, b, c) y humedad (A,B,C).

4.1.3.10.2 Actividad enzimática del hígado

La **Tabla 26** muestra el efecto del desarrollo de la obesidad y de las distintas intervenciones realizadas sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y la actividad detoxificante del hígado. La inducción de la obesidad produjo un aumento significativo de la actividad de las enzimas SOD dependiente de Cu/Zn y la enzima GST en comparación con el grupo delgado (SD). Mientras que todas las intervenciones realizadas restablecieron los valores de la enzima SOD Cu/Zn similares a los del grupo SD, sólo la inclusión del nutracéutico en la dieta consiguió normalizar la actividad de la enzima GST. Aunque el desarrollo de obesidad en nuestro modelo experimental no produjo cambios significativos en la actividad enzimática SOD Mn, todas las intervenciones ensayadas aumentaron la actividad de esta enzima, siendo significativo este aumento con respecto al control delgado (SD) cuando se incluyó en nutracéutico en la dieta de los animales. Además, la actividad CAT disminuyó significativamente en el grupo que realizó el protocolo de ejercicio en relación con el grupo de control delgado y el grupon control obeso, mientras que la combinación de la inclusión en la dieta de nutracéutico y el protocolo de ejercicio aumentó significativamente la actividad GPx.

Tabla 26. Efecto del desarrollo de la obesidad y de las distintas intervenciones realizadas sobre la actividad antioxidante del hígado.

	SD	HF	HF/ SD	Ex	NT	NT + Ex
CAT	7.00 (0.14) ^b	7.01 (0.26) ^b	7.00 (0.15) ^b	6.10 (0.11) ^a	6.43 (0.1) ^{ab}	6.20 (0.25) ^{ab}
GPx	4.65 (0.31) ^a	5.23 (0.22) ^{ab}	5.58 (0.22) ^{abc}	5.61 (0.24) ^{abc}	6.08 (0.28) ^{bc}	6.35 (0.22) ^c
SOD Mn	27.3 (1.8) ^a	25.7 (1.3) ^a	33.8 (1.1) ^b	35.7 (1.3) ^b	37.5 (1.2) ^{bc}	42.1 (0.9) ^c
SOD _{Cu/Zn}	398.9 (11.6) ^b	475.4 (15.0) ^c	367.7 (7.8) ^{ab}	369.7 (9.0) ^{ab}	389.4 (6.6) ^{ab}	346.6 (6.6) ^a
SOD T	428.0 (22.5) ^{ab}	480.6 (20.7) ^b	401.5 (7.9) ^a	405.4 (9.5) ^a	427.0 (6.7) ^{ab}	388.8 (10.2) ^a
GST	1684 (67.1) ^a	2313 (116.9) ^b	2050 (65.5) ^b	2105 (43.9) ^b	1720 (81.7) ^a	1699 (56.9) ^a

Catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD-Mn), de Cu/Zn (SOD-Cu/Zn) o total (SOD T). SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosas; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutracéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutracéutico combinada con ejercicio. Resultados expresados como unidad de actividad enzimática (UA) por mg de proteína, menos para GPx que se expresan en nmol NADPH/min/mg proteína de la media de 10 animales más error estándar de la media entre paréntesis. Medias con distintas letras (a,b,c) representan diferencias significativas entre grupos (ANOVA $p < 0.05$).

4.1.3.11 Expresión génica en hígado y músculo

Los resultados de expresión génica de enzimas antioxidantes relacionados con la actividad antioxidante, detoxificantes y marcadores de inflamación en el hígado y el músculo *plantaris* se muestran en la **Tabla 27**. El desarrollo de la obesidad aumentó significativamente la expresión génica del marcador de inflamación *tnfa*. Este aumento se revirtió con el tratamiento dietético con una dieta estándar y concretamente *tnfa* mostró una remarcada disminución de la expresión génica en los grupos que realizaron el protocolo de ejercicio o consumieron el nutraceutico. Los niveles de expresión para *cat*, *sod2*, *gsta2* y *nqo1* aumentaron significativamente en los animales que consumieron el nutraceutico combinado con la realización del protocolo de ejercicio (NT+Ex) en comparación con los grupos control, tanto delgado como obeso. Mientras que el ejercicio por sí solo incrementó la expresión génica de las enzimas *cat* y *sod2*, y la inclusión en la dieta del nutraceutico provocó un aumento de la actividad *cat* y *gsta2* y una disminución significativa de la actividad *sod1*.

En cuanto a la expresión génica en el músculo se observó un aumento significativo en la expresión de la *gpx* a causa del desarrollo de la obesidad. Sin embargo, el cambio de una dieta alta en grasa combinado con el consumo de fructosa en el agua de bebida a una dieta normocalórica estándar, combinada o no con la práctica de ejercicio físico, modificó la expresión génica muscular de las enzimas antioxidantes de diferente forma. La expresión génica de *cat*, *sod1* y *sod2* disminuyó significativamente, mientras que la expresión de *gpx2* se vio aumentada también significativamente. La inclusión del nutraceutico en la dieta aumentó significativamente la expresión génica de *cat* y *sod2* en comparación con el grupo HF/SD. Por último, la combinación de ingesta del nutraceutico y la práctica de ejercicio físico aumentó significativamente la expresión génica de la *cat*, la *sod 1* y *2* (**Tabla 27**).

Tabla 27. Expresión génica de enzimas relacionados con la actividad antioxidante, detoxificante y biomarcadores inflamatorios en el hígado y el músculo *plantaris*.

	SD	HFHF	HF/SD	EX	NT	NT+Ex	
HÍGADO	<i>cat</i>	1.00 (0.13) ^a	1.11 (0.10) ^a	1.73 (0.06) ^b	1.84 (0.13) ^b	2.09 (0.25) ^{bc}	2.54 (0.19) ^c
	<i>gpx2</i>	1.00 (0.08) ^a	1.04 (0.18) ^a	1.45 (0.07) ^a	1.22 (0.12) ^a	1.22 (0.22) ^a	1.11 (0.14) ^a
	<i>sod1</i>	1.00 (0.05) ^{bc}	1.19 (0.03) ^c	0.81 (0.05) ^{ab}	1.06 (0.13) ^c	0.62 (0.05) ^a	1.06 (0.07) ^c
	<i>sod2</i>	1.00 (0.06) ^a	1.11 (0.07) ^a	1.40 (0.06) ^{ab}	1.53 (0.06) ^c	1.07 (0.05) ^a	1.71 (0.10) ^c
	<i>nqo1</i>	1.00 (0.09) ^{ab}	0.44 (0.06) ^a	1.69 (0.21) ^{bc}	0.61 (0.04) ^a	0.85 (0.22) ^a	1.85 (0.25) ^c
	<i>gsta2</i>	1.00 (0.18) ^{bc}	0.77 (0.16) ^{ab}	1.12 (0.07) ^{bc}	0.62 (0.02) ^a	1.23 (0.09) ^c	1.60 (0.16) ^d
	<i>tnfa</i>	1.00 (0.08) ^b	1.94 (0.17) ^d	1.01 (0.11) ^b	0.61 (0.05) ^a	0.86 (0.07) ^{ab}	1.46 (0.05) ^c
MÚSCULO	<i>cat</i>	1.00 (0.08) ^b	1.13 (0.08) ^b	0.54 (0.02) ^a	0.61 (0.04) ^a	1.48 (0.10) ^c	1.51 (0.08) ^c
	<i>gpx2</i>	1.00 (0.07) ^a	1.82 (0.18) ^b	4.04 (0.49) ^d	3.02 (0.21) ^c	1.41 (0.15) ^{ab}	1.03 (0.08) ^a
	<i>sod1</i>	1.00 (0.07) ^d	0.90 (0.07) ^{cd}	0.68 (0.03) ^{ab}	0.55 (0.04) ^a	0.80 (0.02) ^{bc}	1.22 (0.04) ^e
	<i>sod2</i>	1.00 (0.06) ^{bc}	0.92 (0.06) ^b	0.59 (0.03) ^a	0.85 (0.07) ^b	1.11 (0.04) ^c	1.50 (0.07) ^d

Los datos de expresión génica se expresan en términos relativos frente a la expresión de la β -actina para catalasa (*cat*); glutatión peroxidasa (*gpx1*); superóxido dismutasa citosólica (*sod1*); superóxido dismutasa mitocondrial (*sod2*); quinona reductasa (*nqo1*), glutatión s-transferasa (*gsta2*) y factor de necrosis tumoral alfa (*tnfa*). SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutracéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutracéutico combinada con ejercicio. Los resultados son medias más error estándar (entre paréntesis) de ocho animales. Las medias con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$).

Los resultados de la expresión génica de transcritos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico tanto en hígado como en el músculo *plantaris* se muestran en la **Tabla 28**. El desarrollo de la obesidad dio lugar a un aumento significativo de la expresión génica para el receptor tipo alfa activado por el proliferador de peroxisomas (*ppara*) y la glicoproteína plaquetaria translocasa de ácidos grasos (*cd36*), mientras que disminuyó significativamente los niveles de expresión de la sintasa de ácidos grasos (*fasn*). En el caso del *ppara* y la *fasn*, los niveles de expresión génica no consiguieron revertirse bajo ninguna de las intervenciones realizadas, alcanzando los valores significativamente mayores en los grupos que ingirieron el nutracéutico y lo combinaron con la realización de ejercicio físico. La expresión de la estearil-CoA desaturasa (*scd1*) y de la lipoproteína lipasa

(*lpl*) no se vio influenciada por el desarrollo de la obesidad, sin embargo, estas fueron sobreexpresadas en aquellos animales que realizaron el protocolo de ejercicio físico. En concreto, *scd1* incrementó su expresión génica en el hígado debido a la realización del programa de ejercicio físico combinado con el cambio de una dieta alta en grasa combinada con la ingesta de fructosa en el agua de bebida a una dieta estándar, mientras que *lpl* mostró una significativamente mayor expresión gracias a la combinación de la realización del programa de ejercicio físico y la ingesta del nutraceutico.

Tabla 28. Expresión génica de transcritos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico en el hígado y músculo *plantaris*, al final del período experimental.

	SD	HFHF	HF/SD	EX	NT	NT+Ex	
HÍGADO	<i>scd1</i>	1.00 (0.12) ^a	1.67 (0.26) ^a	2.01 (0.15) ^a	10.52 (1.10) ^c	1.62 (0.26) ^a	8.05 (0.65) ^b
	<i>pparα</i>	1.00 (0.09) ^a	2.49 (0.18) ^b	2.47 (0.13) ^b	2.71 (0.16) ^{bc}	2.92 (0.30) ^{bc}	3.07 (0.17) ^c
	<i>lpl</i>	1.00 (0.05) ^a	1.41 (0.12) ^{ab}	1.72 (0.15) ^{bc}	2.26 (0.26) ^c	1.93 (0.41) ^{bc}	3.59 (0.25) ^d
	<i>cd36</i>	1.00 (0.11) ^a	2.43 (0.23) ^{cd}	1.88 (0.09) ^{bc}	1.54 (0.18) ^{ab}	2.79 (0.31) ^{de}	3.36 (0.26) ^e
	<i>fasn</i>	1.00 (0.17) ^b	0.23 (0.01) ^a	0.25 (0.02) ^a	0.27 (0.02) ^a	0.18 (0.02) ^a	0.31 (0.03) ^a
	MÚSCULO	<i>glut4</i>	1.00 (0.04) ^a	0.89 (0.04) ^a	0.98 (0.04) ^a	0.92 (0.04) ^a	1.67 (0.14) ^b
<i>igf1</i>		1.00 (0.11) ^a	0.84 (0.10) ^a	1.13 (0.15) ^{ab}	1.20 (0.06) ^{ab}	1.43 (0.14) ^{bc}	1.66 (0.18) ^c
<i>lipin1</i>		1.00 (0.07) ^{ab}	0.83 (0.07) ^a	1.17 (0.07) ^{bc}	1.00 (0.04) ^{ab}	1.41 (0.09) ^c	2.12 (0.17) ^d
<i>pparα</i>		1.00 (0.07) ^a	1.19 (0.08) ^a	2.37 (0.10) ^b	2.21 (0.11) ^b	2.48 (0.21) ^b	2.24 (0.36) ^b
<i>cd36</i>		1.00 (0.09) ^a	1.63 (0.22) ^c	1.02 (0.04) ^a	1.18 (0.08) ^{ab}	1.38 (0.06) ^{bc}	1.65 (0.05) ^c
<i>pten</i>		1.00 (0.09) ^a	0.94 (0.05) ^a	1.07 (0.05) ^a	1.03 (0.07) ^a	1.47 (0.17) ^b	1.67 (0.17) ^b

Los datos de expresión génica se expresan en términos relativos frente a la expresión de la β-ACTINA. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los resultados son la media más el error estándar de la media (entre paréntesis) de ocho animales. Las medias con letras diferentes (a, b, c, d, e) son significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05).

En el músculo plantaris, el desarrollo de la obesidad solo afectó significativamente a la expresión de *cd36*, que se vio incrementada. Este efecto fue revertido en los animales que cambiaron a una dieta estándar y en los que además practicaron ejercicio físico. La expresión de la proteína transportadora de glucosa (*glut 4*), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*igf1*), la *lipina* y el *pten* aumentó significativamente

en los animales que consumieron el nutraceutico en la dieta, observándose una interacción con la práctica de ejercicio físico que hizo que estos valores incluso incrementaran más cuando se combinó la ingesta de nutraceutico con la práctica de ejercicio físico. En el caso del músculo, la expresión génica del factor de transcripción *ppara*, aunque no se vio afectado por el desarrollo de la obesidad si lo hizo por el cambio de dieta desde una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida a una dieta normocalórica, lo cual produjo un incremento significativo en su expresión; incremento que se mantuvo al incluir tanto la ingesta de nutraceutico como la práctica de ejercicio.

4.1.3.12 Microbioma intestinal

Diversidad alfa. Se llevó a cabo un análisis metagenómico en el contenido del ciego para evaluar el impacto del desarrollo de la obesidad mediante la administración de una dieta alta en grasa y fructosa, así como las diferentes intervenciones de ejercicio y la ingesta de compuestos bioactivos en la disbiosis intestinal. En la **Figura 32** se muestra la riqueza o el número de especies diferentes en cada grupo experimental. Para calcular la uniformidad de la muestra se utilizó el índice de equidad de *Pielou* (a), considerando el número de especies diferentes y su abundancia. Como se observa, la obesidad condujo un aumento del índice de diversidad alfa, que fue mayor en los grupos que realizaban el programa de ejercicio (Ex) y en los que además consumían la dieta que incluía el nutraceutico (NT+Ex). Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas entre NT+Ex y el grupo normocalórico (SD). La diversidad filogenética de *faith* (b) mostró un aumento en los animales con obesidad inducida por la dieta, aunque el índice más alto se encontró en los animales alimentados con la dieta que incluía el nutraceutico y que realizaron el programa de ejercicio (NT+Ex) en comparación con los grupos que consumieron la dieta control (SD) o que cambiaron la dieta alta en grasas por una dieta estándar (HF/SD).

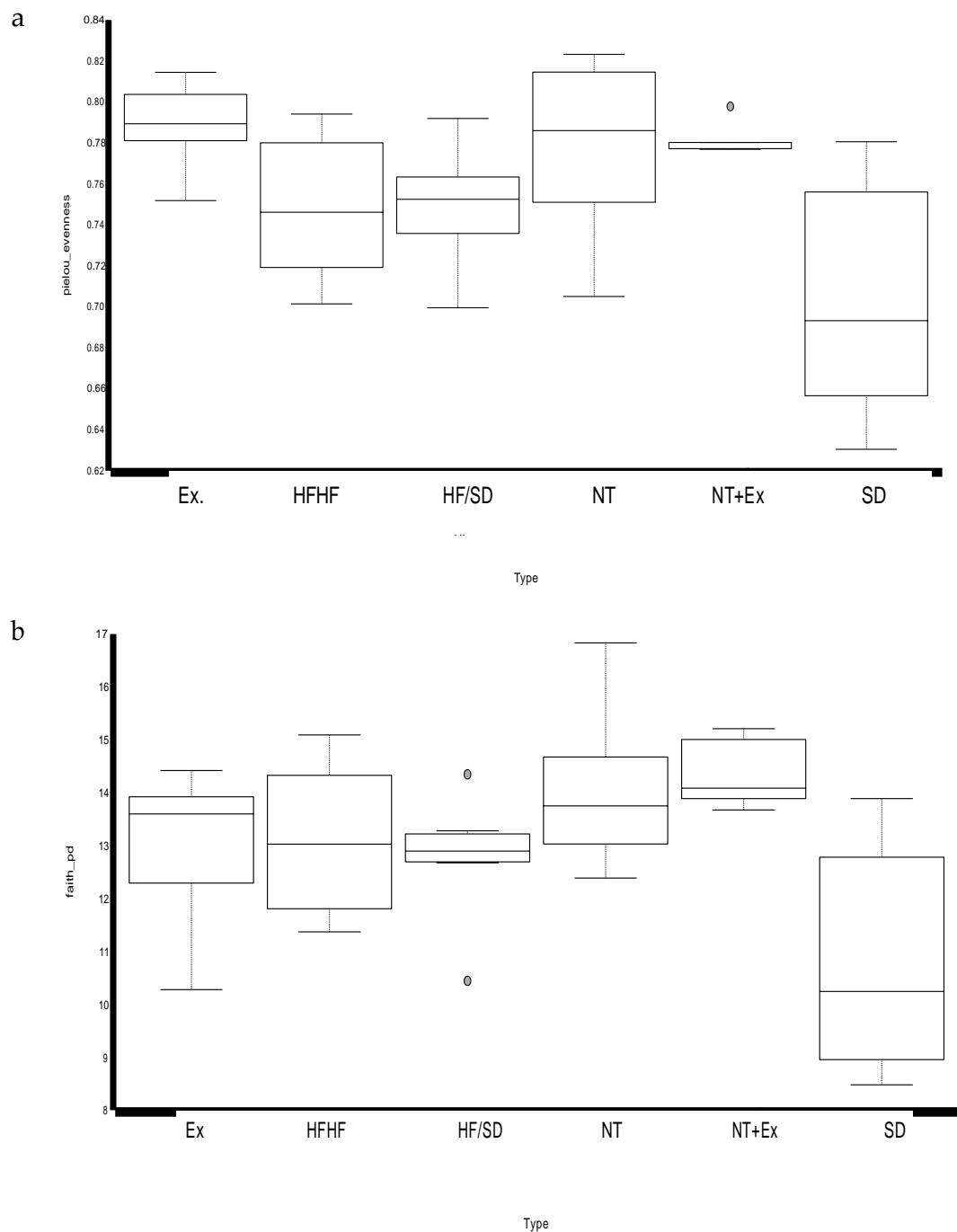


Figura 32. Riqueza o número de especies diferentes en cada grupo experimental. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutrácéutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutrácéutico combinada con ejercicio. Los valores representan medias grupales (n=8) más el error estándar de la media con barras verticales.

Diversidad beta. En la **Figura 33** se muestra la diversidad beta o diversidad de las comunidades microbianas entre los grupos. El índice de Jaccard (Figura 33a) mide el grado de similitud considerando únicamente la presencia o ausencia de los diferentes microorganismos entre los grupos. Pudimos observar que la distribución entre los individuos de cada grupo era bastante homogénea, mientras que la relación entre los individuos de los distintos grupos difería. La mayor diferencia se encontró entre el grupo SD y los grupos que realizaban ejercicio físico (más adelante en el Eje 1). No obstante, se utilizó el método de Bray-Curtis (Figura 33b) para determinar el grado de similitud teniendo en cuenta la abundancia de cada microorganismo en los diferentes grupos. Se pudo observar que la obesidad (HFHF) produjo disbiosis en la microbiota con respecto a un grupo normocalórico (SD). Las diferentes intervenciones presentaron una diversidad más desplazada en el eje1 a la derecha (donde aparece el grupo SD).

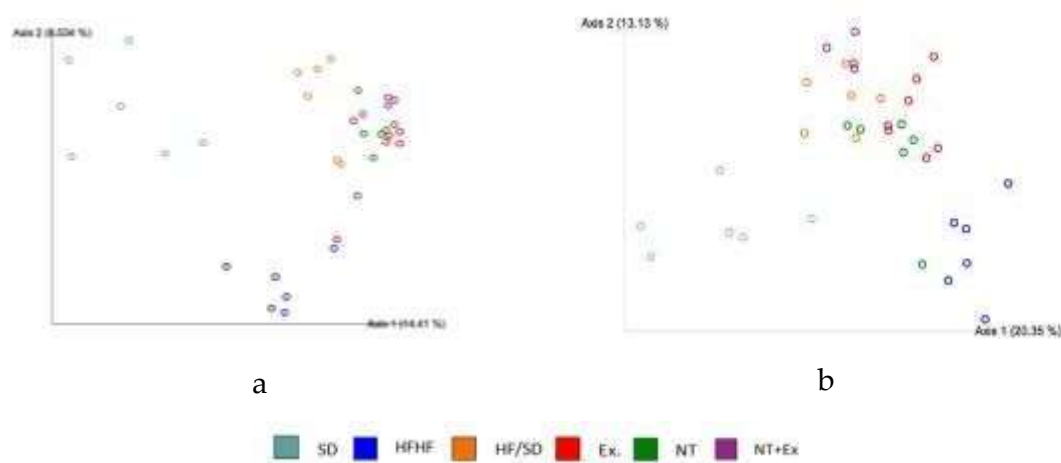


Figura 33. Diversidad beta o diversidad entre las comunidades microbianas entre los distintos grupos experimentales, calculado según el índice de Jaccard (a) o el método Bray-Curtis. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los valores representan medias grupales (n=8).

Abundancia relativa. En la **Figura 34** se muestra la abundancia relativa de los diferentes filos. Firmicutes y Bacteroidetes fueron los dos filos dominantes. El desarrollo de obesidad aumentó significativamente la presencia de bacterias pertenecientes al phylum Firmicutes, y las pertenecientes al phylum Desulfobacterota, Deferribacterota y Cianobacterias. Estas diferencias se invirtieron con las distintas intervenciones aplicadas a los animales. En concreto, el phylum Firmicutes y Deferribacterota mostraron valores similares al grupo control SD cuando se aplicó la intervención nutricional del nutraceutico (grupos NT y NT+Ex). Por otro lado, la obesidad desencadenó la disminución de filum como Verrucomicrobiota, Actinobacteriota, Bacteroidota y Proteobacteria. Las intervenciones aplicadas consiguieron revertir estas diferencias con respecto al grupo SD, excepto en el filo Actinobacteriota.

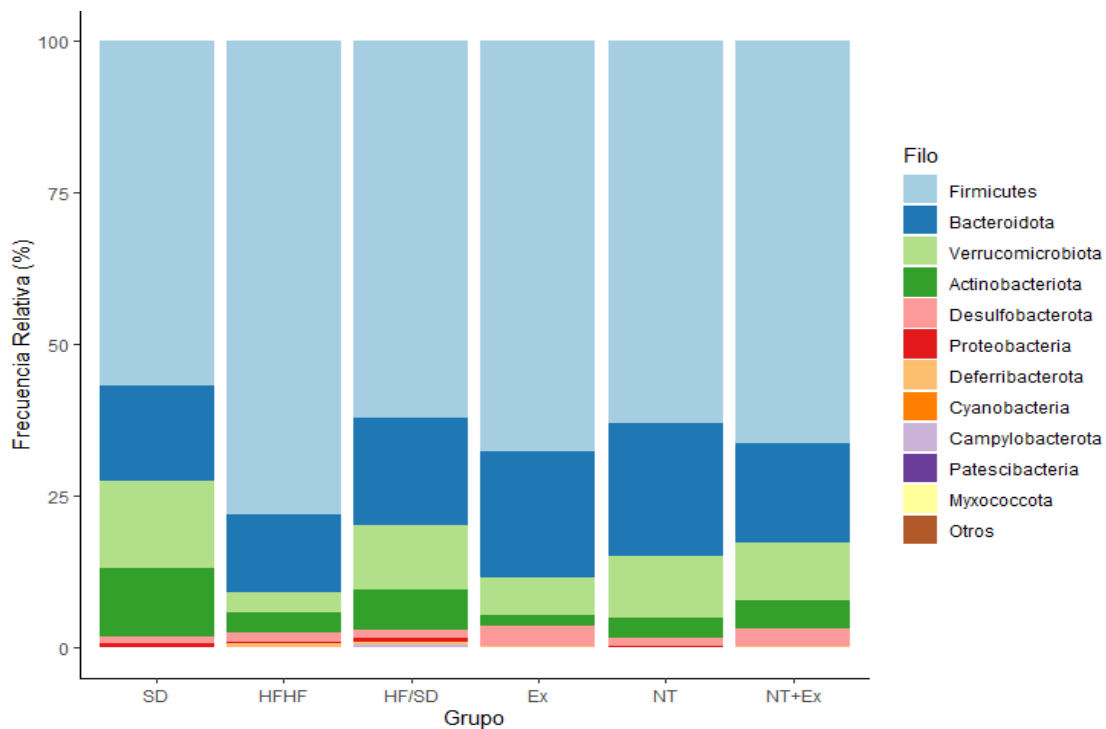


Figura 34. Efecto de la obesidad y las intervenciones nutricionales y de ejercicio físico sobre la abundancia relativa del microbioma cecal a nivel de Filo. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los valores representan medias grupales (n=8).

Además, la realización de ejercicio aumentó la abundancia del filo Bacteriodota incluso por encima del grupo de control. La relación Firmicutes/ Bacteroidetes (F/B) es un marcador importante de la homeostasis intestinal normal. La ingesta elevada de grasa y fructosa produjo un aumento significativo de esta relación. Todas las intervenciones aplicadas a los animales produjeron una disminución de esta relación, incluso por debajo de la encontrada en el grupo alimentado con la dieta de control estándar. La inclusión del nutraceutico en la dieta de los animales produjo la mayor disminución de este ratio (**Figura 35**).

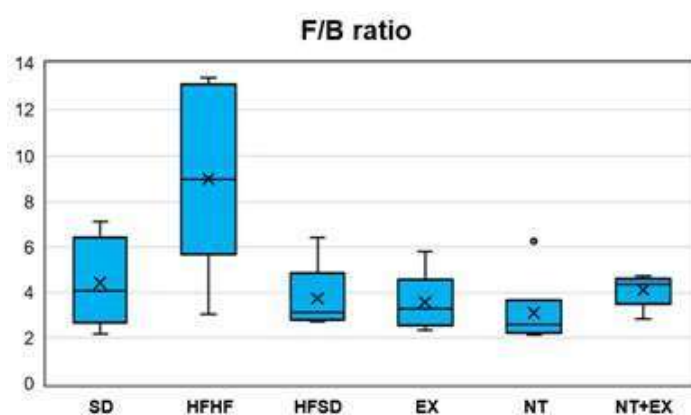


Figura 35. Relación Firmicutes/ Bacteroidetes (F/B) en el microbioma de los distintos grupos experimentales. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los valores representan medias grupales (n=8) más el error estándar de la media con barras verticales.

En la **Figura 36** se muestran los cambios encontrados en el microbioma fecal entre los ratones alimentados con dieta hipercalórica (HFHF) y los alimentados con dieta normocalórica (SD), es decir, el efecto del desarrollo de la obesidad sobre el microbioma. El desarrollo de la obesidad desencadenó un aumento significativo de las familias Prevotellaceae, Degerribacteraceae, Oscillospiraceae, Lachnospiraceae, Butyricicoccaceae y Ruminococcaceae, mientras que disminuyeron las familias Akkermansiaceae, Bifidobacteriaceae, Enterococcaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae y Staphylococcaceae. A nivel de género, todas las familias, excepto

Butrycoccaceae, están representadas con al menos un género y muestran la misma tendencia. La familia más representada es Lachnospiraceae con 9 géneros sobre expresados. Los géneros más inhibidos fueron Akkermansia, Ligilactobacillus y Bifidobacterium con 5.38, 3.91 y 3.42 logFC respectivamente, mientras que los más abundantes son Alloprevotella, Lachnospiraceae_NK4A136_group y Lachnospiraceae_A2_group con 5.19, 4.18 y 3.83 logFC (**Tabla 29**).

La diferencia encontrada entre el microbioma de los grupos experimentales comparado con el grupo normocalórico (SD), a nivel de familia, se muestra en un heatmap en la **Figura 37**. El desarrollo de la obesidad aumenta la concentración de las familias Prevotelleaceae, y Deferibacteriaceae, mientras que se inhibió la concentración de Lactobacillaceae, Akkermansiaceae, Bifidobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae y Enterococcaceae. Las intervenciones realizadas a diferencia del grupo obeso presentaron una mayor concentración de la familia Prevotellaceae, pero la presencia de Deferibacteriaceae disminuyó en el grupo alimentado con nutracéuticos, mostrando valores similares a los del grupo normocalórico. La familia Lactobacillaceae se invirtió a valores normales con todas las intervenciones, pero especialmente con nutracéuticos combinados con un programa de ejercicio (NT+Ex). Se encontraron resultados similares para Akkermansia, cuya concentración se incrementó en todos los grupos de intervención, específicamente en aquellos que habían sido alimentados con una formulación nutracéutica (NT y NT+Ex) y en el grupo que cambió a una dieta estándar. Bifidobacteriaceae sólo se invirtió a valores normales en el grupo HD/SD.

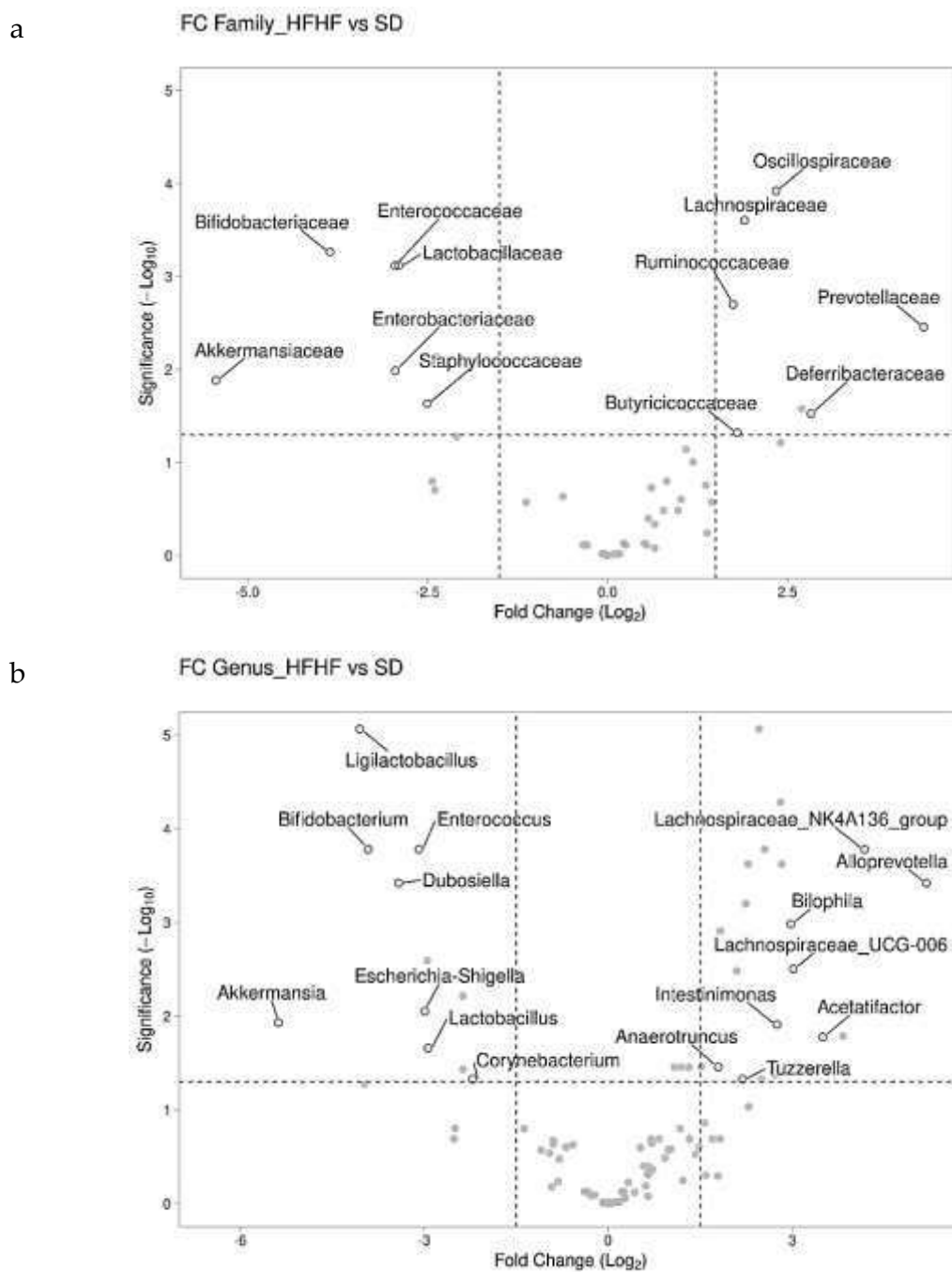


Figura 36. Efecto del desarrollo de la obesidad sobre el microbioma, a nivel de familia (a) y género (b). SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa. Los valores representan medias grupales (n=8).

Tabla 29. Efecto del desarrollo de la obesidad sobre el microbioma, a nivel de familia y género.

Familia	log FC	Género	log FC
Akkermansiaceae	-5.4374	<i>Akkermansia</i>	-5.3770
Anaerovoracaceae		<i>Anaerovorax</i>	2.2797
Bifidobacteriaceae	-3.8533	<i>Bifidobacterium</i>	-3.9143
Corynebacteriaceae	-2.0900	<i>Corynebacterium</i>	-2.2092
Deferribacteraceae	2.8256	<i>Mucispirillum</i>	2.7186
Desulfovibrionaceae	1.1800	<i>Bilophila</i>	2.9798
		-	-6.4180
Enterobacteriaceae	-2.9472	<i>Escherichia-Shigella</i>	-2.9896
Enterococcaceae	-2.9518	<i>Enterococcus</i>	-3.0870
		<i>Ileibacterium</i>	1.3135
Erysipelotrichaceae	0.2000	<i>Dubosiella</i>	-3.4168
		<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	4.1839
Lachnospiraceae	1.9003	A2	3.8271
		<i>Acetatifactor</i>	3.4969
		<i>Lachnospiraceae_UCG-006</i>	3.0201
		<i>Lachnospiraceae_FCS020_group</i>	2.5514
		-	2.4596
		<i>Tuzzerella</i>	2.1892
		-	1.8260
Lactobacillaceae	-2.8965	-	1.5148
		HT002	-2.3692
		<i>Lactobacillus</i>	-2.9381
		<i>Ligilactobacillus</i>	-4.0514
		-	2.8119
Oscillospiraceae	2.3398	<i>Colidextribacter</i>	2.8289
		<i>Intestinimonas</i>	2.7527
		-	1.1911
Peptococcaceae	0.6000	<i>Peptococcus</i>	1.5120
Prevotellaceae	4.3921	<i>Alloprevotella</i>	5.1883
		<i>Incertae_Sedis</i>	2.2423
Ruminococcaceae	1.7438	-	2.0942
		<i>Anaerotruncus</i>	1.7949
Staphylococcaceae	-2.5041	-	-2.9505

Fold Change (FC). Los valores representan medias grupales (n=8).

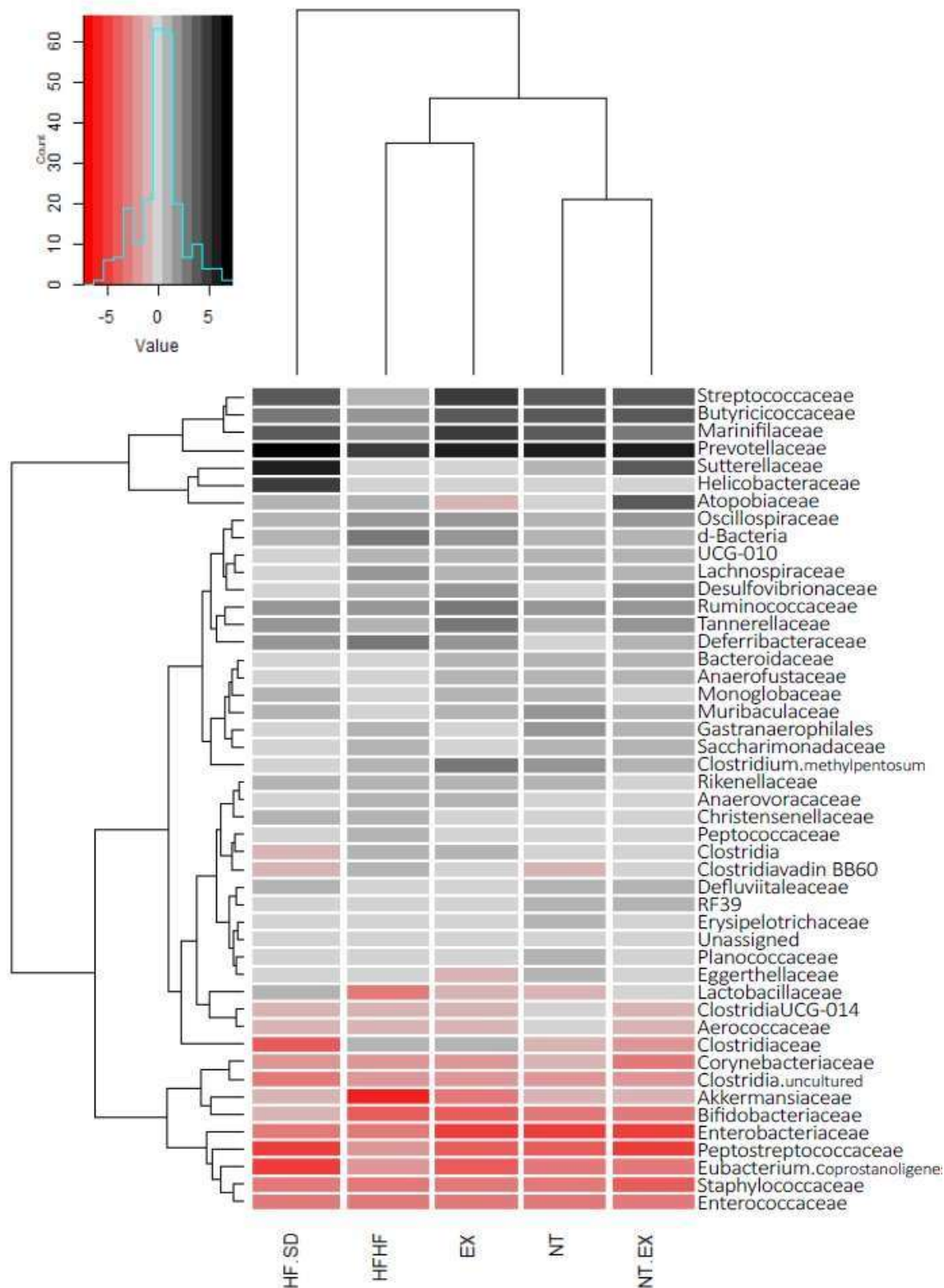


Figura 37. Heatmap representando la abundancia relativa de las familias más representativas. SD-grupo de dieta estándar; HFHF-grupo de dieta rica en grasas y fructosa; HF/SD-grupo de intervención nutricional de dieta estándar; Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar combinada con ejercicio; NT-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con el nutraceutico; y NT+Ex-grupo de intervención nutricional de dieta estándar suplementada con nutraceutico combinada con ejercicio. Los valores representan medias grupales (n=8).

4.2 ENSAYOS EN MODELOS DE CANCER COLORECTAL

Se han analizado 5 semillas de la familia de las Brassicáceas, crudas o germinadas, con el objetivo de extraer y concentrar los compuestos bioactivos mediante distintos sistemas de extracción. Además, se ha determinado su capacidad antioxidante, antiproliferativa y de inducción de enzimas detoxificantes para poder optimizar un nutracéutico que presente la mayor actividad preventiva en un modelo animal de cáncer colorrectal.

4.2.1 Caracterización extractos vegetales

4.2.1.1 Capacidad antioxidante mediante pruebas químicas

4.2.1.1.1 Extractos etanólicos

En la **Tabla 30** se muestra el rendimiento y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de las semillas de Brassicáceas seleccionadas. La semilla de *Eruca sativa* presentó un rendimiento de extracción significativamente inferior al resto de especies, sin embargo, es la que mayor capacidad presentó para inhibir la formación de radicales libres ABTS, para quelar y reducir el hierro libre y para inhibir la peroxidación lipídica. La mayor concentración de polifenoles se encontró en el extracto etanólico de semillas de *Sinapis alba* con 60.5 ± 1.0 µg equivalente de ácido gálico por mg de extracto.

Tabla 30. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos etanólicos realizados a partir de semillas de Brásicas.

	<i>Brassica oleracea</i>			<i>Eruca sativa</i>	<i>Sinapis alba</i>
	<i>var.sabellica</i>	<i>var.italica</i>	<i>var.botrytis</i>		
RTO (mg/g harina)	115.4 (2.9) ^b	115.2 (9.7) ^b	132.1 (4.6) ^b	86.9 (1.9) ^a	120.8 (1.3) ^b
CTP (µg AG/mg)	30.9 (0.5) ^b	31.4 (0.9) ^b	27.9 (0.4) ^a	43.5 (0.4) ^c	60.5 (1.0) ^d
ABTS (µg AG/mg)	11.6 (0.4) ^{bc}	12.8 (0.1) ^c	10.2 (0.7) ^b	15.0 (0.04) ^d	7.40 (0.12) ^a
CQFe (UAQ/mg)	1.56 (0.11) ^b	1.29 (0.09) ^b	0.87 (0.01) ^a	3.99 (0.06) ^c	0.98 (0.05) ^a
CRFe (µg AG/mg)	25.9 (1.4) ^b	27.7 (0.3) ^b	20.4 (0.6) ^a	43.5 (1.4) ^c	18.8 (1.2) ^a
TBARs (UAQ/mg)	0.54 (0.02) ^b	0.73 (0.07) ^c	0.29 (0.01) ^a	1.31 (0.04) ^d	0.50 (0.02) ^b

Rendimiento (RTO), Contenido total polifenoles (CTP), Capacidad quelante del hierro (CQF); Capacidad reductora del hierro (CRF); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs). Las medias con letras diferentes (a, b, c, d) son significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05).

El rendimiento y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos realizados a partir de harina de semilla germinada se muestran en la **Tabla 31**. A diferencia de la semilla cruda, en este caso el mayor rendimiento de extracción se encontró en el extracto de la semilla de *Eruca sativa* y mantuvo la mayor capacidad para quelar el hierro de entre todas las especies estudiadas y la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica junto con el extracto etanólico de semilla de *Sinapis alba*. Sin embargo, la mayor capacidad para captar radicales libres de ABTS y de reducir el hierro en este caso fue para el extracto procedente de semillas de *B.oleracea var. italica* germinadas. La mayor concentración de polifenoles se encontró en el extracto de semilla de *Sinapis alba*.

Tabla 31. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos etanólicos realizados a partir de semillas de Brásicas germinadas.

	<i>Brassica oleracea germinada</i>			<i>Eruca sativa germinada</i>	<i>Sinapis alba germinada</i>
	<i>var.sabellica</i>	<i>var.italica</i>	<i>var.botrytis</i>		
RTO (mg/g harina)	141.1 (7.6) ^{ab}	115.3 (9.7) ^a	157.8 (2.0) ^b	194.9 (3.2) ^c	234.8 (5.4) ^d
CTP (µg AG/mg)	31.0 (0.6) ^{ab}	31.4 (0.9) ^b	27.0 (0.9) ^a	43.2 (0.9) ^c	48.9 (1.8) ^d
ABTS (µg AG/mg)	10.2 (0.3) ^c	12.8 (0.1) ^d	7.96 (0.37) ^b	8.57 (0.23) ^b	5.55 (0.07) ^a
CQFe (UAQ/mg)	1.57 (0.13) ^b	1.29 (0.09) ^{ab}	1.51 (0.10) ^b	2.18 (0.10) ^c	1.10 (0.03) ^a
CRFe (µg AG/mg)	25.4 (0.2) ^c	27.7 (0.3) ^d	18.9 (0.8) ^{ab}	22.1 (1.7) ^{bc}	15.5 (0.5) ^a
TBARs (UAQ/mg)	0.48 (0.03) ^a	0.73 (0.07) ^a	0.32 (0.01) ^a	1.19 (0.05) ^b	1.13 (0.06) ^b

Rendimiento (RTO), Contenido total polifenoles (CTP), Capacidad quelante del hierro (CQF); Capacidad reductora del hierro (CRF); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs). Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media de tres réplicas en microgramos equivalente de ácido gálico (µg AG), unidad de actividad quelante (UCQ) o unidad de actividad antioxidante (UAA) por miligramo de extracto. Las medias con letras diferentes (a, b, c, d) son significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05).

El efecto de la germinación sobre el rendimiento y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos analizados se recoge en la **Figura 38**. En general, el rendimiento de extracción fue significativamente superior a partir de la semilla germinada, a excepción de la semilla de *B. oleracea var. italica* para la que no se encuentran diferencias. El efecto de la germinación sobre el contenido en polifenoles totales solo influyó en el caso de la *Sinapis alba*, dónde la semilla cruda mostró mayor concentración de polifenoles totales que la germinada (60.5 ± 1.0 frente a 48.9 ± 1.8

$\mu\text{g AG/mg EtOH}$), sin embargo, la prueba del ABTS se vio afectada negativamente por la germinación, a excepción de la semilla de *B. oleracea var. italica* dónde no se encontraron diferencias significativas y las semillas que de *B. oleracea var. sabellica* que incrementó su actividad.

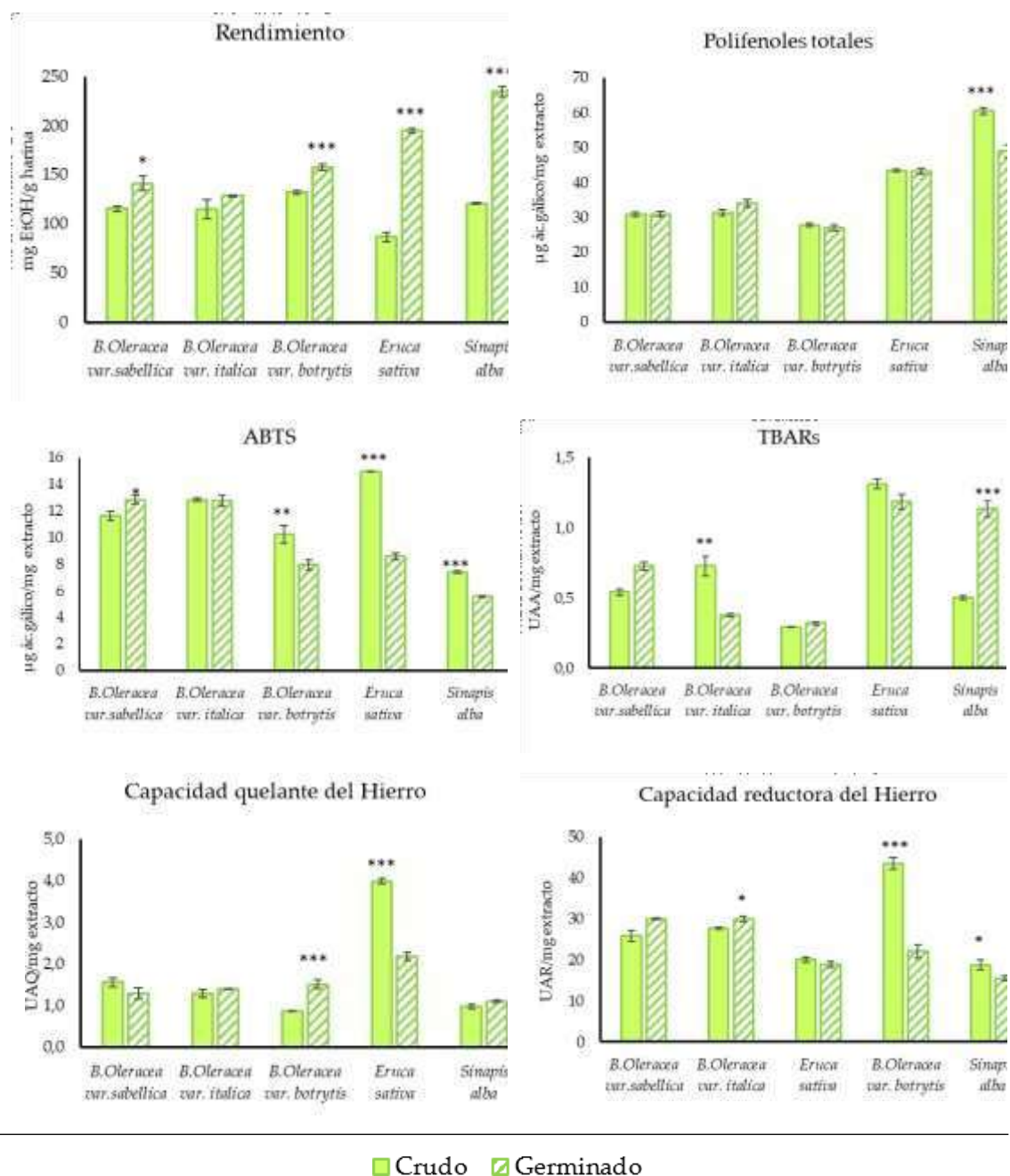


Figura 38. Efecto de la germinación sobre el rendimiento y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de Brásicas.

El efecto de la germinación sobre el resto de pruebas se manifestó de distinta forma según la semilla en cuestión: la capacidad quelante del hierro fue mayor en semillas

de *Eruca sativa* sin germinar, mientras que se incrementó para el extracto de coliflor germinada, sin afectar al resto. En el caso de la capacidad reductora ocurrió algo similar ya que la germinación afectó negativamente la capacidad de reducir el hierro en el extracto de la semilla de *Eruca sativa* o *Sinapis alba*, sin embargo, se incrementó en el caso del de *B. oleracea var. italica*. Todo lo contrario, ocurrió en la capacidad para inhibir la peroxidación lipídica dónde la germinación afectó de forma positiva al extracto de semilla de *Sinapis alba* y de forma negativa a *B. oleracea var. italica*.

Con el objetivo de seleccionar aquellos materiales, crudos o germinados, que mayor capacidad antioxidante presentaron se hizo una recopilación de los resultados en la **Tabla 32**. De todos los extractos estudiados se obtuvo un mayor rendimiento de extracción, así como una mayor concentración de polifenoles totales en el extracto etanólico de las semillas de *Sinapis alba* sin germinar (cruda). En el resto de pruebas de capacidad antioxidante analizadas los mejores resultados se obtuvieron con el extracto de semillas de *Eruca sativa* sin germinar.

Tabla 32. Rendimiento y capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de semillas crudas y semillas germinadas.

		Rendimiento (mg/g harina)	Polifenoles ($\mu\text{g AG/mg}$)	ABTS ($\mu\text{g AG/mg}$)	CQF (UCQ/mg)	CRF ($\mu\text{g AG/mg}$)	TBARs (UAA/mg)
<i>BO.var</i>	C	115.4 (2.9) ^b	30.9 (0.5) ^{abc}	11.6 (0.4) ^{cd}	1.56 (0.11) ^d	25.9 (1.4) ^{cd}	0.54 (0.02) ^{cd}
<i>sabellica</i>	G	141.1 (7.6) ^{cd}	31.0 (0.6) ^{abc}	10.2 (0.3) ^c	1.57 (0.13) ^d	25.4 (0.2) ^{cd}	0.48 (0.03) ^{abc}
<i>BO.var</i>	C	115.3 (9.7) ^b	31.4 (0.9) ^{bc}	12.8 (0.1) ^d	1.29 (0.09) ^{bcd}	27.7 (0.3) ^d	0.73 (0.07) ^d
<i>italica</i>	G	128.5 (1.2) ^{bc}	34.0 (1.1) ^c	12.7 (0.4) ^d	1.40 (0.02) ^{cd}	30.0 (0.7) ^d	0.38 (0.01) ^{abc}
<i>BO.var</i>	C	132.1 (4.6) ^{bc}	27.9 (0.4) ^{ab}	10.2 (0.7) ^c	0.87 (0.01) ^a	20.1 (0.6) ^{ab}	0.29 (0.01) ^a
<i>botrytis</i>	G	157.8 (2.0) ^d	27.0 (0.9) ^a	7.9 (0.4) ^b	1.51 (0.10) ^d	18.9 (0.8) ^{ab}	0.32 (0.01) ^{ab}
<i>Eruca</i>	C	86.9 (1.9) ^a	43.5 (0.4) ^d	15.0 (0.0) ^e	3.99 (0.06) ^f	43.5 (1.4) ^e	1.31 (0.04) ^e
<i>sativa</i>	G	194.9 (3.2) ^e	43.2 (0.9) ^d	8.6 (0.2) ^b	2.18 (0.10) ^e	22.1 (1.7) ^{bc}	1.19 (0.05) ^e
<i>Sinapis</i>	C	120.8 (1.3) ^{bc}	60.5 (1.0) ^f	7.40 (0.12) ^b	0.98 (0.05) ^{ab}	18.8 (1.2) ^{ab}	0.50 (0.02) ^{bc}
<i>alba</i>	G	234.8 (5.4) ^f	48.9 (1.8) ^e	5.55 (0.07) ^a	1.10 (0.03) ^{abc}	15.5 (0.5) ^a	1.13 (0.06) ^e

Brassica oleracea (BO). Semilla sin germinar (C); semilla germinada (G). Capacidad quelante del hierro (CQF); Capacidad reductora del hierro (CRF); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Las medias con distinta letra (a, b, c, d, e, f) son significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2.1.1.2 Hidrolizados proteicos

La siguiente tabla muestra el rendimiento y la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de la harina de semillas de Brásicas sin germinar (**Tabla 33**). Se comportaron de forma similar a los extractos etanólicos procedentes de dichas semillas. La semilla de *Eruca sativa* mostró un rendimiento significativamente inferior al resto de las semillas estudiadas, sin embargo, es la que mayor capacidad antioxidante obtuvo en todas las pruebas estudiadas. El hidrolizado de la semilla de *Sinapis alba* es la que mayor concentración de polifenoles y rendimiento de extracción presentó.

Tabla 33. Rendimiento y capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de semillas de Brásicas crudas.

	<i>Brassica oleracea</i>			<i>Eruca sativa</i>	<i>Sinapis alba</i>
	<i>var.sabellica</i>	<i>var.italica</i>	<i>var.botrytis</i>		
RTO (mg/g harina)	24.4 (0.2) ^b	27.3 (0.3) ^c	29.3 (0.6) ^{cd}	20.3 (0.4) ^a	31.9 (1.1) ^d
CTP (µg AG/mg)	28.5 (0.3) ^b	26.2 (0.3) ^{ab}	25.1 (1.1) ^a	33.6 (0.4) ^c	31.7 (0.4) ^c
ABTS (µg AG/mg)	12.2 (0.7) ^a	10.2 (0.3) ^a	11.5 (0.7) ^a	17.0 (0.4) ^b	11.1 (0.4) ^a
CQFe (UAQ/mg)	1.00 (0.03) ^a	1.10 (0.02) ^{ab}	1.19 (0.07) ^b	1.34 (0.02) ^c	0.98 (0.02) ^a
CRFe (µg AG/mg)	13.1 (0.3) ^b	12.9 (0.2) ^b	13.0 (0.2) ^b	12.8 (0.1) ^b	8.0 (0.1) ^a

Rendimiento (RTO), Contenido total polifenoles (CTP), Capacidad quelante del hierro (CQF); Capacidad reductora del hierro (CRF); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs). Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media de tres réplicas en microgramos equivalente de ácido gálico (µg AG), unidad de actividad quelante (UCQ) o unidad de actividad antioxidante (UAA) por miligramo de extracto. Las medias con letras diferentes (a, b, c, d) son significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05).

En la **Tabla 34** se muestra el rendimiento y las pruebas químicas de capacidad antioxidante analizada en los hidrolizados proteicos procedentes de semillas germinadas de Brásicas. La semilla germinada de *Sinapis alba* presentó valores significativamente superiores en el rendimiento de extracción, contenido en polifenoles y capacidad para quelar el hierro, sin embargo, su capacidad para reducir el hierro fue significativamente inferior al resto de semillas. El hidrolizado proteico de semillas germinadas de *Eruca sativa* y de *B. oleracea var. italica* mostraron la mayor capacidad para captar radicales libres de ABTS.

Tabla 34. Rendimiento y capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de semillas de Brásicas germinadas

	<i>Brassica oleracea germinada</i>			<i>Eruca sativa</i>	<i>Sinapis alba</i>
	<i>var.sabellica</i>	<i>var.italica</i>	<i>var.botrytis</i>	<i>germinada</i>	<i>germinada</i>
RTO (mg/g harina)	24.4 (0.1) ^{ab}	25.3 (0.8) ^b	33.8 (0.1) ^c	22.7 (0.0) ^a	37.9 (0.3) ^d
CTP (µg AG/mg)	32.6 (0.4) ^b	37.9 (0.4) ^c	26.3 (0.3) ^a	38.4 (0.6) ^c	47.1 (0.6) ^d
ABTS (µg AG/mg)	16.7 (0.6) ^b	22.3 (0.7) ^c	16.4 (0.2) ^b	22.2 (0.9) ^c	9.7 (0.2) ^a
CQFe (UAQ/mg)	1.38 (0.03) ^b	1.20 (0.05) ^{ab}	1.16 (0.01) ^a	1.35 (0.02) ^b	2.44 (0.08) ^c
CRFe (µg AG/mg)	13.5 (0.5) ^b	18.4 (0.9) ^c	11.8 (0.2) ^{ab}	13.2 (0.4) ^b	10.1 (0.4) ^a

Rendimiento (RTO), Contenido total polifenoles (CTP), Capacidad quelante del hierro (CQF); Capacidad reductora del hierro (CRF); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs). Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media de tres réplicas en microgramos equivalente de ácido gálico (µg AG), unidad de actividad quelante (UCQ) o unidad de actividad antioxidante (UAA) por miligramo de extracto. Las medias con letras diferentes (a, b, c, d) son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$).

El efecto de la germinación sobre el rendimiento de extracción se muestra en la **Figura 39**. La germinación incrementó significativamente el rendimiento de extracción de las semillas germinadas de *Eruca sativa*, de *B. oleracea var. botrytis* y *Sinapis alba*, mientras que no influyó en las semillas de *B. oleracea var. sabellica* o de *B. oleracea var. italica*.

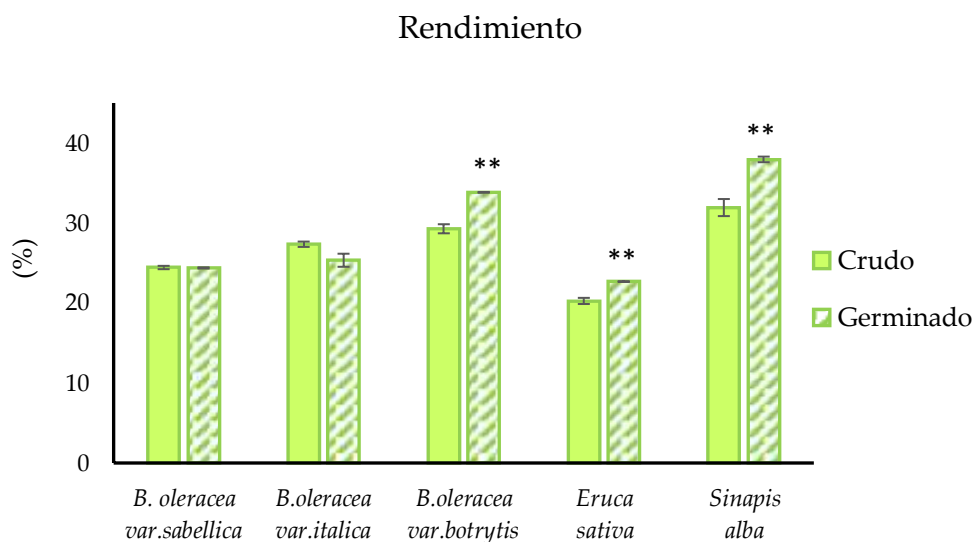


Figura 39. Influencia de la germinación sobre el rendimiento de extracción de los hidrolizados proteicos de semillas de Brásicas. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de tres réplicas. Las medias con (**) son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,01$).

La influencia de la germinación sobre la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos de las distintas semillas de Brásicas se muestra en la **Figura 40**. La germinación incrementó significativamente la capacidad para captar radicales libres de ABTS de todas las semillas estudiadas menos la *Sinapis alba*, así como la concentración total de polifenoles, a excepción de las semillas de coliflor. La germinación incrementó la capacidad para quelar el hierro libre en la semilla de *Sinapis alba* y de *B. oleracea var. sabellica*, mientras que no afectó de forma significativa en el resto. La capacidad para reducir el hierro se vio afectada positivamente por la germinación en el caso de la semilla de *Sinapis alba* y de *B. oleracea var. italica*, mientras que disminuyó esta capacidad en la semilla de de *B. oleracea var. botrytis*.

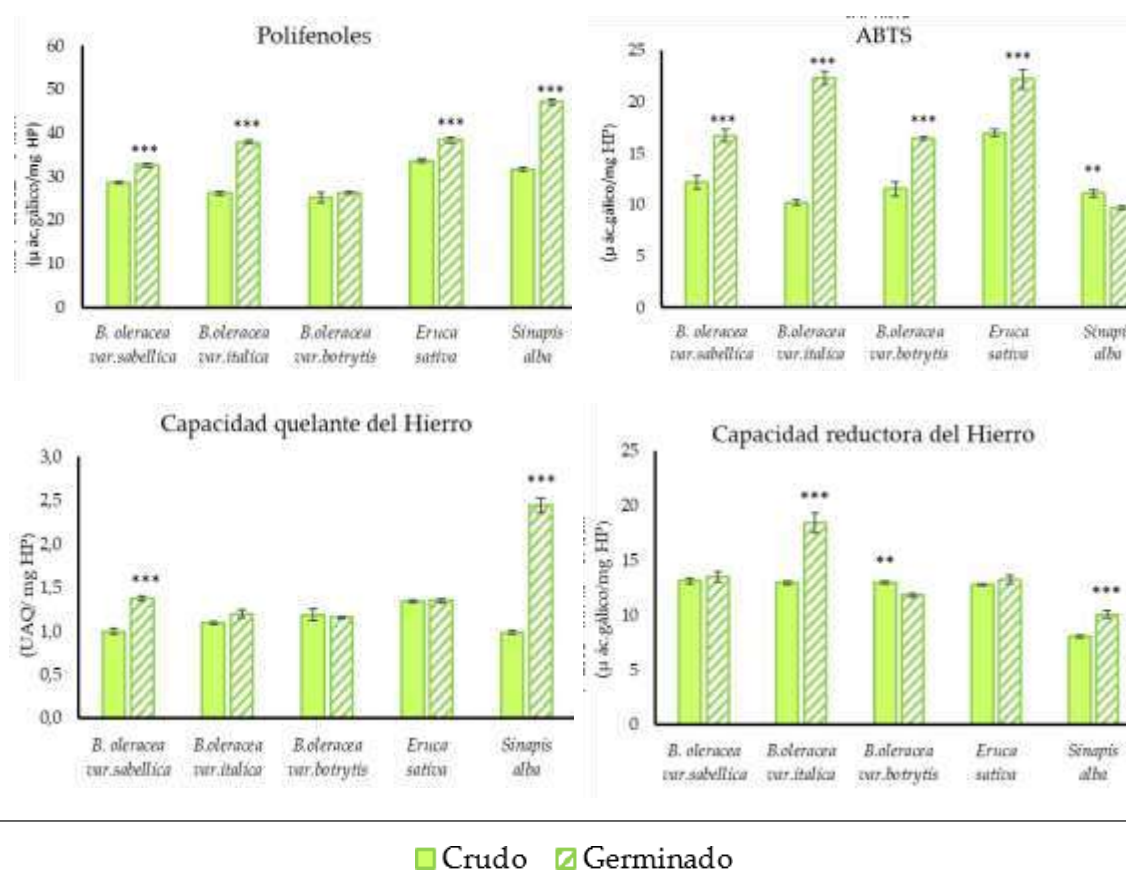


Figura 40. Influencia de la germinación sobre la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de semillas de Brásicas. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de tres réplicas. Medias con (*) son significativamente diferentes, ANOVA $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

En resumen, la germinación no afectó el rendimiento para los hidrolizados proteicos de las semillas de kale (*B. oleracea var. sabellica*) y brócoli (*B. oleracea var. itálica*), pero sí incrementó la concentración de polifenoles y ABTS, además de la capacidad quelante en el caso del kale y la capacidad reductora en el caso de la semilla de brócoli. El hidrolizado proteico procedente de semillas de *Eruca sativa* o *B. oleracea var. botrytis*, germinada incrementó su rendimiento, el contenido en polifenoles y la capacidad para captar radicales libres de ABTS. No afectó en la capacidad para quelar o reducir el hierro en el caso de la *Eruca sativa*, mientras redujo significativamente la capacidad para reducir el hierro en el caso de las semillas de *B. oleracea var. botrytis*. El hidrolizado proteico procedente de la semilla de *Sinapis alba* incrementa tanto el rendimiento como todas las pruebas químicas de capacidad antioxidante (a excepción del ABTS) en comparación con la semilla sin germinar.

4.2.1.1.3 Capacidad antiproliferativa

Ninguna de las especies y variedades estudiadas, así como ninguno de los métodos de extracción utilizados mostró signos de toxicidad frente a las líneas celulares estudiadas de cáncer de colon (**Tabla 35**).

Tabla 35. Efecto sobre el crecimiento celular de la línea T84 de los distintos extractos de semillas de Brásicas.

	Ic50 EtOH (µg/mL)		Ic50 HP (µg/mL)	
	Crudo	Germinado	Crudo	Germinado
<i>B.oleracea var sabellica</i>	>1000	404.2 (45.0) ^{ab}	>1000	>1000 ^b
<i>B.oleracea var italica</i>	>1000	492.6 (14.8) ^{bc}	>1000	539.6 (15.7) ^a
<i>B.oleracea var botrytis</i>	>1000	871.6 (37.2) ^d	>1000	>1000 ^b
<i>Eruca sativa</i>	>1000	613.5 (17.2) ^c	>1000	>1000 ^b
<i>Sinapis alba</i>	807.6 (21.3)	328.7 (9.3) ^a	>1000	>1000 ^b

Dosis necesaria en µg/mL para la inhibición del crecimiento celular (Ic50); Extractos etanólicos (EtOH); Hidrolizados proteicos (HP); Semilla germinada (germinado); semilla sin germinar (crudo). Resultados expresados como la media más error estándar de la media de ocho réplicas. Medias con diferentes letras (a,b,c,f) significan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA p<0.05)

La capacidad antiproliferativa de los extractos etanólicos estuvo afectada por la germinación, ya que los que provienen de semillas sin germinar (cruda) tuvieron una

actividad antiproliferativa mayor a 1 mg/mL, a excepción de la *Sinapis alba* que fue de 807.6 ± 21.3 , mientras que los que provienen de semillas germinadas incrementaron casi el doble esta actividad. En el caso de los hidrolizados solo ocurre esta diferencia en la semilla de *B. oleracea var. italica*.

4.2.1.1.4 Capacidad antioxidante en células

Se analizó el grado de protección de cada extracto frente al agente oxidante PARAQUAT en la línea celular HT-29. La línea celular fue incubada con la concentración de cada extracto que no causaba muerte celular (concentración no citotóxica) durante 24h, previas a la incubación con el agente oxidante Paraquat. Tras ellos se analizó el grado de supervivencia frente al paraquat de la línea celular por si sola, y el grado de supervivencia cuando la línea se había preincubado con el extracto. Por tanto, podemos calcular el grado de protección que el extracto confiere frente a este agente oxidante, tal y como se muestra en la **Tabla 36**.

Tabla 36. Supervivencia frente al agente oxidante paraquat de la línea celular HT-29, sola o preincubada con los extractos etanólicos.

		Supervivencia HT-29	Supervivencia HT-29 + EtOH	Protección (%)
Cruda	<i>B.oleracea var sabellica</i>	54.6 (1.04)	72.7 (1.33)	18.07 ^{cd}
	<i>B.oleracea var italica</i>	54.6 (1.04)	66.0 (2.50)	11.42 ^b
	<i>B.oleracea var botrytis</i>	55.4 (0.75)	79.0 (0.75)	23.56 ^{de}
	<i>Eruca sativa</i>	55.4 (0.75)	84.7 (0.83)	29.30 ^e
	<i>Sinapis alba</i>	55.4 (0.75)	79.6 (1.50)	24.17 ^e
Germinada	<i>B.oleracea var sabellica</i>	54.3 (1.14)	68.5 (1.69)	14.25 ^{bc}
	<i>B.oleracea var italica</i>	54.3 (1.14)	65.7 (1.06)	11.39 ^b
	<i>B.oleracea var botrytis</i>	54.1 (2.30)	62.6 (0.68)	8.48 ^b
	<i>Eruca sativa</i>	55.5 (1.03)	66.9 (0.97)	11.37 ^b
	<i>Sinapis alba</i>	55.5 (1.03)	58.9 (0.82)	3.33 ^a

Resultados expresados como la media más error estándar de la media de ocho réplicas. Las medias con distinta letra (a, b, c, d, e) son significativamente diferentes, (ANOVA $P < 0,05$).

Se obtuvo un mayor grado de protección con los extractos etanólicos de semillas sin germinar (crudas), concretamente fue significativamente mayor cuando la línea celular HT-29 se incubó con el extracto etanólico de *Eruca sativa* o *Sinapis alba*.

En base a los resultados de capacidad antioxidante *in vitro* obtenidos seleccionamos los extractos procedentes de semillas crudas para realizar los siguientes estudios, así como los extractos de semillas germinadas procedentes de *E. sativa* y *S.alba* ya que fueron las que mejores resultados mostraban.

4.2.1.1.5 Capacidad para inducir enzimas detoxificantes

La capacidad de los extractos etanólicos para inducir la actividad de enzimas implicadas en la detoxificación celular como la glutatión s-transferasa (GST) y la quinona reductasa (QR) se muestra en la **Figura 41**. Ambas enzimas se ven incrementadas significativamente cuando la línea celular se incubaba durante 48h con extractos etanólicos de *Eruca sativa* y *Sinapis alba*. En el caso de la GST también el extracto etanólico de la semilla de coliflor mostró un incremento significativo de la actividad basal de 1.60. La actividad basal de la enzima GST en la línea HT-29 es de 86.4 ± 1.9 UA/mg proteína, cuando se incubó con el extracto etanólico de semilla de *Eruca sativa* esta actividad se incrementó 1.86 veces alcanzando valores de 160.6 ± 7.1 UA/mg proteína, en el caso del extracto etanólico de semillas de *Sinapis alba* se incrementó 1.75 veces, mostrando una actividad de 151.1 ± 5.4 UA/ mg proteína.

La actividad enzimática basal de la quinona reductasa en la línea celular HT-29 fue de 1287.2 ± 82.3 UA/mg proteína. Cuando se incubó con el extracto etanólico de semillas de *Eruca sativa* o *Sinapis alba* se incrementó en 1.67 y 1.71 veces, llegando a valores de 2174.5 ± 51.2 y 2200.3 ± 57.0 UA/mg proteína, respectivamente.

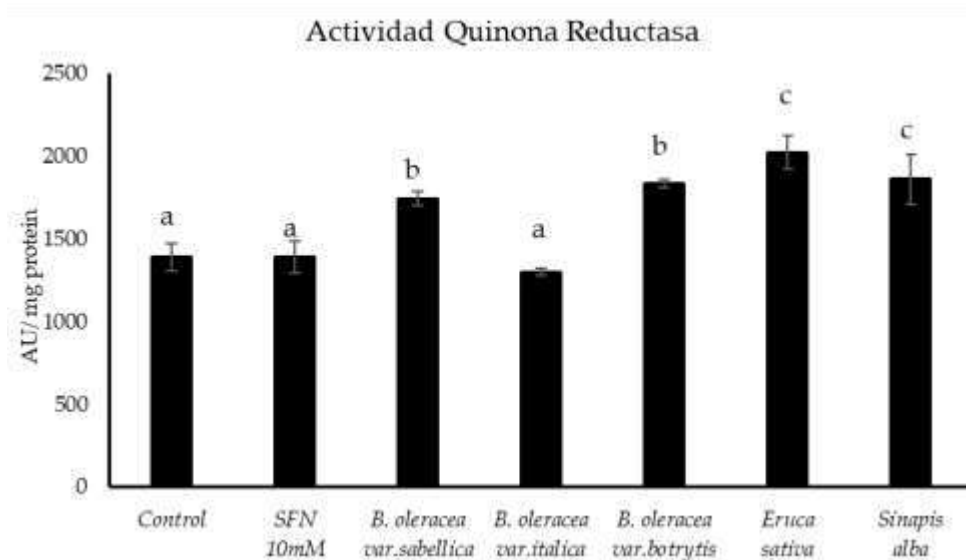
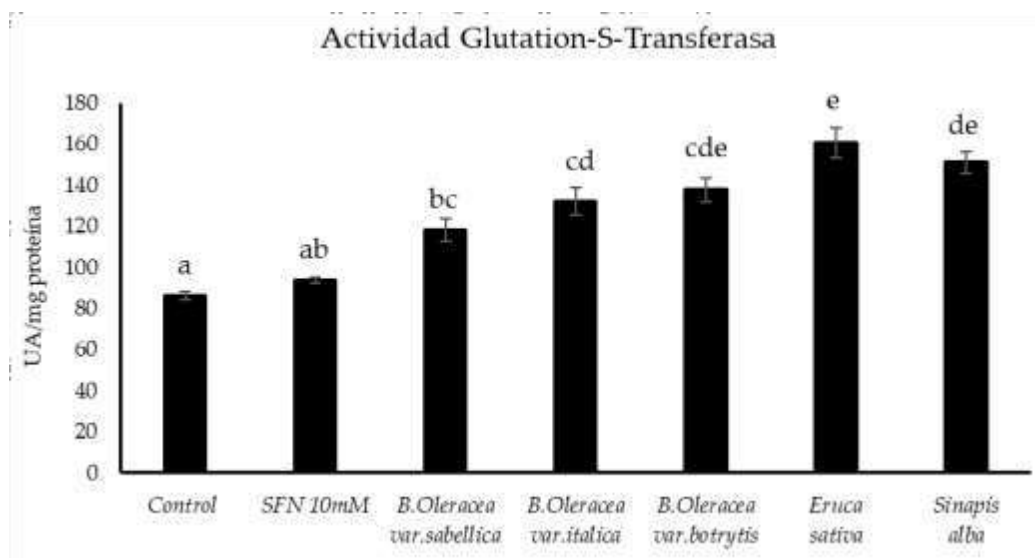


Figura 41. Influencia de los extractos etanólicos sobre la actividad de enzimas detoxificantes GST y QR. Sulforrafano (SFN). Resultados expresados como la media más error estándar de la media de nueve réplicas. Las medias con distinta letra (a, b, c, d, e) son significativamente diferentes, (ANOVA $P < 0,05$).

En el caso de los extractos de semillas germinadas solo se analizaron los de *Eruca sativa* y *Sinapis alba* ya que son las que mejores resultados mostraban, sin embargo, cuando se germinan pierden la actividad para inducir la actividad de estas enzimas detoxificante (**Figura 42**).

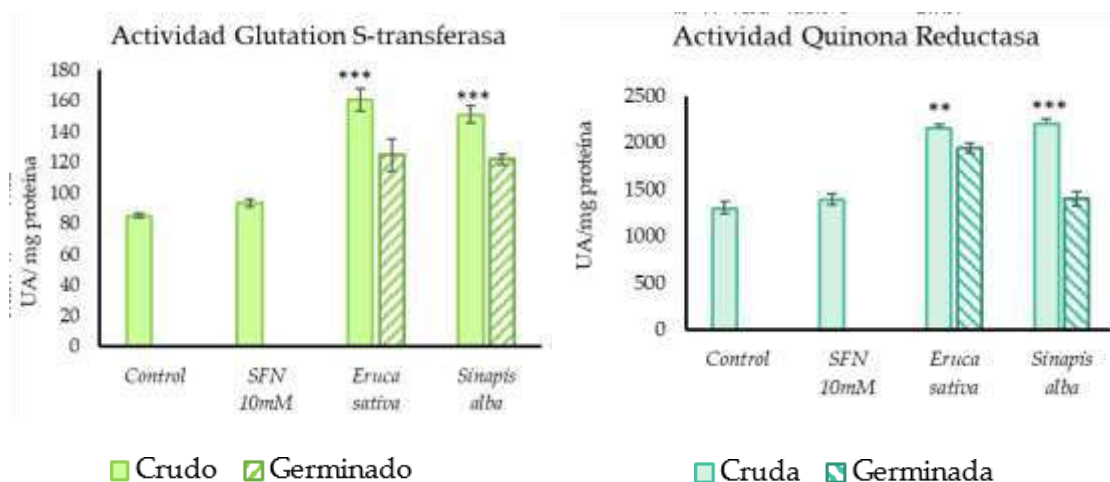


Figura 42. Efecto de la germinación sobre la capacidad para inducir la actividad de la enzima detoxificante QR. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de nueve réplicas. (**) diferencia significativa, (ANOVA $P < 0,01$). (***) diferencia significativa, (ANOVA $P < 0,001$).

4.2.1.1.6 Identificación compuestos bioactivos

Se identifican los compuestos bioactivos presentes en los distintos extractos realizados a partir de semillas de *Eruca sativa* y *Sinapis alba*, ya que son las que mejores resultados muestran en casi todas las pruebas detalladas con anterioridad. Aunque el extracto etanólico de semillas de *Sinapis alba* germinada muestra mayor rendimiento de extracción y mayor capacidad antioxidante en las pruebas químicas que el extracto procedente de semillas no germinadas, estos resultados no se ven reflejados en cultivos celulares. Por ello se decide continuar con la semilla de *Sinapis alba* sin germinar.

4.2.1.1.6.1 Extracto etanólico semilla de *Eruca sativa*

En el extracto etanólico de semilla de *Eruca sativa* el porcentaje mayoritario de moléculas encontradas pertenece a la familia de los flavonoides (35.3%), seguido de terpenoides (29.4%), cumarinas (29.4%) y por último isoflavonoides (11.8%). En concreto se han identificado los compuestos que se muestran en la **Tabla 37**, y se clasifican en:

- Flavonoides: Cyclomorusina, quercetina, catharticin, asebotín, neocurarinol y crinatusina A1.

-
- Terpenoides: Macfadyenoside, hainanxylogranin R, azadirone, dictamnósido M y 2',3'-dihydrosalannin.
 - Cumarinas: Praeruptorin A, peucenidin, chartreusin y ferulenol.
 - Isoflavonoides: Jamaicin e iridin.

4.2.1.1.6.2 Extracto etanólico semilla de *Sinapis alba*

El extracto etanólico de la *Sinapis alba* presentó mayor variedad de moléculas que el de *Eruca sativa*, siendo su mayor representación las moléculas pertenecientes a los fenilpropanoides y terpenos con un 55.6% del total. En concreto, se han identificado las moléculas que se muestran en la **Tabla 38**, y se clasifican en:

- Fenilpropanoides (27.8%) entre los que encontramos grandidentatin, pierotin A, eschweilenol B, cypellogin B e ikarisósido-F.
- Terpenoides (27.8%) como scutebata A, ácido bruceanico C, yadanzíolide U, salannin y 2',3'-dihydrosalannin.
- Glicósidos (16.7%) como ducheside A, trioxacarcin D y marinoid D.
- Flavonoides (11.1%) como parabarósido A y sempervirenoside B.

4.2.1.1.6.3 Hidrolizado proteico de *Eruca sativa*

Las moléculas identificadas por cromatografía en el hidrolizado proteico se muestran en la **Tabla 39**. Se encontraron principalmente flavonoides (30%), seguido por terpenos (20%), ácidos fenólicos (15%) y fenilpropanoides (10%). El resto de las moléculas pertenecen a lignanos, taninos, furanos, fitocanabinoide y fitoesteroides con un 5% de representación cada uno. En concreto las moléculas se clasifican de la siguiente manera:

- Flavonoides: Jaceidin triacetate, cucumerin B, epigallocatechin, sacuranin, brousoflavan A y fenilnaringenin.
- Terpenos: Lamioside, chamissonolide, hydrangenósido A y basilimoside.
- Ácidos fenólicos: Ácido digálico, rubialatin A y curculigósido A.
- Fenilpropanoide: Raponticina y scortechinone A
- Otros: Lignanos (diphyllin), taninos (acertannin), furanos (mumefural), fitocanabinoide (machaeridiol A) y fitoesteroide (periplocin).

4.2.1.1.6.4 Hidrolizado proteico de semilla de *Sinapis alba*.

Los compuestos identificados en el hidrolizado proteico de *S. alba* se muestran en la **Tabla 40**. Esta compone principalmente por flavonoides y terpenoides con un 33.3% cada uno, seguido de glicósidos (16.7%), ácidos fenólicos (5.6%), ácidos grasos (5.6%) y diarilheptanoides (5.6%).

- Flavonoides (33.3%): Auriculasin, hibifolin, gallocatechin, glycitin, sakuranin y dichamanetin.
- Terpenoides (33.3%): Lucidumoside C, E-aldosecologanin, ligustrosidic acid, camelliagenin, basilimoside, y pyrohyperforin.
- Glicósidos (16.7%): Itoside J, prunioside A y populoside,
- Otros (16.7): ácidos fenólicos (curculigoside A), ácidos grasos (pinellic acid) y diarilheptanoides (hexahydrocurcumin).

Tabla 37. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Eruca sativa*.

TR	Masa	Nombre	Fórmula [H]	% FIT	F1	F2	F3
1.12	377.1084	Macfadyenoside	C ₁₅ H ₂₁ O ₁₁	76.75	207.0391	191.0394	159.0249
1.12	377.1025	Jamaicin	C ₂₂ H ₁₇ O ₆	21.75	251.0366	239.0766	225.0925
2.69	417.1338	Cyclomorusin	C ₂₅ H ₂₁ O ₆	55.32	365.1486	207.063	179.0578
3.32	789.2242	Hainanxylogranin R	C ₃₇ H ₄₁ O ₁₉	80.17	653.2082	592.2589	556.2161
3.60	385.1287	Praeruptorin A	C ₂₁ H ₂₁ O ₇	99.94	266.1439	251.0362	226.9952
3.84	385.1287	Peucenidin	C ₂₁ H ₂₁ O ₇	99.37	269.1433	251.0429	240.0081
4.16	639.1714	Chartreusin	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	84.52	381.0948	266.1374	251.0544
4.89	771.1773	Quercetin 3-O-a-(6''-caffeoylglucosyl-β-1.2-rhamnosid)	C ₃₆ H ₃₅ O ₁₉	89.25	648.2094	279.1409	251.0414
5.14	753.2242	Catharticin	C ₃₄ H ₄₁ O ₁₉	70.15	688.2224	648.1995	425.1129
5.52	521.1295	Iridin	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃	87.95	381.1283	251.055	227.0318
5.87	449.1448	Asebotin	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₀	93.51	381.119	251.0237	227.0424
7.97	365.2117	Ferulenol	C ₂₄ H ₂₉ O ₃	98.32	309.1926	294.1995	293.1595
10.03	469.2226	Neokurarinol	C ₂₇ H ₃₃ O ₇	50.91	441.2203	381.2156	309.1743
12.02	435.2535	Azadirone	C ₂₈ H ₃₅ O ₄	78.01	353.1743	325.1894	309.1454
13.70	595.2966	Dictamnocide M	C ₂₇ H ₄₇ O ₁₄	90.59	397.2198	381.2178	353.19
15.55	433.2379	Crinatusin A1	C ₂₈ H ₃₃ O ₄	78.12	353.214	267.0563	265.1572
16.04	597.3064	2'.3'-dihydrosalannin	C ₃₄ H ₄₅ O ₉	98.81	465.2191	441.2313	397.2296

(*). Tiempo de retención (TR). Fracciones (F1. F2. F3)

Tabla 38. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Sinapis alba*.

TR	Masa	Nombre	Formula [H ⁻]	% Fit	F1	F2	F3
1.66	423.1655	Grandidentatin	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	34.48	301.1106	267.0971	246.0438
3.27	447.0569	Ducheside A	C ₂₀ H ₁₅ O ₁₂	64.75	220.0364	132.0425	119.38
4.28	631.2543	Scutebata A	C ₃₆ H ₃₉ O ₁₀	89.18	590.2211	554.2538	267.0598
4.53	553.1557	Marinoid D	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₄	40.05	321.1121	294.0656	280.078
5.3	609.2183	Bruceanic Acid C	C ₂₉ H ₃₇ O ₁₄	43.08	557.2305	555.2502	266.0718
5.47	641.187	Haemocorin	C ₃₂ H ₃₃ O ₁₄	71.29	305.0453	277.0075	250.0357
6.24	647.1976	Parabaroside A	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₅	45.52	590.1998	280.0638	220.0298
6.45	849.2817	Sempervirenoside B	C ₄₀ H ₄₉ O ₂₀	42.32	670.7985	669.2363	668.2377
6.8	587.1917	Pierotin A	C ₃₃ H ₃₁ O ₁₀	77.07	178.032	159.011	119.0547
7.25	422.9988	Eschweilenol B	C ₂₀ H ₇ O ₁₁	27.5	276.9727	237.9861	220.0342
8.34	877.313	Trioxacarcin A	C ₄₂ H ₅₃ O ₂₀	60.89	670.1824	652.2339	250.0217
8.44	833.2868	Trioxacarcin D	C ₄₀ H ₄₉ O ₁₉	95.04	670.2202	668.2413	321.088
8.62	629.187	Cypellogin B	C ₃₁ H ₃₃ O ₁₄	14.75	321.0891	278.0115	250.0217
9.21	631.2027	Ikarisoside-F	C ₃₁ H ₃₅ O ₁₄	90.42	590.2426	344.0882	253.0991
10.54	557.2234	Yadanziolide U	C ₂₆ H ₃₇ O ₁₃	47.32	321.0942	301.1232	267.0796
12.11	595.2907	Salannin	C ₃₄ H ₄₃ O ₉	60.75	555.2515	554.2515	307.1337
13.51	597.3064	2'.3'-dihydrosalannin	C ₃₄ H ₄₅ O ₉	78.13	572.2922	571.293	433.2336

Tiempo de retención (TR), Fracciones (F1, F2, F3)

Tabla 39. Identificación de moléculas en el hidrolizado proteico de semillas de *Eruca sativa*.

TR	Masa	Nombre	Formula [H-]	% FIT	F1	F2	F3
0.93	419.1553	Lamioside	C ₁₈ H ₂₇ O ₁₁	92.03	313.134	239.0838	225.0663
0.93	419.1342	Rhaponticin	C ₂₁ H ₂₃ O ₉	92.74	293.072	240.035	239.0872
1.22	299.0422	Mumefural	C ₁₂ H ₁₁ O ₉	82.06	290.0497	239.0921	226.0078
1.28	467.0826	Acertannin	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₃	14.7	294.0796	240.0569	239.0845
1.49	321.0247	Digallic acid	C ₁₄ H ₉ O ₉	99.27	275.0571	152.0169	138.0219
1.8	485.1084	Jaceidin triacetate	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₁	49.06	306.036	293.0614	275.0474
1.82	551.1553	Cucumerin B	C ₂₉ H ₂₇ O ₁₁	82.75	305.1086	272.1063	226.9898
2.04	379.0818	Diphyllin	C ₂₁ H ₁₅ O ₇	90.9	293.0844	240.0518	105.0316
2.48	471.0927	Epigallocatechin (*)	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₁	99.16	239.0922	205.051	151.0674
2.52	471.108	Rubialatin A	C ₂₇ H ₁₉ O ₈	57.97	239.0864	226.9933	173.0208
3.74	465.1397	Curculigoside A	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₁	90.76	293.0581	239.095	226.9965
4.61	447.1291	Sakuranin	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	91.92	239.0945	221.083	205.0504
6.36	681.3593	Periplocin	C ₃₅ H ₅₃ O ₁₃	65.32	555.2762	554.2761	553.3035
7.06	425.1964	Brousoflavan A	C ₂₅ H ₂₉ O ₆	77.48	375.1538	272.169	239.0972
7.34	323.1495	Chamissonolide	C ₁₇ H ₂₃ O ₆	98.60	265.1469	239.0942	205.0589
8.88	339.1232	8-Prenylnaringenin	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	99.52	299.1227	151.0773	137.058
8.97	619.2381	Hydrangoisde A	C ₃₁ H ₃₉ O ₁₃	96.44	592.252	557.2371	341.1693

Evaluación de la efectividad terapéutica de extractos funcionales obtenidos de Brassicáceas.

9.67	347.2011	Machaeridiol A	C ₂₄ H ₂₇ O ₂	86.19	265.1534	225.0846	137.0587
11.34	587.4312	Basilimoside	C ₃₆ H ₅₉ O ₆	73.07	341.1819	315.1983	205.0685
12.44	561.2852	Scortechinone A	C ₃₄ H ₄₁ O ₇	48.69	293.08	265.1096	239.0798

(*) Epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl)gallate. Tiempo de retención (TR), Fracciones (F1, F2, F3)

Tabla 40. Identificación de moléculas en el hidrolizado proteico de semillas de *Sinapis alba*.

TR	Masa	Nombre	Fórmula [H-]	% FIT	F 1	F 2	F3
0.96	419.1495	Auriculasin	C ₂₅ H ₂₃ O ₆	66.38	293.0522	225.0638	179.0691
1.63	493.0618	Hibifolin	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₄	80.82	226.9881	205.0481	173.0185
1.73	825.2242	Itoside J	C ₄₀ H ₄₁ O ₁₉	73.84	301.1171	239.0895	205.0467
2.67	505.171	Prunioside A	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₁	30.93	339.1537	315.1891	293.0902
3.02	583.2027	Lucidumoside C	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₄	23.83	306.0388	293.0847	275.0577
3.27	757.2555	(E)-Aldosecologanin	C ₃₄ H ₄₅ O ₁₉	28.13	712.2632	668.2736	652.2427
3.79	465.1397	Curculigoside A	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₁	86.63	293.0742	239.0945	226.9914
4.00	305.0661	(+)-Gallocatechin	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	95.26	205.052	179.0308	151.0704
4.52	445.1135	Glycitin	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀	81.63	301.1329	293.1068	239.0781
4.66	447.1291	Sakuranin	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	85.8	325.135	293.1068	239.0781
4.87	447.1291	Populoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	45.55	293.0991	275.0672	265.1148
5.12	553.1557	Ligustrosidic acid	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₄	75.76	293.092	275.0713	239.0794
6.52	467.1495	Dichamanetin	C ₂₉ H ₂₃ O ₆	37.12	275.0988	239.0725	119.0487
7.57	329.2328	Pinellic acid	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	n/a	151.073	137.0533	119.0466
7.74	373.1651	Hexahydrocurcumin	C ₂₁ H ₂₅ O ₆	80.86	205.0491	159.0483	151.0748
10.82	531.3686	Camelliagenin	C ₃₂ H ₅₁ O ₆	72.05	401.1227	327.0776	293.0801
11.20	587.4312	Basilimoside	C ₃₆ H ₅₉ O ₆	63.52	371.2141	315.2388	239.0923
11.53	533.3631	Pyrohyperforin	C ₃₅ H ₄₉ O ₄	31.61	293.1166	151.077	119.0516

Tiempo de retención (TR), Fracciones (F1, F2, F3)

4.2.2 Diseño y caracterización del nutraceutico

Se seleccionan las semillas de *Eruca sativa* y *Sinapis alba* para el desarrollo de tres nutraceuticos, ya que son las que mejores resultados han mostrado en las pruebas de capacidad antioxidante, tanto químicas como en cultivos celulares, y de inducción de enzimas detoxificantes.

- NT1: Compuesto por semillas de *Eruca sativa* (100%).
- NT2: Compuesto por semillas de *Sinapis alba* (100%).
- NT3: Compuesto por semillas de *Eruca sativa* (50%) y semillas de *Sinapis alba* (50%).

Los nutraceuticos han sido formulados con el objetivo de buscar sinergias entre las distintas metodologías de extracción usadas, así como de las diferentes semillas estudiadas, ya que la *Eruca sativa* destacó en pruebas como el ABTS y la capacidad quelante o reductora del hierro, mientras que la *Sinapis alba* en el rendimiento y la concentración de polifenoles. La composición específica de cada nutraceutico se muestra en la siguiente **Tabla 41**:

Tabla 41. Composición porcentual de los distintos nutraceuticos desarrollados para el estudio del cáncer colorrectal.

		NT 1	NT 2	NT 3
<i>Eruca sativa</i>	Hidrolizado proteico	80		40
	Extracto etanólico	20		10
<i>Sinapis alba</i>	Hidrolizado proteico		80	40
	Extracto etanólico		20	10

Nutraceutico (NT)

4.2.2.1 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los distintos nutraceuticos desarrollado se muestra en la **Tabla 42**. No se encontraron diferencias significativas para las pruebas de capacidad quelante del hierro o capacidad para inhibir la peroxidación lipídica entre los tres nutraceuticos desarrollados. Sin embargo, el nutraceutico compuesto por la combinación de ambas semillas (NT3) y el compuesto solo de semillas de *Eruca sativa*

(NT1) presentaron mayor concentración de polifenoles totales. Además, en este último se encontró mayor capacidad para reducir el hierro y para captar radicales libres de ABTS.

Tabla 42. Capacidad antioxidante de los distintos nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR.

	NT 1	NT 2	NT 3
Polifenoles ($\mu\text{g AG/mg NT}$)	32.8 (0.2) ^b	31.5 (0.2) ^a	32.5 (0.3) ^b
ABTS ($\mu\text{g AG/mg NT}$)	9.5 (0.1) ^c	5.6 (0.1) ^a	7.8 (0.2) ^b
Cap.reductora Fe (UAR/mg NT)	15.1 (0.1) ^c	9.1 (0.1) ^a	12.4 (0.2) ^b
Cap.quelante Fe (UCQ/mg NT)	0.96 (0.02) ^a	0.86 (0.01) ^a	0.93 (0.04) ^a
TBARS (mUAA/mg NT)	18.0 \pm (0.3) ^a	18.5 (0.4) ^a	19.3 (0.3) ^a

Nutraceutico (NT); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARS). Resultados expresados en microgramos equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g AG}$), unidad de actividad quelante (UCQ) o unidad de actividad reductora (UAR) por miligramo de nutraceutico (mg NT). Resultados expresados como la media de tres réplicas más error estándar de la media. Medias con diferentes letras (a, b, c) representan valores significativamente diferentes (ANOVA $p < 0.05$)

4.2.2.2 Digestión *in vitro*

El porcentaje de digestibilidad y la capacidad antioxidante tras un proceso de digestión *in vitro* sobre los tres nutraceuticos desarrollados se muestra en la **Tabla 43**. El 91.6% del nutraceutico 1 fue potencialmente absorbible, es decir pasaría por difusión a través del organismo, frente un 57.1% y un 73.1% para el NT2 y NT3 respectivamente. Con respecto a los dializados, la mayor concentración de polifenoles se encontró en el NT2, pero para el resto de pruebas de capacidad antioxidante obtuvieron mejores resultados el NT1. El NT3 permaneció siempre entre ambos nutraceuticos, e incluso se igualó su actividad para quelar el hierro o captar radicales de ABTS con el NT1. El retenido del NT2 mostró mayor capacidad para inhibir la formación del radical libre ABTS así como para quelar el hierro, mientras que el retenido del NT1 lo hizo para reducir el hierro e inhibir la peroxidación lipídica. De nuevo, el retenido del NT3 mostró valores intermedios entre los retenidos de los otros nutraceuticos, equiparándose en algunas pruebas como la concentración de polifenoles con el que mayor capacidad presentó.

Tabla 43. Porcentaje de digestibilidad y capacidad antioxidante de los nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR, tras un proceso de digestión *in vitro*.

	Dializabilidad (%)	Polifenoles (µg AG/mg)	ABTS (µg AG/mg)	CQF (UCQ/mg)	CRF (µg AG/mg)	TBARs (UAA/mg)
Dializado NT 1	91.6 (2.8) ^c	34.5 (0.8) ^a	7.1 (0.2) ^b	2.0 (0.0) ^c	10.2 (0.3) ^b	0.8 (0.0) ^c
NT 2	57.2 (1.5) ^a	57.2 (1.2) ^c	5.7 (0.2) ^a	0.1 (0.0) ^a	7.8 (0.4) ^a	0.4 (0.0) ^a
NT 3	73.1 (2.3) ^b	47.3 (1.1) ^b	7.0 (0.4) ^b	0.9 (0.0) ^b	10.3 (0.6) ^b	0.6 (0.0) ^b
Retenido NT 1		35.0 (0.6) ^a	6.7 (0.3) ^a	1.7 (0.0) ^a	12.2 (0.2) ^c	2.3 (0.2) ^b
NT 2		49.1 (1.2) ^b	10.0 (0.3) ^c	2.7 (0.1) ^c	7.4 (0.3) ^a	1.8 (0.0) ^a
NT 3		48.6 (1.2) ^b	8.6 (0.4) ^b	2.1 (0.0) ^b	9.5 (0.4) ^b	1.4 (0.1) ^a

Capacidad quelante del hierro (CQF); Capacidad reductora del hierro (CRF); Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs); Nutraceutico (NT); fracción potencialmente absorbible (Dializado); fracción no absorbible (retenido). Resultados expresados en microgramos equivalentes de ácido gálico (µg AG), unidad de actividad quelante (UCQ), actividad reductora (UAR) o actividad antioxidante (UAA) por miligramo de nutraceutico (mg NT). Resultados expresados como la media de tres réplicas más error estándar de la media. Medias con diferentes letras (a, b, c) representan valores significativamente diferentes (ANOVA $p < 0.05$)

4.2.2.3 Citotoxicidad

Se probó la capacidad del nutraceutico para inhibir la proliferación celular en cultivos de células tumorales, en este caso T-84 y HT-29, representando los resultados en la **Figura 43** y **Figura 44** respectivamente. Ninguno de los nutraceuticos mostró citotoxicidad frente a la línea celular T-84, mientras que el nutraceutico compuesto en su totalidad por semilla de *Eruca sativa* mostró capacidad para inhibir el 50% de la proliferación celular en la línea HT-29 ($Ic_{50} = 940.7 \pm 25.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), no obstante, siguen siendo valores muy elevados por lo que no se considera citotóxico.

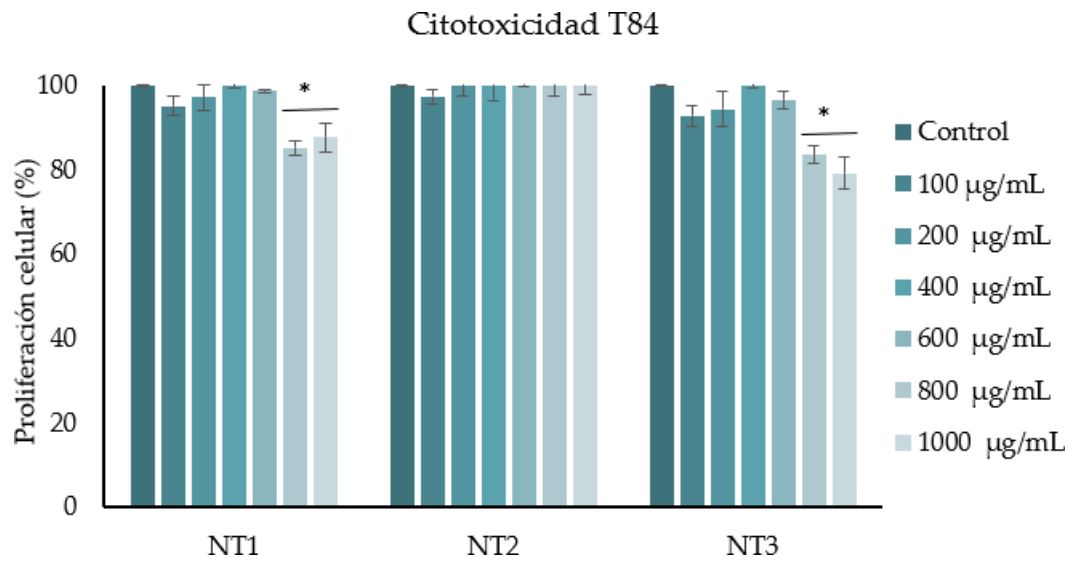


Figura 43. Capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para inhibir el crecimiento celular de la línea T-84. NT; Nutraceutico. Resultados expresados como la media de 8 réplicas más error estándar de la media con barras verticales. * diferencias significativamente estadísticas ($p \leq 0.05$).

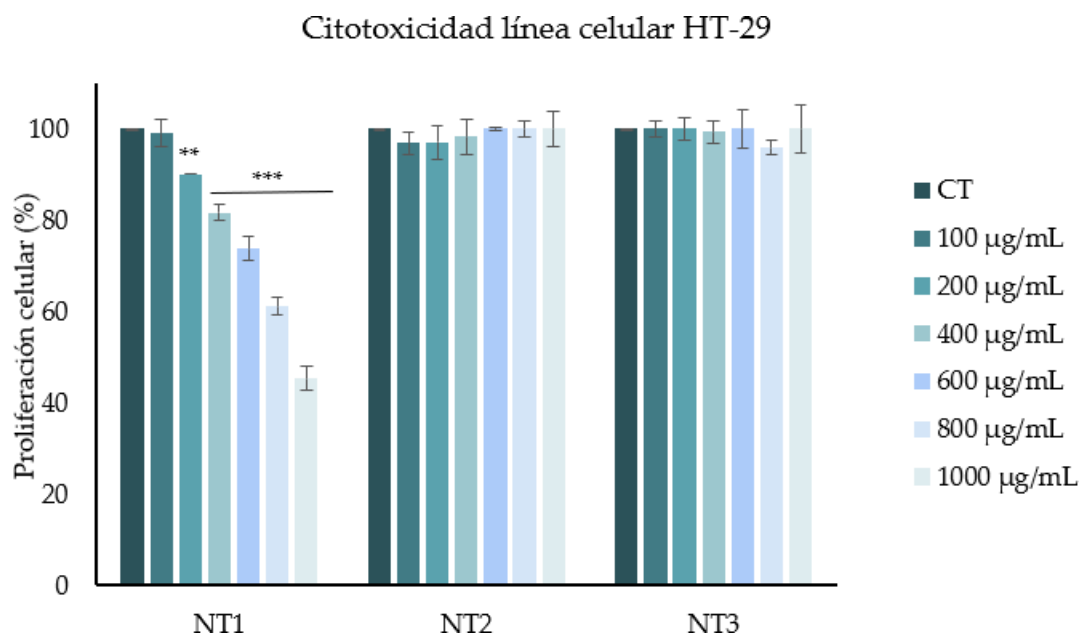


Figura 44. Capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para inhibir el crecimiento celular de la línea HT-29. Resultados expresados como la media de 8 réplicas más error estándar de la media con barras verticales. Diferencias significativamente estadísticas (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

4.2.2.4 Capacidad antioxidante en cultivo celular

En la **Tabla 44** se muestra el grado de protección que confieren los distintos nutraceuticos desarrollados a la línea celular HT-29 cuando está se expone a un agente oxidante conocido como paraquat. El que menor grado de protección confirió fue el nutraceutico compuesto 100% de semillas de *Eruca sativa* (NT1) con tan solo un 5.6%, el resto presentaban igual grado de protección (14.8%), sin embargo, el NT3 compuesto por la combinación de ambos necesitó menos concentración para el mismo grado de protección.

Tabla 44. Grado de protección que confieren los nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR, frente al agente oxidante paraquat.

	[NT] (mg/mL)	[NT] nc (mg/mL)	Supervivencia HT29	Supervivencia HT29+EtOH	Protección (%)
NT 1	50	0.7143	63.3 (0.6)	68.9 (2.2)	5.6 ^a
NT 2	50	0.7143	63.3 (0.6)	78.2 (1.0)	14.8 ^b
NT 3	50	0.6250	63.3 (0.6)	78.2 (1.7)	14.8 ^b

Concentración del nutraceutico [NT]; Concentración nutraceutico no citotóxica [NT]nc; Nutraceutico 100% semillas de *Eruca sativa* (N1); Nutraceutico 100% semillas de *Sinapis alba* (N2); Nutraceutico 50% semillas de *Eruca sativa* + 50% semillas de *Sinapis alba* (N3).

4.2.2.5 Capacidad de inducción enzimas detoxificantes

En la **Figura 45** se muestra la capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para inducir enzimas detoxificantes como la GST. Todos fueron capaces de incrementar la actividad con respecto a la actividad basal, pero no se encontraron diferencias significativas entre ellos. La actividad basal para la línea celular HT-29 es de 116.6 ± 5.9 UA/ mg proteína, y con los distintos nutraceuticos se incrementó hasta alcanzar valores de 157.0 ± 2.6 para NT1, 147.5 ± 6.4 para NT2 y 158.1 ± 6.0 para NT3.

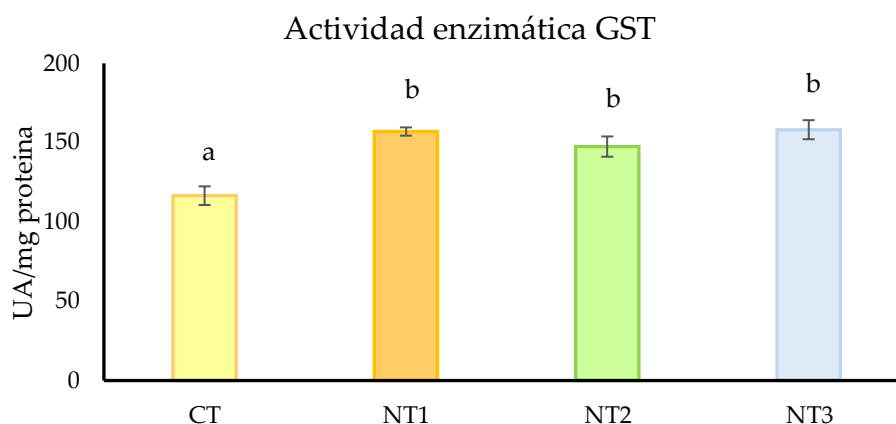


Figura 45. Capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR para inducir la enzima detoxificantes GST. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de nueve réplicas. Medias con distintas letras (a, b) muestran diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$).

4.2.2.6 Identificación de compuestos bioactivos

El nutraceutico seleccionado para llevar a cabo la experimentación animal es el nutraceutico formado por semillas de *Eruca sativa* y semillas de *Sinapis alba* (NT3). Debido a que el NT3 mostró mejores resultados de capacidad antioxidante tras el proceso de digestión *in vitro*, mayor capacidad antioxidante en cultivos celulares y mayor actividad para inducir la actividad de la enzima GST, se decide identificar sus compuestos bioactivos y estudiar su aplicación en un modelo animal de cáncer colorrectal. La identificación de las moléculas se muestra en la **Tabla 45**.

El perfil de moléculas encontradas en el nutraceutico se compuso de:

- Flavonoides (33.3%): Pectolinarigenin, epigallocatechin, galocatechin, cucumerin B, quercetin, dichamanetin, nobiletin, moracenin D, eucalyptin y prenylnaringenin.
- Terpenos (20%): Kireanol, lucidumoside C, ligustrosidic acid, chamissonolide, hydrangenoside A y pyrohyperforin.
- Ácidos fenólicos (6.7%): Curculigoside A y populin.
- Fenilpropanoides (6.7%): Nothoapiole y atharticin,
- Glucósidos (6.7%): Marinoid D y prunioside A,

- Otros (26.7%): alcaloide (nesodine), alcohol graso (persealide), cromona (cimifugin), éter (crotepoxide), fenol (rubialatin A), furano (mumefural), isoflavonas (glycitin) y lignanos (diphyllin).

Tabla 45. Compuestos identificados en el nutracéutico utilizado en el ensayo experimental para cáncer de colon.

RT	Masa	Nombre	Fórmula [H]	% FIT	F1	F2	F3
0.95	313.0712	Pectolinarigenin	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	96.65	225.0631	180.0354	120.0542
1.22	299.0403	Mumefural	C ₁₂ H ₁₁ O ₉	98.65	240.0316	225.069	220.0431
2.17	379.0818	Diphyllin	C ₂₁ H ₁₅ O ₇	34.36	293.0519	280.1175	105.0269
2.41	471.0927	Epigallocatechin (* ¹)	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₁	99.45	331.0149	253.0714	209.0065
2.67	471.108	Rubialatin A	C ₂₇ H ₁₉ O ₈	69.13	347.0891	293.041	267.1032
2.69	361.0923	Crotopoxide	C ₁₈ H ₁₇ O ₈	99.94	220.0375	159.0295	119.0415
2.70	505.171	Prunioside A	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₁	93.83	347.0891	293.041	267.1032
3.57	305.066	(+)-Gallocatechin	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	99.1	267.0891	239.0623	221.0522
3.78	465.1397	Curculigoside A	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₁	99.5	347.0685	331.0488	253.0787
4.01	167.1553	Cimifugin (²)	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₁	99.33	227.0043	220.0349	209.0298
4.16	583.2027	Lucidumoside C	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₄	89.84	301.1084	262.0572	220.0384
4.19	551.1553	Cucumerin B	C ₂₉ H ₂₇ O ₁₁	2.85	315.1268	294.0228	262.0588
4.33	553.1557	Ligustrosidic acid	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₄	99.07	294.0379	267.0679	253.0775
4.35	553.1557	Marinoid D	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₄	99.07	317.038	267.0788	250.0633
4.65	445.1135	Glycitin	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀	1.49	317.0562	267.0958	250.0111
4.68	771.1773	Quercetin 3-O-a-(³)	C ₃₆ H ₃₅ O ₁₉	8.75	267.0869	253.084	227.0035
4.72	467.1495	Dichamanetin	C ₂₉ H ₂₃ O ₆	10.39	253.0823	239.0681	195.0144
5.73	401.1236	Nobiletin	C ₂₁ H ₂₁ O ₈	91.69	347.0704	253.0765	239.0632
6.12	709.2285	Moracenin D	C ₄₀ H ₃₇ O ₁₂	38.63	668.2699	267.0976	239.0707
6.92	551.2856	Lokundjoxide	C ₂₉ H ₄₃ O ₁₀	84.27	287.1523	267.1325	165.0612
6.95	389.1236	Populin/ Populoside	C ₂₀ H ₂₁ O ₈	84.36	301.1513	220.0353	195.0285

7.34	323.1495	Chamissonolide	C ₁₇ H ₂₃ O ₆	99.75	309.135	262.0421	221.0459
7.87	251.0919	Nothoapiole	C ₁₃ H ₁₅ O ₅	n/a	220.036	207.0571	158.9771
8.32	753.2242	Catharticin	C ₃₄ H ₄₁ O ₁₉	15.22	331.0123	253.071	239.0514
8.53	325.1076	Eucalyptin	C ₁₉ H ₁₇ O ₅	94.85	299.1306	267.0681	220.025
8.81	619.2391	Hydrangenoside A	C ₃₁ H ₃₉ O ₁₃	54.88	556.2574	262.052	220.054
9.86	339.1232	8-Prenylnaringenin	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	98.19	339.1318	239.0277	105.0285
11.36	533.3631	Pyrohyperforin	C ₃₅ H ₄₉ O ₄	16.01	400.2627	301.1781	159.0122
12.91	433.2015	Nesodine	C ₂₇ H ₂₉ O ₅	25.23	317.0427	267.1048	239.073
14.31	337.2379	Kirenol	C ₂₀ H ₃₃ O ₄	n/a	323.22	136.0556	119.0428
15.19	339.2535	Persealide	C ₂₀ H ₃₅ O ₄	n/a	325.2375	207.0567	159.0379

(¹) Epigallocatechin-O-(3-O-methyl) gallate; (²) Cimifugin β-D-glucopyranoside; (³) Quercetin 3-O-a-6'''-caffeoylglucosyl-β-1.2-rhamnoside. Tiempo de retención (TR), Fracciones (F1, F2 y F3).

Las moléculas provenían principalmente de los hidrolizados proteicos de *Eruca sativa* y *Sinapis alba*, ya que fue el componente mayoritario del nutraceutico, también aparecieron moléculas que fueron identificadas previamente en los extractos etanólicos, pero en menor medida. En la siguiente **Tabla 46** podemos ver cuáles de las moléculas identificadas en el nutraceutico ya habían sido identificadas en alguno de sus componentes. El nutraceutico compartía 9 moléculas que ya habían sido identificadas en el hidrolizado proteico de *Eruca sativa* y otras 9 en el hidrolizado proteico de *Sinapis alba*. No obstante, con extracto etanólico de *Eruca sativa* solo compartió dos, y con el de *Sinapis alba* una.

Tabla 46. Comparación de moléculas identificadas en el nutraceutico y en cada uno de los extractos usados para su formulación.

	NT	HP <i>E. sativa</i>	HP <i>S. alba</i>	EtOH <i>E. sativa</i>	EtOH <i>S. alba</i>
Mumefural	X	X			
Diphyllin	X	X			
Epigallocatechin	X	X			
Rubialatin A	X	X			
Prunioside A	X		X		
(+)-Gallocatechin	X		X		
Curculigoside A	X	X	X		
Lucidumoside C	X		X		
Cucumerin B	X	X			
Ligustrosidic acid	X		X		
Marinoid D	X				X
Glycitin	X		X		
Quercetin 3-O-a-(*))	X			X	
Dichamanetin	X		X		
Populoside	X		X		
Chamissonolide	X	X			
Nothoapiole	X				
Catharticin	X			X	
Hydrangenoside A	X	X			
(-)-8-Prenylnaringenin	X	X			
Pyrohyperforin	X		X		
Total	21	9	9	2	1

(*)) Quercetin 3-O-a-6'''-caffeoylglucosyl-β-1.2-rhamnoside. Nutraceutico (NT); Extracto etanólico (EtOH); Hidrolizado proteico (HP)

4.2.3 Ensayo experimental animal

4.2.3.1 Peso e ingesta de los animales

El peso de los animales a lo largo de todo el período experimental se muestra en la **Figura 46**. Se inició el ensayo con un peso medio de 15 ± 1 g y todos los animales alcanzaron los 22 ± 2 g al final del ensayo experimental. El descenso de peso que se observó en la semana 5, 8 y 11 para los animales CT+, NT y NT+Ex fue debido a las administraciones del DSS para la generación del tumor.

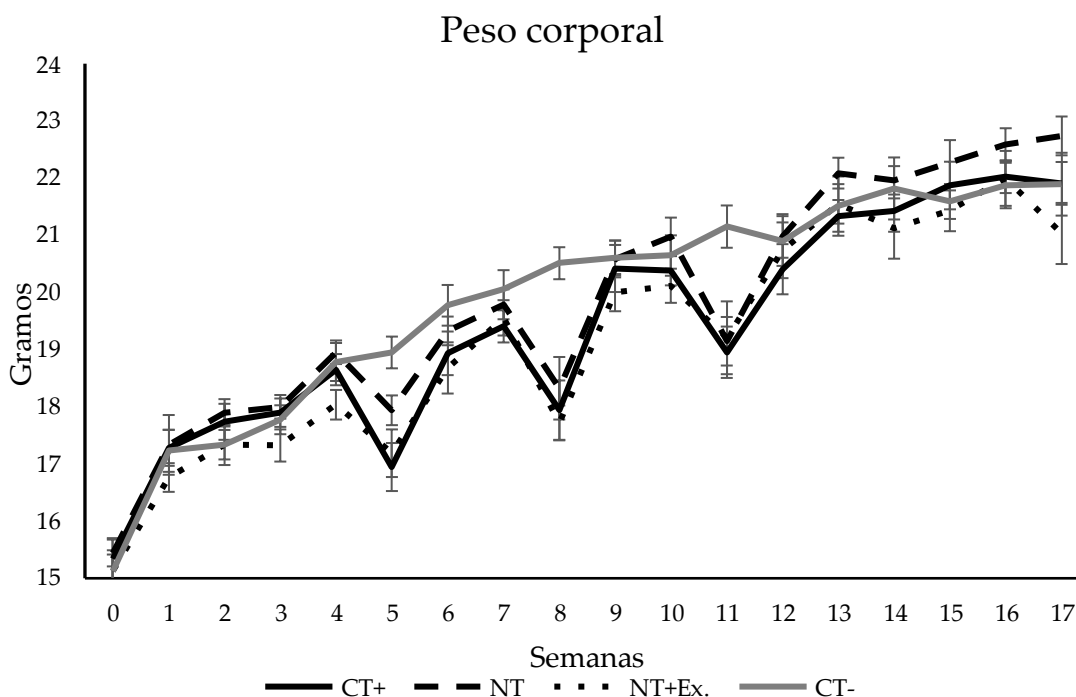


Figura 46. Evolución del peso de los animales a lo largo de todo el período experimental. Los resultados representan la media más error estándar de la media de 15 animales experimentales.

En relación con la ingesta de alimento, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, a excepción de las semanas 5, 8 y 10 en las que, al igual que en el peso de los animales, la ingesta disminuyó en los grupos que desarrollaron tumor debido al malestar ocasionado por el DSS (**Figura 47**). No obstante, no se observaron diferencias significativas con respecto a la ingesta del agua de bebida que es dónde se administraba el DSS (**Figura 48**).

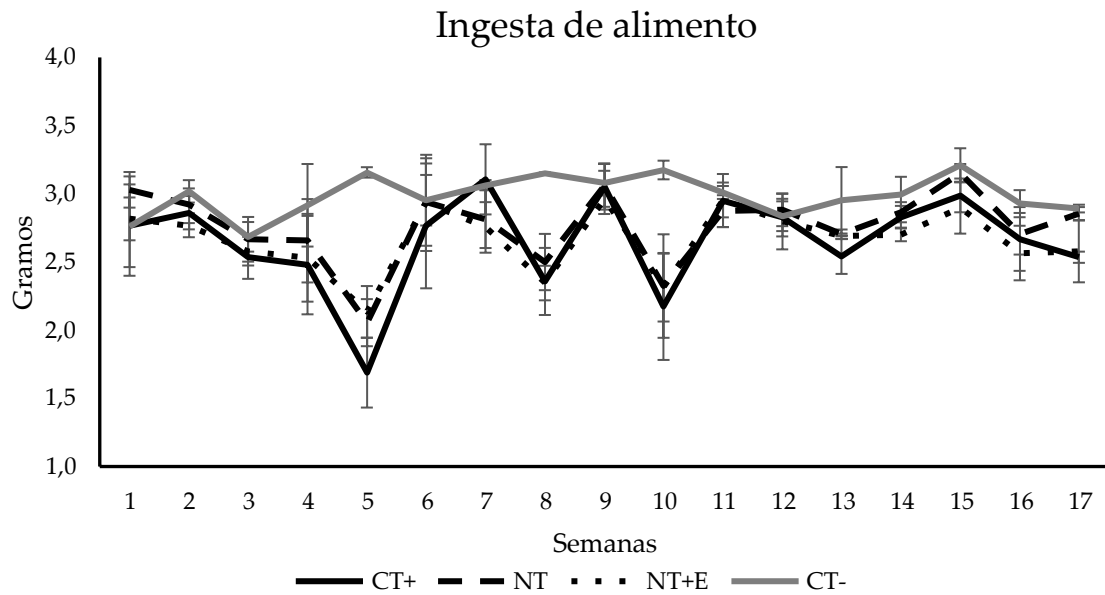


Figura 47. Evolución de la ingesta de alimento durante todo el período experimental. Los resultados representan la media más error estándar de la media de 15 animales experimentales.

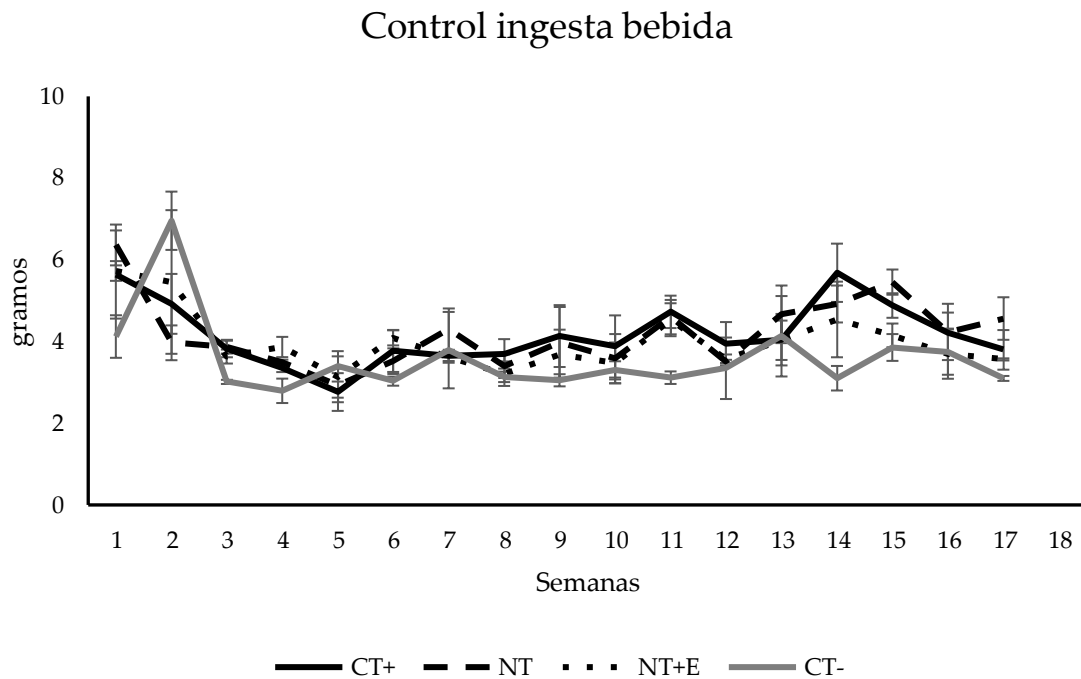


Figura 48. Evolución del consumo de agua de bebida durante todo el período experimental. Los resultados representan la media más error estándar de la media de 15 animales experimentales.

4.2.3.2 Parámetros hemáticos

El análisis hematológico se muestra en la **Tabla 47**. La inducción y desarrollo del tumor produjo un incremento significativo en el volumen corpuscular medio (MCV) y en la distribución (RDW) de los eritrocitos. Por otra parte, redujo de forma significativa el número de plaquetas (PLT). El recuento leucocitario (WBC) aumentó en el grupo CT+ con respecto al grupo CT-, y se alcanzaron valores incluso inferiores al de los ratones sanos cuando se aplican las intervenciones.

Los grupos que habían ingerido el nutracéutico mostraron valores significativamente inferiores para la concentración hemoglobina (HGB). Además, el que realizó el programa de ejercicio mostró valores de recuento eritrocitario (RBC) y hematocrito (HCT) inferiores al resto.

Tabla 47. Efecto de del desarrollo del tumor, y de la intervención nutricional o de ejercicio físico, sobre los parámetros hemáticos.

	CT-	CT+	NT	NT+Ex
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	819.0 (5.2) ^b	430.0 (38.5) ^a	604.9 (48.5) ^a	438.1 (55.1) ^a
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	3.04 (0.24) ^{ab}	3.84 (0.34) ^b	2.32 (0.21) ^a	2.86 (0.22) ^a
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8.35 (0.15) ^b	7.40 (0.23) ^{ab}	7.37 (0.29) ^{ab}	6.83 (0.37) ^a
HGB (g/dL)	12.95 (0.27) ^b	11.45 (0.49) ^{ab}	10.15 (0.49) ^a	10.75 (0.54) ^a
HCT (%)	36.53 (0.75) ^b	34.35 (1.45) ^{ab}	35.49 (1.43) ^{ab}	31.35 (1.36) ^a
MCV (fL)	43.17 (0.48) ^a	46.28 (0.69) ^b	45.56 (0.81) ^{ab}	46.35 (0.86) ^b
MCH (pg)	15.77 (0.19) ^a	15.67 (0.15) ^a	14.54 (0.64) ^a	15.79 (0.15) ^a
MCHC (g/dL)	36.57 (0.85) ^b	33.91 (0.37) ^{ab}	32.09 (1.64) ^a	34.12 (0.38) ^{ab}
RDW	13.42 (0.13) ^a	16.53 (0.44) ^b	15.97 (0.34) ^b	15.90 (0.52) ^b

Grupo control sano (CT-); grupo control CCR (CT+) grupo desarrollo de CCR e intervención nutricional (NT); grupo desarrollo de CCR e intervención nutricional combinada con protocolo de ejercicio físico (NT+Ex). Resultados expresados como la media más error estándar de la media de 15 animales. Medias con diferente letra (a, b, c) representan valores estadísticamente distintos (ANOVA $p < 0.05$)

4.2.3.3 Peso órganos

El efecto que tiene la inducción y desarrollo del tumor sobre el tamaño de los distintos órganos analizados se muestra en la **Tabla 48**. Se observó un incremento significativo en el tamaño del colon y del bazo en los ratones que han desarrollado el tumor y, aunque no de forma significativa, también mostró un mayor tamaño el hígado. El tamaño del colon se redujo con las distintas intervenciones, aunque no se igualó al tamaño de los ratones sanos.

Tabla 48. Efecto del desarrollo del tumor y de las intervenciones nutricionales o de ejercicio físico sobre el peso, en gramos, de los órganos analizados.

	CT -	CT+	NT	NT+Ex
Hígado	0.798 (0.026) ^a	0.863 (0.026) ^{ab}	0.868 (0.014) ^{ab}	0.886 (0.017) ^b
Colon	0.119 (0.015) ^a	0.338 (0.031) ^c	0.248 (0.022) ^b	0.262 (0.009) ^{bc}
Riñones	0.108 (0.002) ^a	0.109 (0.002) ^a	0.113 (0.002) ^a	0.109 (0.002) ^a
Corazón	0.113 (0.002) ^a	0.105 (0.002) ^a	0.109 (0.002) ^a	0.107 (0.003) ^a
Bazo	0.071 (0.001) ^a	0.165 (0.017) ^b	0.132 (0.009) ^b	0.150 (0.016) ^b
Plantaris	0.013 (0.000) ^a	0.012 (0.001) ^a	0.013 (0.000) ^a	0.013 (0.000) ^a
Ciego	0.096 (0.005) ^a	0.103 (0.004) ^a	0.099 (0.002) ^a	0.096 (0.004) ^a
Gastrocnemius	0.095 (0.003) ^a	0.095 (0.002) ^a	0.103 (0.002) ^a	0.105 (0.003) ^a

Grupo control sano (CT-); grupo control CCR (CT+); grupo desarrollo de CCR e ingesta de nutraceutico (NT); grupo desarrollo de CCR e ingesta de nutraceutico combinado con protocolo de ejercicio físico (NT+Ex). Resultados expresados como la media más error estándar de la media de 15 animales. Medias con diferente letra (a, b, c) representan valores estadísticamente distintos (ANOVA $p < 0.05$)

4.2.3.4 Análisis colon

4.2.3.4.1 Longitud

En la **Figura 49** se muestra el efecto que produjo el desarrollo del tumor sobre la longitud colon de los animales. El desarrollo del tumor produjo un acortamiento en la longitud del colon, así como un engrosamiento de su pared. Los animales que además de desarrollar el tumor, han recibido la intervención nutricional son los que mostraron una longitud más parecida al grupo control sano (6.28 ± 0.15 vs. 6.88 ± 0.18 cm).

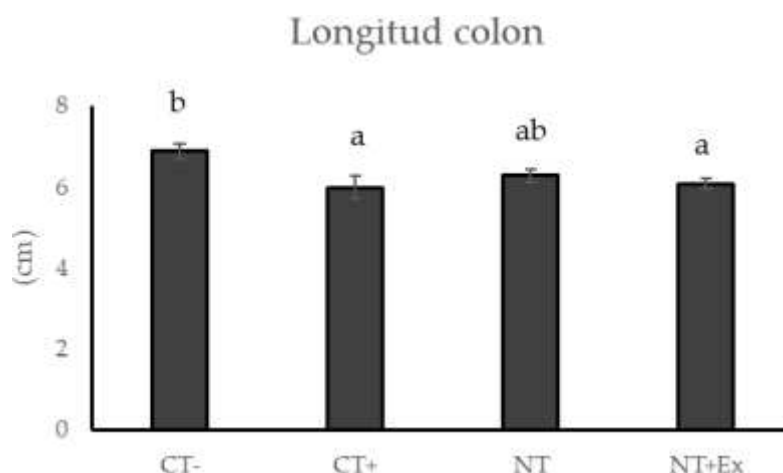


Figura 49. Efecto del desarrollo del tumor y de la intervención nutricional, sola o en combinación con un programa de ejercicio, sobre la longitud del colon. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de 15 animales. Medias con diferente letra (a, b) representan valores estadísticamente distintos (ANOVA $p < 0.05$)

4.2.3.4.2 Número de pólipos y área tumoral

El efecto de la intervención nutricional, sola o en combinación con el protocolo de ejercicio físico sobre el número de pólipos desarrollados y el área que ocupan dichos pólipos se muestra en la **Figura 50**. La inducción del tumor supuso un desarrollo de pólipos en el grupo control positivo del $24.3 \pm 2.9\%$ del área total del colon. En el grupo que se aplicó la intervención nutricional los pólipos fueron significativamente más pequeños ocupando el $11.2 \pm 1.0\%$ del área total, y aunque no de forma significativa, el área que ocupaba el tumor se vio reducida a $9.1 \pm 0.8\%$ cuando el nutracéutico se combina con el protocolo de ejercicio físico. En cuanto al número de pólipos, el grupo control positivo presentó una media de 5.45 ± 0.52 pólipos, mientras que el grupo que ingirió el nutracéutico lo redujo significativamente a 3.73 ± 0.38 y el que realizó además ejercicio físico a 2.60 ± 0.31 .

Es decir, en los grupos de tratamiento aparecían pólipos, pero en menor número y tamaño. En concreto, la intervención nutricional redujo el número de pólipos en un 31.6% y su desarrollo en un 53.9%. Cuando la intervención nutricional se combina con un protocolo de ejercicio físico estos parámetros bajan a un 52.3% y un 62.6%, respectivamente.

Características tumorales

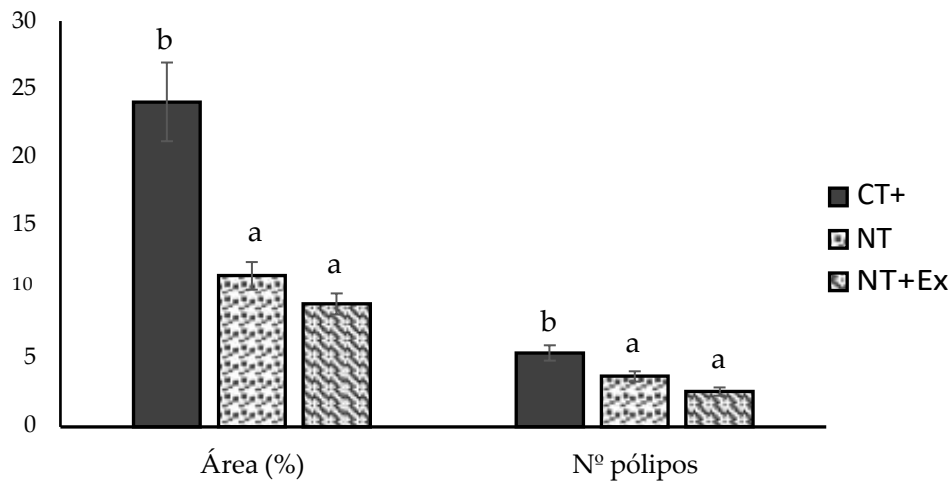


Figura 50. Efecto de la intervención nutricional, sola o en combinación con el protocolo de ejercicio físico sobre el área y el número de pólipos. Resultados expresados como la media más error estándar de la media de 15 animales. Medias con distinta letra (a, b) representan diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$).

4.2.3.5 Análisis histológico

4.2.3.5.1 Hematoxilina-Eosina

En el corte histológico del colon se podían observar las cuatro capas clásicas (**Figura 51**). De interior a exterior tenemos:

- Mucosa (M) compuesta de glándulas y tejido conectivo entre ellas. Donde encontramos las glándulas formando criptas.
- Capa submucosa (sm) subyacente compuesta de tejido conectivo.
- Capa muscular (m) con dos tipos de fibras, circular en el interior y longitudinal en el exterior.
- Tejido conectivo (c) laxo externo.

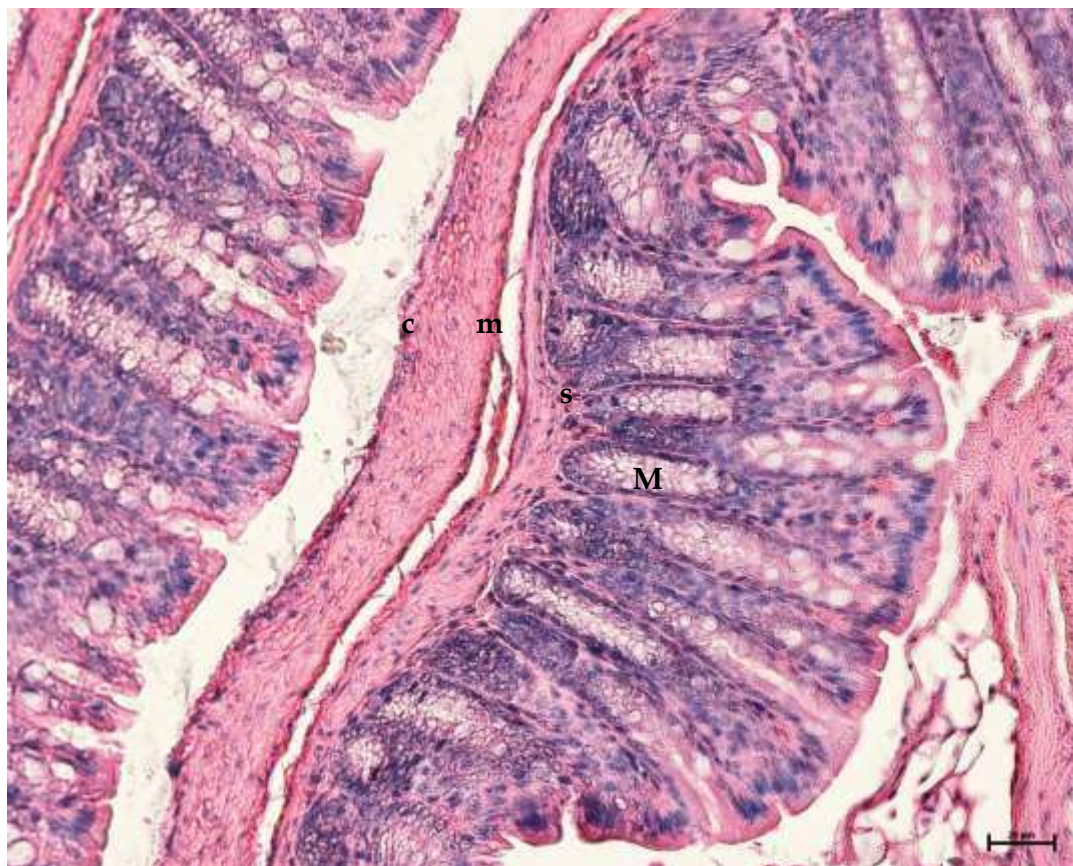


Figura 51. Identificación de las distintas capas encontradas en un corte histológico de colon.

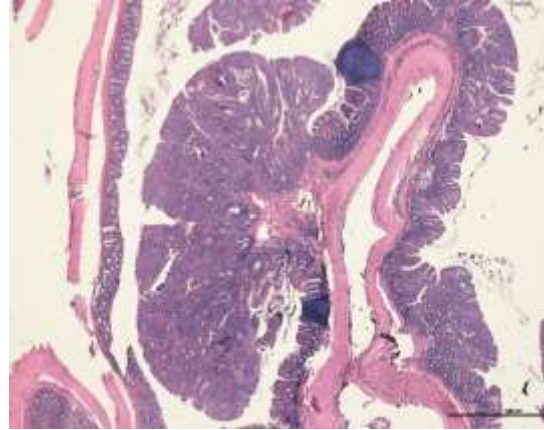
En la **Figura 52** se muestra el corte histológico del colon de cada grupo experimental a 2X. Con este aumento ya se podían observar diferencias entre los grupos. En el grupo control sano (CT-) se conserva la estructura celular y sin embargo en el grupo control positivo se observó que aparecían engrosamientos en las vellosidades, que pierden completamente la organización celular. En los grupos que fueron tratados con la intervención nutricional o el ejercicio físico, se observó una pared y vellosidades más engrosadas, pero significativamente inferior a las del grupo que no ha sido intervenido.

COLON (2x)

CT-



CT+



NT



NT+Ex

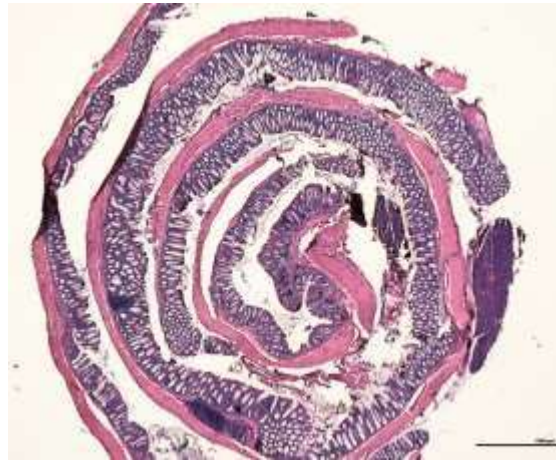


Figura 52. Corte histológico del colon de cada grupo experimental (2X)

En el resto de los órganos analizados, no se observaron diferencias en la morfología de los distintos órganos entre los grupos. Lo que quiere decir que el nutracéuticos no generó ningún tipo de toxicidad, y además que el tumor se desarrolló sólo en el colon, es decir, se consiguió una inducción localizada.

En el hígado (**Figura 53**) se observaron las células hepáticas o hepatocitos con un núcleo grande y esférico ocupando el centro de las mismas. Las células de Kupffer o macrófagos se identificaron con el núcleo más alargado. Las zonas en blanco corresponden con vasos sanguíneos.

HÍGADO (10x)

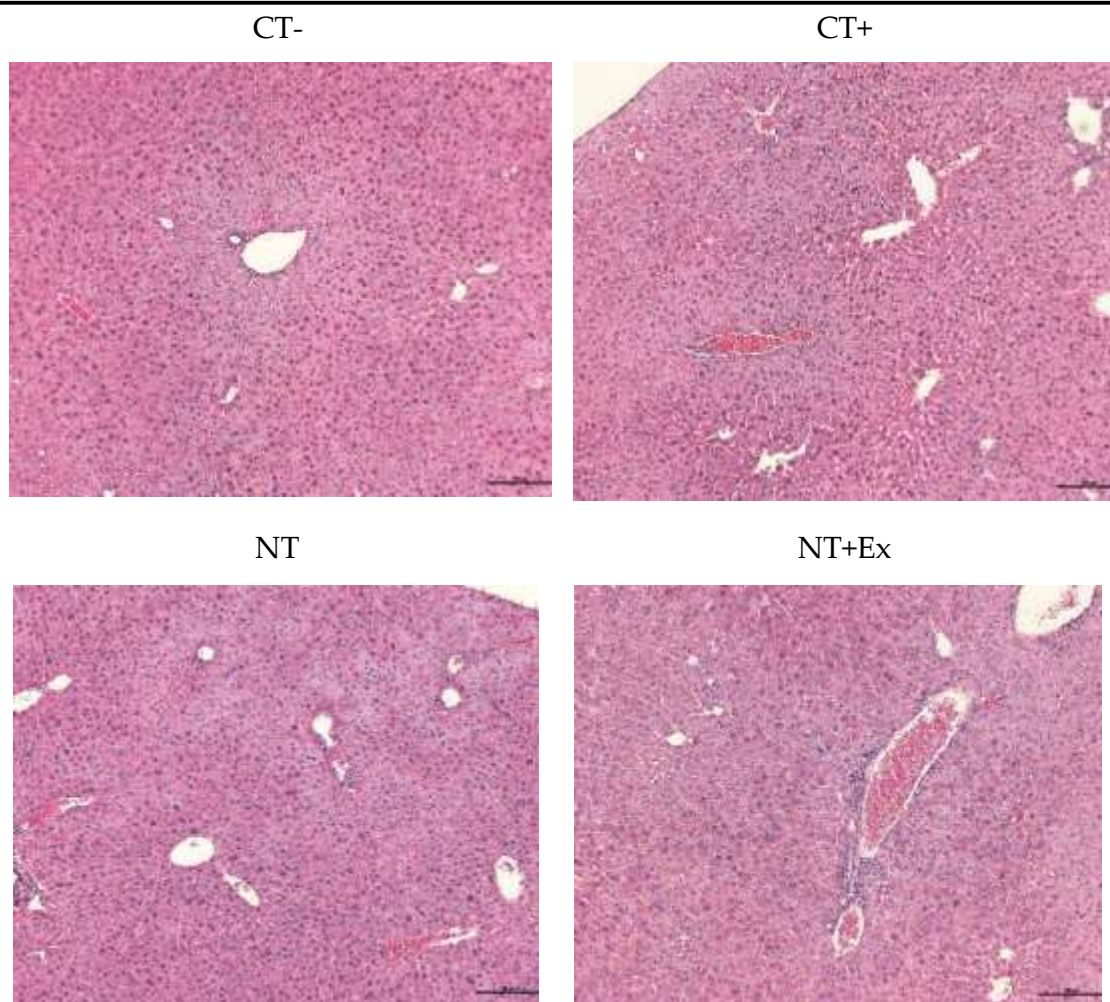


Figura 53. Corte histológico del hígado de cada grupo experimental (10X)

En los cortes histológico del corazón se muestra el miocardio con fibras musculares cardíacas, alargadas y con núcleo circular. No se encuentran diferencias histológicas entre los distintos grupos experimentales (**Figura 54**).

CORAZÓN (10x)

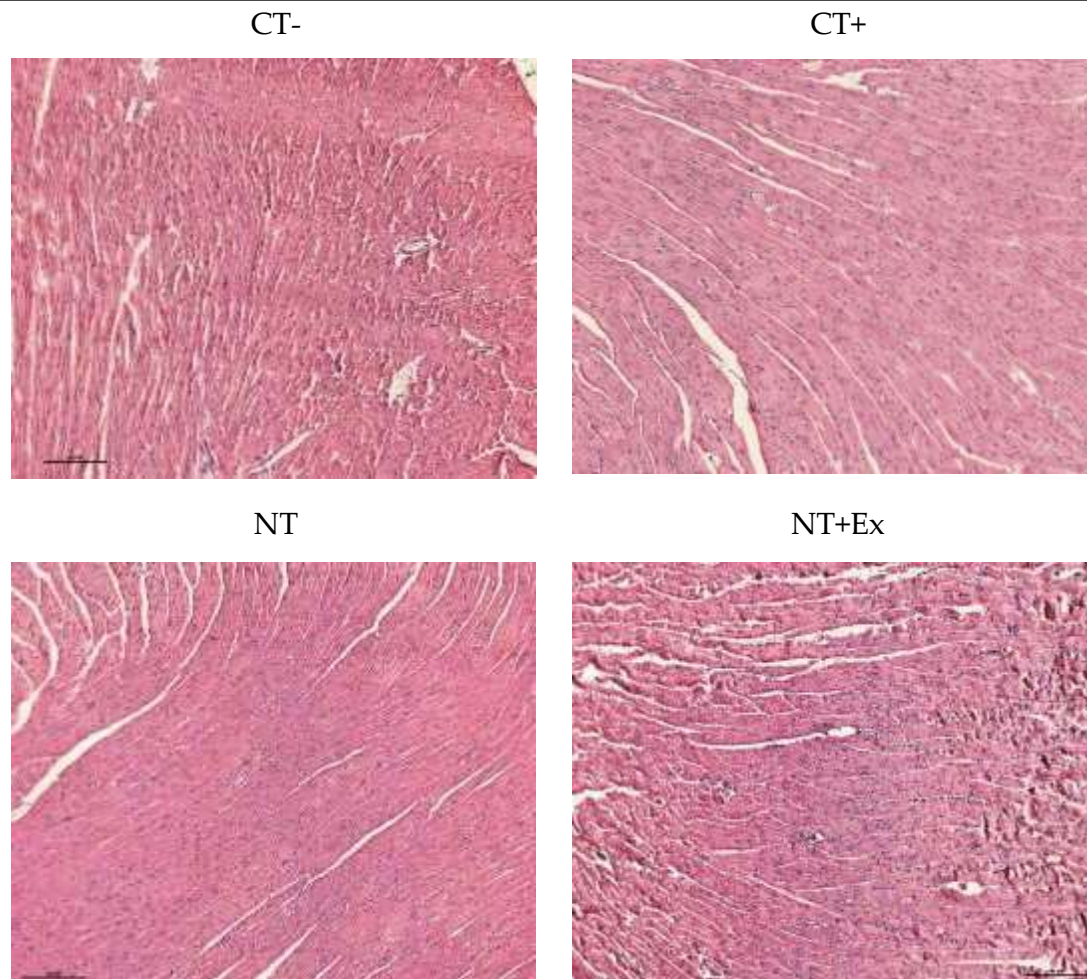


Figura 54. Corte histológico del corazón de cada grupo experimental (10X)

En el riñón se observó una histología normal en todos los grupos animales (**Figura 55**). En la imagen observamos la parte exterior o corteza dónde aparecen los glomérulos en el tejido cortical. Los glomérulos están rodeados de estructuras tubulares (túbulos proximales o distales, con un espacio blanco entre ellos). Los glomérulos presentaban el área de unión a los vasos sanguíneos. Dentro de los glomérulos podemos encontrar tres tipos distintos de células, pero no son observables a esta amplitud.

RIÑÓN (10x)

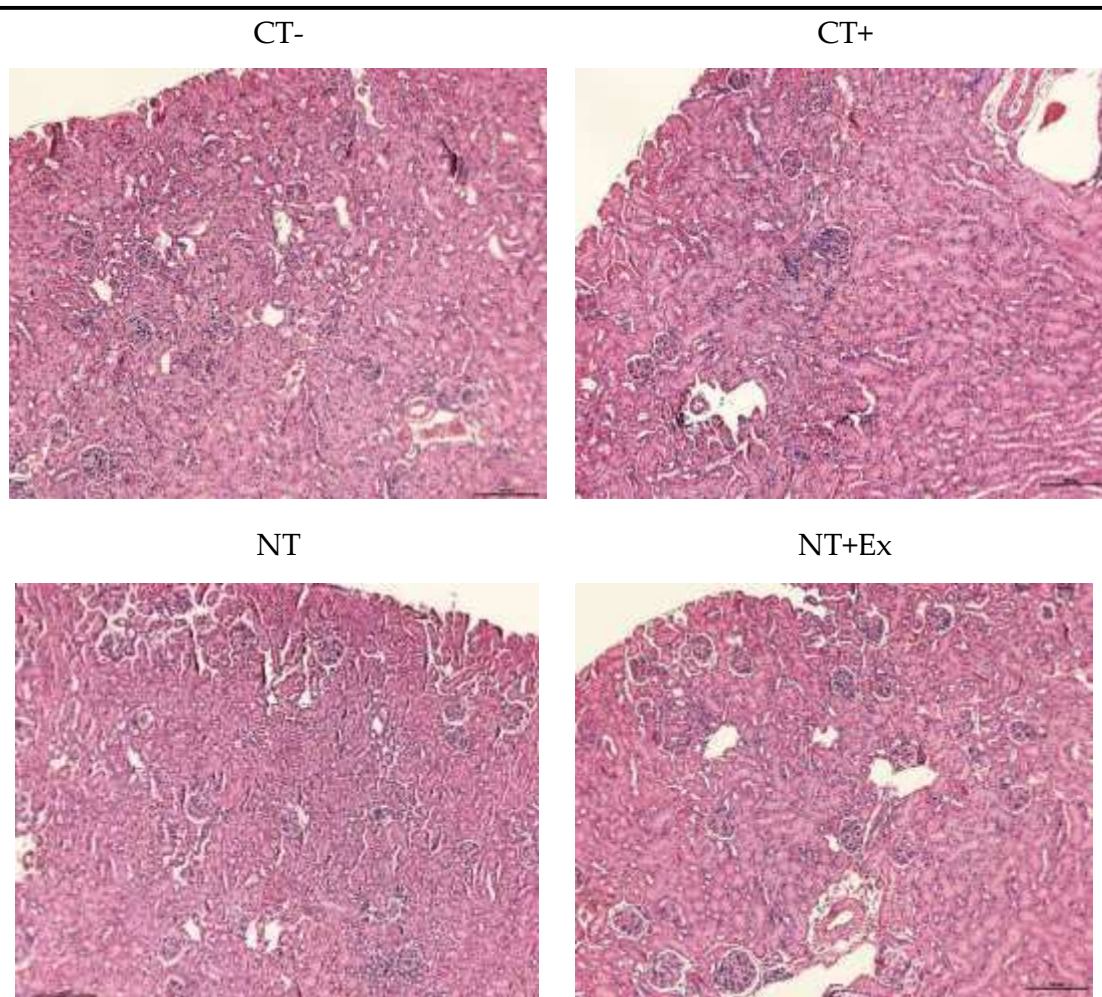


Figura 55. Corte histológico del riñón de los distintos grupos experimentales (10X)

Los cortes histológicos del bazo de los distintos grupos experimentales se observan en la **Figura 56**. El bazo es un órgano macizo rodeado de una capsula fibromuscular formada por fibroblastos y colágeno, pueden aparecer extensiones hacia el interior de este tejido conectivo. En el bazo podemos diferenciar entre la pulpa roja (formadas por sinusoides y cordones esplénicos o cordones de Billroth) y pulpa blanca, zona morada formado por folículos linfáticos y una arteriola. A veces aparece una zona central más morada conocida como centro germinal que indica que el corpúsculo está activo. En el bazo de los ratones del grupo CT+ se observa una total desorganización entre la pulpa blanca y pulpa roja, efecto que se ve revertido en las distintas intervenciones.

BAZO (10x)

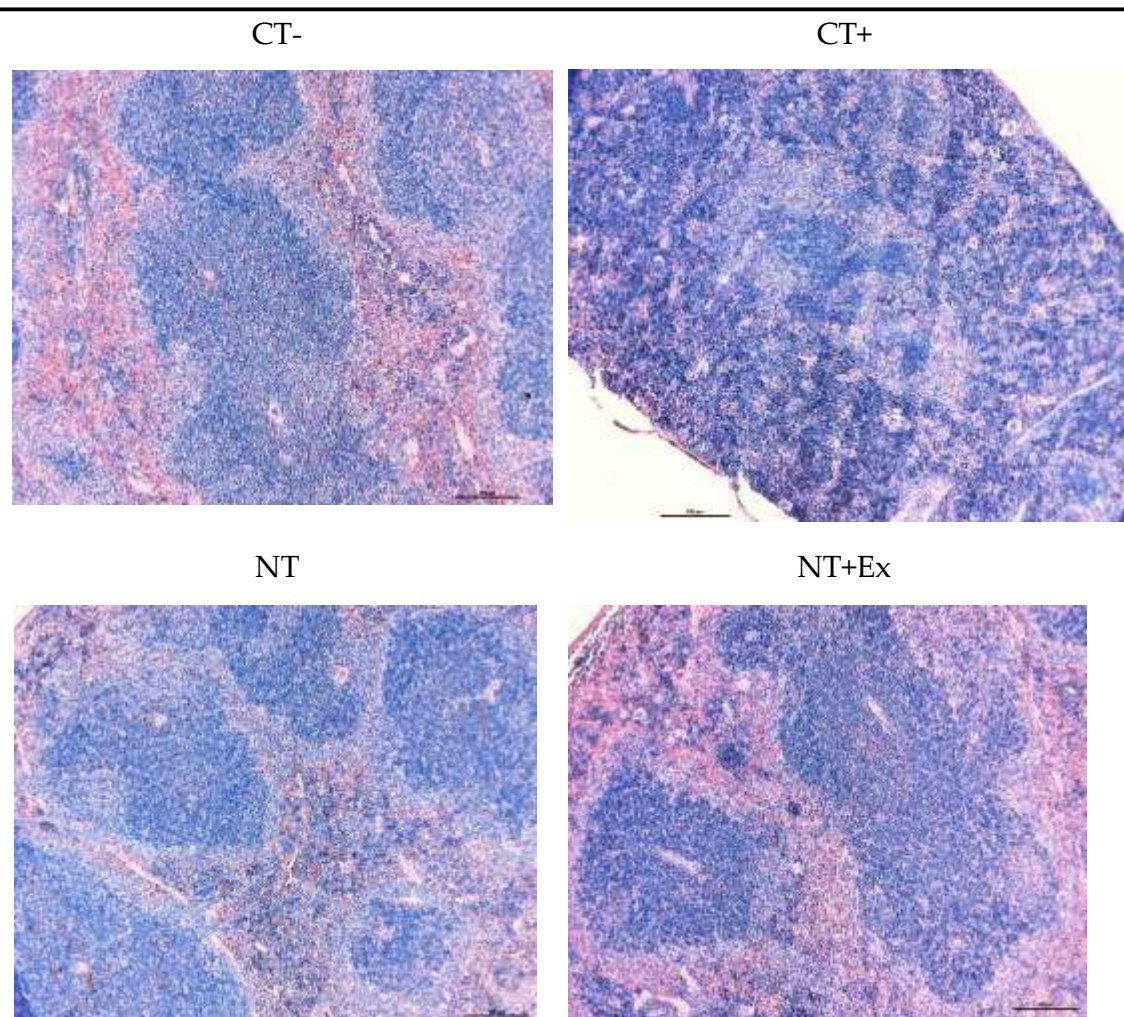


Figura 56. Corte histológico del bazo de los distintos animales experimentales (10X)

El análisis histológico de los pulmones distintos grupos experimentales se observan en la **Figura 57**. En todos se observa un patrón normal con multitud de cavidades aéreas rodeadas de epitelio simple que corresponden a los alveolos que se abren en lagunas alveolares de mayor tamaño. También se encuentran multitud de vasos sanguíneos ya que es un tejido altamente irrigado. Los espacios aéreos más grandes corresponden a bronquiolo si no tiene cartílago rodeándolo, y bronquios los que sí lo presentan.

PULMONES (10x)

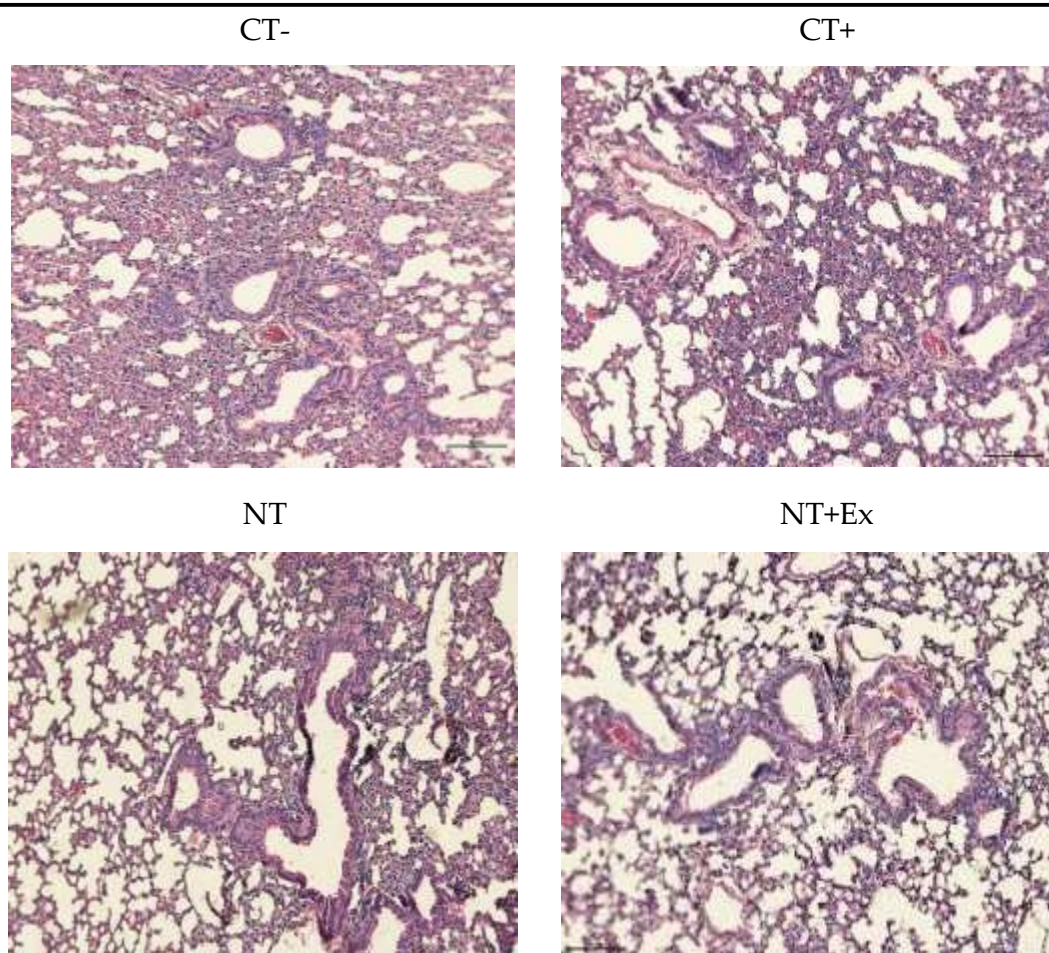


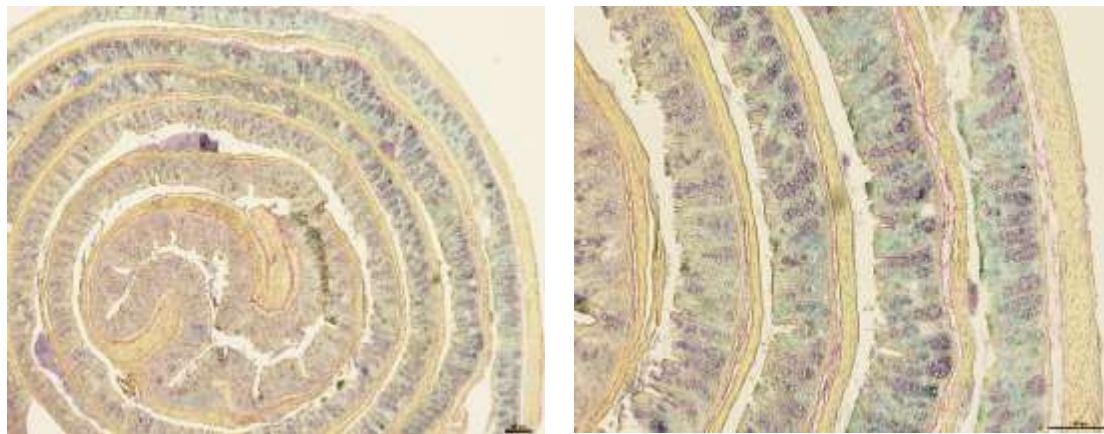
Figura 57. Corte histológico de los pulmones de cada grupo experimental (10X)

4.2.3.5.2 Método pentacrómico

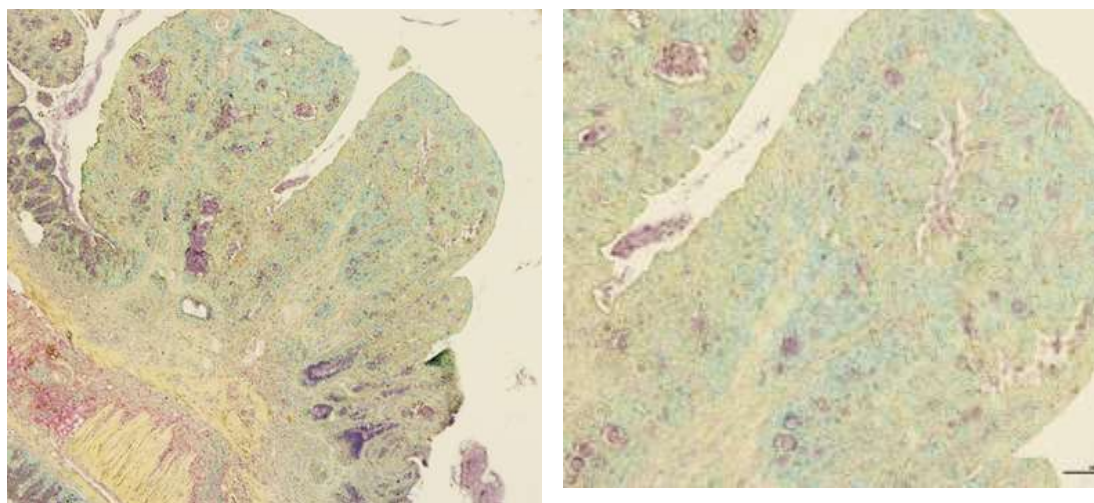
El colon se analizó por el método pentacrómico para poder entrar en detalle en la morfología del tumor (**Figura 58**). Con esta técnica se pudo diferenciar en amarillo los eritrocitos, en violeta los mucopolisacáridos sulfatados, en verde los linfocitos, en rojo el colágeno y en naranja el músculo.

En la estructura del colon, pudimos observar en los ratones control (CT-) una mucosa uniforme, con su arquitectura colonial con glándulas bien delimitadas y una fina capa muscular inferior. Sin embargo, cuando observamos a más amplitud las protuberancias que encontramos en el colon del grupo CT+ hay una distribución irregular, sin submucosa. También se observó una reacción inflamatoria con la presencia de folículos linfáticos en la submucosa. Sin embargo, cuando analizamos los tumores encontrados en los grupos que han sido intervenidos nutricionalmente o con el protocolo de ejercicio físico, conservaron en mayor medida la estructura de la mucosa, sobre todo en la parte más basal, así como la capa submuscular adyacente.

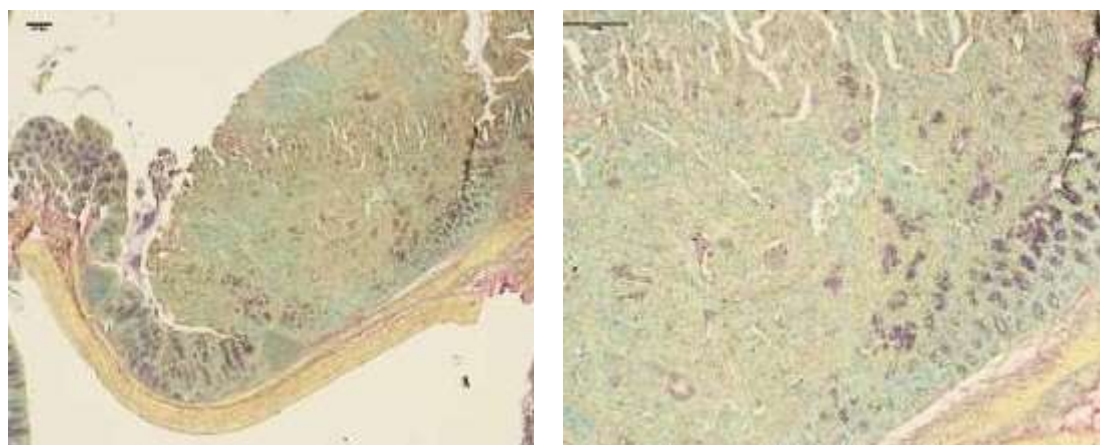
COLON CT-



COLON CT+



COLON NT



COLON NT+Ex

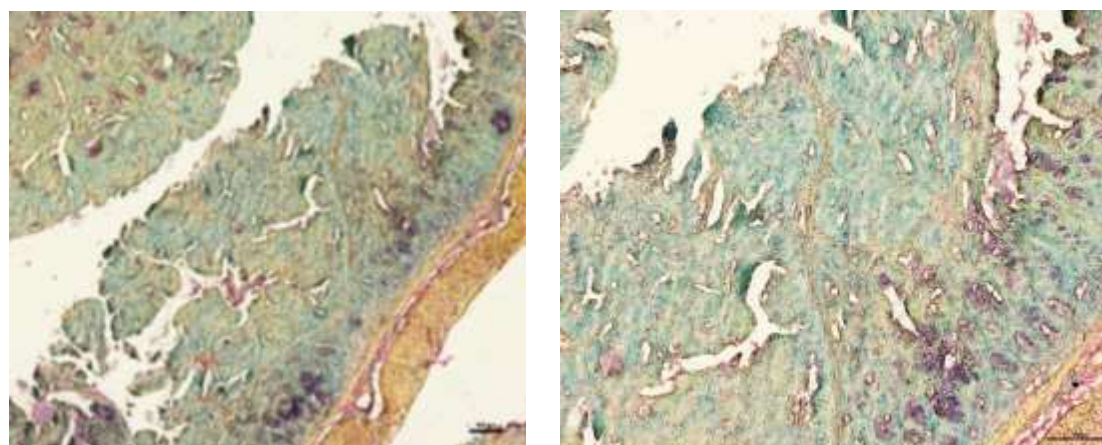


Figura 58. Corte histológico del colon de cada grupo experimental a 4X (izquierda) y 10X (derecha), teñido con el método pentacrómico.

4.2.3.6 Expresión génica

La expresión génica de factores de enzimas antioxidantes o detoxificantes y de biomarcadores inflamatorios y progresión del tumor en el colon de los ratones se muestra en la **Tabla 49**. El desarrollo del tumor supuso una disminución en la expresión de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa mitocondrial (SODm), efecto que fue revertido en los grupos que ingirieron el nutraceutico equiparando la expresión a los del grupo sin tumor (CT-). No ocurrió lo mismo para la catalasa (*Cat*), cuya expresión fue significativamente inferior en el grupo que ingirió nutraceutico y realizó ejercicio físico. La enzima quinona reductasa (*Nqo1*) implicada en la detoxificación celular se vio incrementada en los grupos que ingirieron el nutraceutico en la dieta, mientras que la expresión de glutatión s-transferasa (*Gsta1*) fue significativamente reducida en todos los grupos que han desarrollado tumor.

La expresión de biomarcadores relacionados con la actividad inflamatoria estuvo influenciada por el desarrollo del tumor. En concreto, la expresión de *IL-1 β* incrementó en todos los grupos que han generado tumor, sin embargo, la expresión de *IL-6* se ve reducida. El grupo que ingirió el nutraceutico combinado con un protocolo de ejercicio físico mostró valores significativamente inferiores para *IL-6*, y aunque no de forma significativa el incremento en la expresión de *IL-1 β* es menos pronunciada y se asemeja más a los valores del grupo CT-.

La expresión de *Cadm1* y *Cdc42* no mostró diferencias significativas con el desarrollo del tumor, sin embargo, su expresión se redujo en los animales que han ingerido el nutraceutico, combinado o no, con el protocolo de ejercicio físico. El desarrollo del tumor incrementó la expresión de *Pik3cd* y *Slc20a1* con respecto al control sano, parámetros que fueron revertidos con las distintas intervenciones realizadas, y de forma más pronunciada en el grupo que combina ambas intervenciones (NT+Ex).

Tabla 49. Expresión génica en el colon

	CT-	CT+	NT	NT+Ex
<i>Cat</i>	1.00 (0.18) ^b	0.77 (0.08) ^{ab}	0.93 (0.04) ^{ab}	0.75 (0.04) ^a
<i>Gpx2</i>	1.00 (0.12) ^b	0.64 (0.08) ^a	1.21 (0.09) ^b	1.05 (0.04) ^b
<i>Sod1</i>	1.00 (0.16) ^c	0.38 (0.05) ^a	0.86 (0.06) ^{bc}	0.72 (0.03) ^b
<i>Nqo1</i>	1.00 (0.18) ^a	0.79 (0.14) ^a	2.36 (0.11) ^b	2.23 (0.11) ^b
<i>Gsta1</i>	1.00 (0.14) ^c	0.65 (0.08) ^b	0.72 (0.08) ^b	0.27 (0.02) ^a
<i>Cadm1</i>	1.00 (0.16) ^b	1.00 (0.14) ^b	0.75 (0.03) ^a	0.67 (0.03) ^a
<i>Cdc42</i>	1.00 (0.15) ^b	1.23 (0.23) ^b	0.64 (0.04) ^a	0.55 (0.01) ^a
<i>IL-1β</i>	1.00 (0.11) ^a	1.73 (0.17) ^b	1.56 (0.18) ^b	1.29 (0.09) ^{ab}
<i>IL-6</i>	1.00 (0.21) ^c	0.54 (0.09) ^b	0.39 (0.03) ^{ab}	0.18 (0.01) ^a
<i>Pik3cd</i>	1.00 (0.09) ^b	2.64 (0.28) ^c	0.70 (0.07) ^{ab}	0.52 (0.04) ^a
<i>Slc20</i>	1.00 (0.09) ^a	4.49 (0.40) ^b	0.97 (0.08) ^a	0.70 (0.03) ^a

Los datos se expresan en términos relativos frente a la expresión de la β -actina. Los resultados son medias \pm error estándar medio de ocho animales. Las medias con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$).

La expresión de biomarcadores relacionados con la evolución del tumor y estado inflamatorio en el músculo se muestra en la **Tabla 50**. La inducción del tumor en el colon produjo una disminución en la expresión de *tnfa* y *pten*, este último fue revertido a valores normales con las intervenciones nutricionales y de ejercicio físico. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos para la expresión de *Igf1* e *IL6*, mientras que la expresión de *IL 1 β* se vio reducida en los grupos de tratamientos (NT y NT+Ex) incluso por debajo del grupo sano (CT-).

Tabla 50. Expresión génica músculo *plantaris*.

	CT-	CT+	NT	NT+EX
<i>Tnfa</i>	1.00 (0.01) ^d	0.70 (0.01) ^c	0.61 (0.05) ^{ab}	0.54 (0.04) ^a
<i>IL 1β</i>	1.00 (0.06) ^{bc}	1.11 (0.07) ^c	0.66 (0.04) ^a	0.85 (0.06) ^b
<i>IL6</i>	1.00 (0.05) ^a	0.88 (0.07) ^a	1.02 (0.05) ^a	0.93 (0.03) ^a
<i>Pten</i>	1.00 (0.09) ^b	0.80 (0.08) ^a	1.00 (0.03) ^b	0.99 (0.03) ^b
<i>Igf1</i>	1.00 (0.03) ^a	1.04 (0.05) ^a	1.00 (0.02) ^a	1.00 (0.06) ^a

Los datos se expresan en términos relativos frente a la expresión de la β -actina. Los resultados son medias \pm error estándar medio de ocho animales. Las medias con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$).

4.2.3.7 Microbioma

La clasificación del microbioma fecal de los distintos grupos experimentales se muestra en la ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ y **Figura 59**. El desarrollo del tumor produjo un aumento significativo del filo Verrucomicrobia que no se revirtió con las intervenciones. No aparecieron más diferencias significativas relacionadas con el desarrollo del tumor, aunque si se observó una disminución de la presencia de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes y Actinobacteria en los grupos que habían desarrollado tumor y habían sido tratados con el nutracéutico mientras que se incrementaba la presencia de Bacteroidetes en el grupo que además realizaba un protocolo de ejercicio físico. La ratio Firmicutes/ Bacteroidetes se vio disminuido significativamente con la intervención nutricional, mientras que en el grupo que ha desarrollado el tumor y no se ha tratado mostraba valores superiores respecto al grupo sano, aunque no de manera significativa.

El desarrollo del cáncer colorrectal incrementó la presencia de la familia Verricomicrobiaceae y disminuyó la de Lachnospiraceae, Porphyromonadaceae. Estas dos últimas fueron revertidas a valores estándares de ratones sanos, cuando se administró el nutracéutico en la dieta y se realizó el protocolo de ejercicio físico. La presencia de la familia Lactobacillaceae fue significativamente inferior en el grupo que ingirió el nutracéutico mientras que la Erysipelotrichaceae lo hizo también en el grupo que realizaba el protocolo de ejercicio físico.

La presencia del género *Blautia* fue reducida significativamente debido al desarrollo del tumor, no obstante, se consiguió incrementar su concentración con el tratamiento de intervención nutricional, e incluso se igualó a valores de ratones sanos (CT-) cuando se combinó con el protocolo de ejercicio físico. El género *Lactobacillus* incrementó significativamente su concentración con el desarrollo del tumor, y estuvo influenciado por las distintas intervenciones nutricionales, mostrando valores similares al grupo control aquellos animales que habían sido alimentados con el nutracéutico (NT). La presencia del género *Akkermansia* fue incrementada significativamente en todos los grupos que han desarrollado el tumor.

Tabla 51. Identificación del microbioma fecal presenten en los distintos grupos experimentales.

	CT-	CT+	NT	NT + Ex
Filo				
Firmicutes	63.0 (1.2) ^b	58.0 (2.6) ^{ab}	52.6 (0.7) ^a	54.3 (2.4) ^a
Bacteroidetes	27.6 (1.4) ^a	28.0 (1.1) ^a	30.7 (1.0) ^{ab}	34.8 (0.8) ^b
Verrucomicrobia	1.95 (0.28) ^a	11.8 (0.6) ^b	11.6 (0.6) ^b	11.1 (0.3) ^b
Proteobacteria	1.67 (0.12) ^a	1.55 (0.13) ^a	1.58 (0.19) ^a	1.83 (0.20) ^a
Actinobacteria	4.23 (1.17) ^b	3.14 (0.78) ^{ab}	1.18 (0.27) ^a	1.90 (0.45) ^{ab}
Sin clasificar	0.96 (0.06) ^a	1.24 (0.15) ^{ab}	1.53 (0.08) ^b	1.03 (0.06) ^a
Ratio F/B	2.11 (0.06) ^b	2.28 (0.06) ^b	1.73 (0.07) ^a	1.58 (0.10) ^a
Familia				
<i>Lachnospiraceae</i>	33.3 (1.6) ^c	18.3 (1.5) ^a	23.8 (1.7) ^{ab}	26.9 (2.2) ^{bc}
<i>Porphyromonadaceae</i>	16.6 (1.4) ^{ab}	16.0 (0.7) ^a	16.6 (0.9) ^{ab}	19.6 (0.3) ^b
<i>Sin clasificar</i>	6.51 (0.31) ^a	7.90 (0.41) ^b	8.18 (0.20) ^b	8.06 (0.34) ^b
<i>Ruminococcaceae</i>	5.55 (0.26) ^a	5.12 (0.58) ^a	5.13 (0.63) ^a	5.41 (0.60) ^a
<i>Lactobacillaceae</i>	6.66 (0.79) ^{ab}	8.37 (0.49) ^b	5.13 (0.54) ^a	6.86 (0.68) ^{ab}
<i>Erysipelotrichaceae</i>	12.8 (1.2) ^b	12.7 (0.4) ^b	9.87 (0.28) ^a	8.37 (0.32) ^a
<i>Turicibacteraceae</i>	4.71 (0.00) ^a	6.43 (0.81) ^a	5.33 (0.57) ^a	6.46 (1.00) ^a
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	3.03 (0.00) ^a	12.8 (0.8) ^b	11.6 (0.7) ^b	11.1 (0.40) ^b
Otros	6.40 (1.30) ^a	5.93 (0.66) ^a	3.94 (0.89) ^a	5.76 (1.24) ^a
Género				
<i>Blautia</i>	24.2 (1.6) ^c	11.5 (0.9) ^a	15.9 (1.0) ^b	21.8 (0.6) ^c
<i>Sin clasificar</i>	13.6 (0.2) ^a	14.6 (0.7) ^a	15.5 (0.8) ^a	15.8 (0.9) ^a
<i>Parabacteroides</i>	8.67 (0.50) ^a	7.95 (0.50) ^a	8.83 (0.57) ^a	9.61 (0.54) ^a
<i>Dysgonomonas</i>	3.11 (0.03) ^a	3.38 (0.00) ^a	2.84 (0.0) ^a	4.11 (0.58) ^a
<i>Lactobacillus</i>	5.35 (0.57) ^a	8.63 (0.55) ^b	5.47 (0.49) ^a	6.78 (0.77) ^{ab}
<i>Ruminococcus</i>	4.07 (0.18) ^a	4.40 (0.49) ^a	3.83 (0.38) ^a	5.27 (0.76) ^a
<i>Allobaculum</i>	11.6 (1.5) ^a	12.6 (0.5) ^a	10.9 (1.0) ^a	8.3 (0.5) ^a
<i>Akkermansia</i>	2.94 (0.00) ^a	12.4 (0.9) ^b	11.2 (0.7) ^b	10.8 (0.6) ^b
Otros	6.44 (2.03) ^a	10.4 (2.6) ^a	5.26 (0.85) ^a	7.50 (1.01) ^a

Los resultados son medias \pm error estándar medio de ocho animales. Las medias con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$).

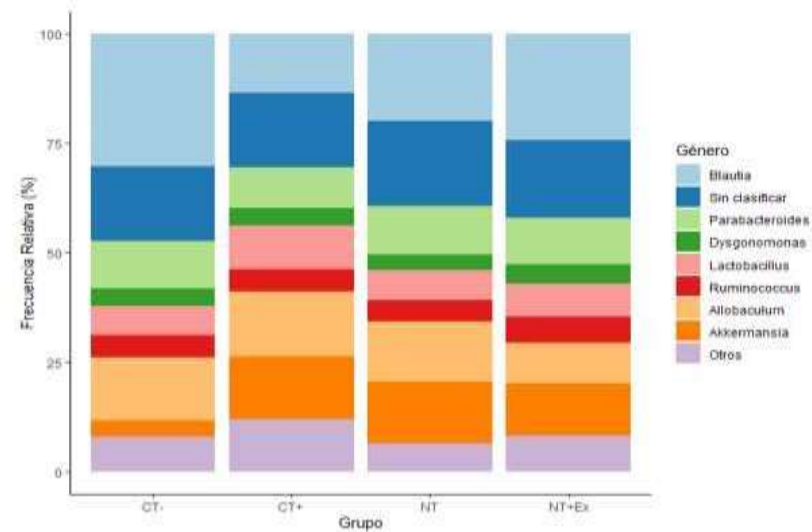
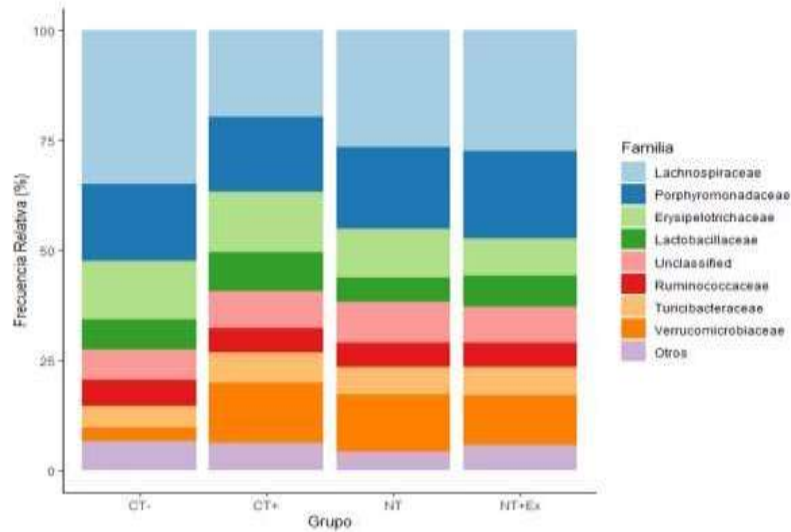
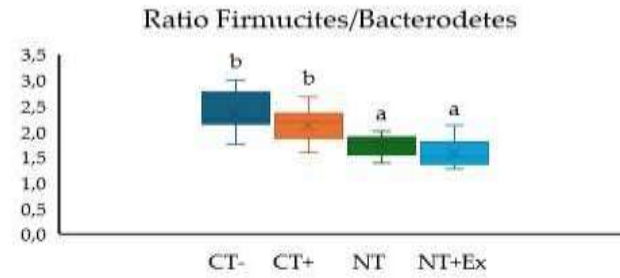
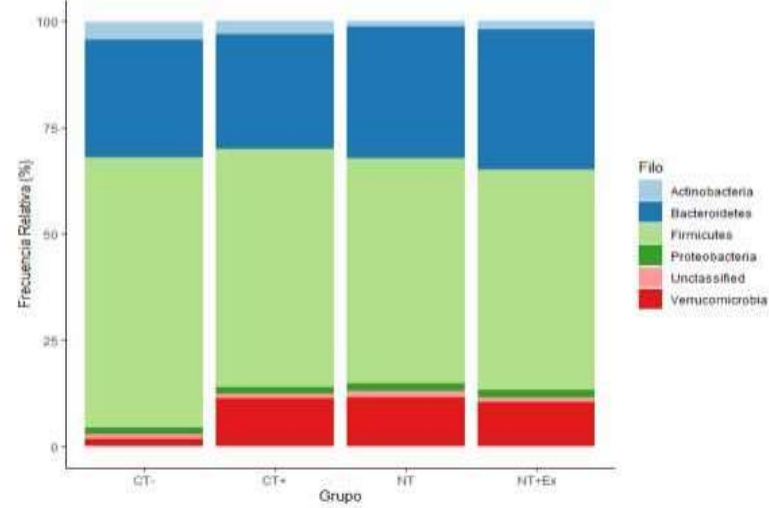


Figura 59. Representación del microbioma fecal presenten en los distintos grupos experimentales.

5 DISCUSIÓN

5.1 ENSAYO EN MODELO DE OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad que provoca trastornos metabólicos como hiperlipidemia, RI, desarrollo de NAFLD, alteración del metabolismo oxidativo y otras alteraciones como disbiosis, afectaciones renales y alteraciones osteomusculares. Debido a que los principales factores que desencadenan el desarrollo de la obesidad están relacionados con factores ambientales como la dieta que seguimos o la actividad física que realizamos, la mejor forma de revertir o prevenir la obesidad es cambiar el estilo de vida, incluyendo la práctica de ejercicio físico y una dieta equilibrada. Además, la suplementación con compuestos bioactivos procedentes de extractos vegetales puede aumentar la eficacia de la pérdida de peso, pero sobre todo son importantes para tratar alteraciones como la RI, la NAFLD, las alteraciones del metabolismo lipídico y el metabolismo oxidativo, y consecuentemente ayudan a mejorar el estado de salud en estos sujetos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar diferentes estrategias, nutricionales y de ejercicio físico, para el tratamiento de la obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas, así como la disbiosis intestinal producida por ésta. Estas estrategias se basaron en un cambio de dieta, que proporcionó una restricción calórica, de manera aislada o combinada con la ingesta de un nutracéutico formulado a partir de diferentes extractos vegetales. Ambas intervenciones se combinaron además con un programa de ejercicio físico.

En general, las plantas son fuentes de compuestos bioactivos antioxidantes que pueden utilizarse para el tratamiento de las alteraciones producidas por el desarrollo de la obesidad. Entre todas las especies vegetales estudiadas en esta tesis y sobre las que se realizó un cribado, cuatro de ellas destacaron por su elevada capacidad antioxidante y alto rendimiento de extracción. Estas se seleccionaron para desarrollar un nutracéutico y ensayarlo en un modelo experimental animal de

obesidad inducida por la dieta para tratar los diferentes trastornos metabólicos que el desarrollo de esta patología produjo.

Los extractos etanólicos de la pulpa de *Argania spinosa* mostraron la mayor capacidad antioxidante y rendimiento de extracción. Estudios previos de nuestro grupo de investigación, demostraron que el extracto etanólico de la pulpa de argán contenía diversos compuestos bioactivos, con diversas funcionalidades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorios, hipolipemiantes, hipoglucémicos y antiobesidad [176]. En este mismo trabajo se ensayaron los efectos que el consumo de un liofilizado de la pulpa de argán tenía sobre el metabolismo glucídico, lipídico, el estado redox y estado de inflamación en un modelo experimental animal de ratón, sin embargo, no disponíamos de información sobre los efectos fisiológicos que la administración del extracto etanólico derivado de la pulpa de argán, donde se concentraban los compuestos bioactivos, podría tener en un modelo experimental de obesidad. Por lo tanto, este extracto se seleccionó para formar parte de la composición final del nutraceutico. El extracto de semilla de *Camelina sativa* mostró un buen rendimiento de extracción, buena capacidad para inhibir la formación de radicales ABTS, así como para quelar hierro. En este extracto se identificaron distintos compuestos como blumeósido C, 6-deoxyjacareubina, volkensiflavona A y acevaltrato, a los que se les atribuye esa capacidad antioxidante que mostró en las distintas pruebas químicas [177–181]. En relación con las semillas de la leguminosa *Psoralea corylifolia*, los resultados de rendimiento y capacidad antioxidante determinada en base a su contenido en polifenoles totales, así como su capacidad para inhibir la formación de radicales de ABTS, fueron de las mayores obtenidas en el screening inicial. Esto pudo atribuirse a la presencia de compuestos como el ácido cafeico 3-o-glucuronido, hidnocarpina, rhein, glabranina, faseolina y 4'-o-metilglabridin que han demostrado capacidad antioxidante en distintas pruebas químicas [182–187]. Además, otros autores han estudiado ampliamente esta semilla y han identificado distintos compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, como la corilisoflavona A, el isopsoraleno, el bakuchiol y la bavachinina [188]. Con respecto a *Spirodella polyrhiza*, una especie de planta acuática de la familia Lemnáceas fue seleccionada para su

inclusión en el nutracéutico por su alto rendimiento de extracción, y su alto contenido en polifenoles totales, así como una buena capacidad de inhibir la peroxidación lipídica. Esta capacidad antioxidante se atribuyó a la presencia de compuestos bioactivos como vitexina y mirislignano [189,190]. Otros autores han atribuido su capacidad antioxidante a moléculas derivadas del ácido clorogénico, la apigenina y la luteonina [191]. Por otra parte, cabe destacar que tanto las semillas de la leguminosa *P. corylifolia* como la planta *S. polyrhiza*, fueron sometidos a un proceso de hidrólisis proteico ya que tenían un alto contenido proteico, y algunos estudios han demostrado que los hidrolizados proteicos, concretamente hidrolizados proteicos provenientes de otras leguminosas como *Phaseolus vulgaris* L. y *Lens culinaris* fueron capaces de inhibir distintos marcadores de inflamación y estrés oxidativo [192,193]. Por tanto, los hidrolizados proteicos de la leguminosa *P. corylifolia* y de *S. polyrhiza* fueron seleccionados también para completar la formulación del nutracéutico.

Tras la selección de las especies vegetales para la formulación del nutracéutico, se prepararon los extractos etanólicos y los hidrolizados proteicos de estas especies para proceder a su mezcla y liofilización para obtener un total de 40 gramos de nutracéutico en polvo para añadirse a la dieta experimental de los animales y llevar a cabo el ensayo *in vivo*. Parte del nutracéutico se utilizó para llevar a cabo las distintas pruebas de capacidad antioxidante mediante pruebas químicas y ensayos en cultivos celulares para determinar su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Además, el nutracéutico fue sometido a una digestión *in vitro* para comprobar si los componentes del mismo eran potencialmente absorbibles y podían ejercer efectos beneficiosos a nivel sistémico [194]. Con respecto a las pruebas químicas de capacidad antioxidante, y teniendo en cuenta la proporción en la que cada uno de los compuestos se añadió para la formulación del nutracéutico (10 partes del extracto etanólico de la pulpa de argán, 10 partes del extracto etanólico de semilla de *C. Sativa*, 40 partes del hidrolizado proteico de *P. corylifolia* y 40 partes del hidrolizado proteico de *S. polyrhiza*), podemos decir que hubo un efecto sinérgico de los compuestos presentes en la mezcla que produjo un aumento en todas las pruebas de capacidad

antioxidante que se llevaron a cabo. Diversos autores han propuesto que la mayoría de los efectos antioxidantes, anticancerígenos o antiinflamatorios de frutas y vegetales se atribuyen a la mezcla de compuestos fitoquímicos presentes en ellos y no a la acción de compuestos aislados [195,196]. El proceso de digestibilidad *in vitro* al que se sometió el nutraceutico, demostró que éste era dializable hasta en un 86%, lo que quiere decir que su potencial para ser absorbido después de someterse a un proceso de digestión fue muy alto. Además, la capacidad antioxidante del mismo también se mantuvo después de someterse a este proceso, ya que se encontró una mayor actividad antioxidante en los dializados y retenidos del compuesto funcional en comparación con el blanco de la prueba. Por tanto, podemos decir que la bioactividad de los compuestos es potencialmente absorbible lo que podría dar lugar a un efecto a nivel sistémico. No obstante, también se encontró una alta capacidad antioxidante en los retenidos, lo que nos indicó que parte de los compuestos bioactivos podrían ejercer su función a nivel local en el colon.

El nutraceutico fue capaz de mantener la capacidad antioxidante de sus componentes en las distintas pruebas químicas, además mostró una alta capacidad para prevenir el daño oxidativo causado por el agente oxidante paraquat en la línea celular HT-29, así como en la prevención del daño inflamatorio que produce el LPS en la línea celular de macrófagos J774A.1. Este efecto se atribuye principalmente a los compuestos bioactivos que componen el nutraceutico con capacidad antioxidante que han sido mencionados con anterioridad y además se han identificado otras moléculas con capacidad antiinflamatoria como picrósido II [197], rosmanol [198], xantoangelol [199], murpanicina [200] apigenina y luteonina [191].

Bajo esta premisa, el nutraceutico pasó a ensayarse en un modelo experimental animal de obesidad inducida por la dieta para estudiar el efecto del consumo del nutraceutico sobre esta patología.

Ensayos *in vivo*

Peso e ingesta de los animales

En relación con los experimentos *in vivo* realizados, para este ensayo se seleccionó un modelo experimental de ratón C57BL/6J ya que esta cepa es más susceptible a la ganancia de peso y al desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas, a través de una dieta obesogénica [201,202]. El período experimental fue de 17 semanas, en el que la primera semana fue de adaptación para los animales tanto a la dieta como al tapiz rodante y a las condiciones del nuevo alojamiento. Para la generación de la obesidad inducida por la dieta, a los animales de experimentación se les administró una dieta alta en grasa (46% de las Kcal) y fructosa en el agua de bebida al 20%, ya que se ha descrito que esta intervención es eficaz para inducir la obesidad en este modelo experimental de ratón C57BL/6J, de acuerdo con lo reportado por Shen et al. [203]. Bajo nuestras condiciones experimentales, pudimos observar que la obesidad se estableció a partir de la tercera semana del periodo experimental, cuando la diferencia de peso corporal entre los animales delgados alimentados con dieta estándar (SD) y los animales alimentados con la dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida (HFHF) fue igual o superior a 2 desviaciones estándar, siendo un punto de acuerdo en la comunidad científica para el desarrollo de modelos de obesidad en modelos de roedores [204]. Para establecer no solo la obesidad, sino también las alteraciones asociadas metabólicas, inflamatorias, de estrés oxidativo y disbiosis, la administración de la dieta obesogénica y la fructosa en el agua de bebida continuó hasta un total de 8 semanas. A partir de las 8 semanas, los animales se sometieron a una restricción calórica cambiando de dieta HFHF a dieta estándar normocalórica (SD), y aplicando un *pair fed* con 3 g de dieta/día/ratón. Además, se les administró el nutraceutico y realizaron el protocolo de ejercicio físico establecido. En la **Figura 27**, se muestra la ingesta de alimento y la ingesta calórica total que los animales tuvieron durante todo el período experimental. Los animales que consumieron la dieta HFHF y la fructosa en el agua de bebida tuvieron una ingesta calórica superior a los animales que consumieron la dieta SD y por tanto el desarrollo de la obesidad fue efectivo. La restricción calórica en los grupos de animales que cambiaron de dieta HFHF a dieta SD, hizo que la ingesta calórica fuera igual a la realizada por los animales que consumieron la dieta SD durante todo el período

experimental, lo que se relacionó con el peso corporal que los animales consiguieron. Como podemos observar en la **Figura 26** el cambio de dieta de forma aislada y en combinación con la realización del protocolo de ejercicio disminuyó el peso corporal de los animales, alcanzando al final del periodo experimental el mismo peso que el grupo de animales que consumieron la dieta estándar normocalórica durante todo el período experimental (SD). Estos resultados difirieron a los encontrados por Ferrara et al. [205] donde se utilizó el modelo experimental de ratón C57BL/6N que fue alimentado con una dieta alta en grasa durante 10 semanas y posteriormente durante un período de 6 semanas los animales fueron alimentados con un pienso estándar. En este caso el cambio de dieta por sí sola no logró revertir completamente la obesidad desarrollada. Esta diferencia pudo deberse a que, a diferencia a lo realizado por Ferrara et al. [205] en nuestro diseño experimental realizamos la restricción calórica comentada anteriormente. Se ha comprobado que la restricción calórica es una modulación efectiva y simple que se utiliza como paso primario en la pérdida de peso corporal ya que tiene efectos beneficiosos en el control del peso y en la prevención de la disfunción metabólica causada por la obesidad [93]. La inclusión del nutraceutico en la dieta bajo nuestras condiciones experimentales no causó ningún efecto adicional sobre el peso corporal de los animales. Sin embargo, autores como D'Antongiovanni et al.[23] y Chavanelle et al. [91] describieron como se consiguió revertir el peso corporal de ratones C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta sólo con la administración de una suplementación basada en extractos vegetales. Concretamente con la ingesta de 107 mg por kg de peso del animal de una suplementación compuesta de *Curcuma longa*, *Cassia mimosides* y *Phyllanthus emblica* y con la inclusión del 2.5% en la dieta de una suplementación a base de hoja de olivo, arándano, alcachofa, crisantemo y pimienta negra, respectivamente. Otros autores consiguieron estos efectos cuando se combinó la suplementación de extractos vegetales con un programa de ejercicio físico. La inclusión en la dieta de un extracto etanólico de *Artemisia dracunculus* al 1% junto con libre acceso a una rueda para realizar ejercicio físico supuso una reducción del peso corporal de ratones C57BL/6J debido a que el efecto combinado mejoró la oxidación de las grasas y la degradación

de la glucosa [206]. Lo mismo fue observado por Zhang et al. [207], donde una suplementación del 5% de extracto de *Camellia sinensis var. assamica* rico en catequinas, combinado con un protocolo de ejercicio en cinta redujo el desarrollo de la obesidad al incrementar la oxidación de las grasas en el hígado y músculo esquelético facilitando el gasto energético.

Peso de los órganos

Se ha descrito ampliamente como el tamaño de los órganos se correlaciona directamente con el índice de masa corporal, y por tanto con el desarrollo de la obesidad. Son muchos estudios en los que se ha descrito como el desarrollo de la obesidad produce un aumento en el tamaño del corazón [208,209], de los riñones [210], el bazo [211] y los depósitos de grasa en general [212]. En nuestro experimento, el desarrollo de la obesidad aumentó el tamaño de los riñones, el bazo, y la acumulación de grasa epididimal y abdominal. Este aumento del peso de los órganos se relacionó también con una mayor circunferencia abdominal, y un mayor índice de Lee (peso corporal/longitud). Las intervenciones realizadas consiguieron disminuir estas alteraciones de distintas formas. Todas las intervenciones consiguieron revertir el aumento del peso del bazo provocado por el desarrollo de la obesidad. Pero sólo la combinación del ejercicio físico con la ingesta del nutraceutico consiguió que el peso del corazón y de los riñones llegara a igualarse al de los animales que consumieron la dieta SD durante todo el período experimental. Este efecto ha sido descrito por otros autores como como Costa et al. [213] dónde la ingesta oral durante 9 semanas de dos polifenoles de origen vegetal (curcumina o trigonenelina) fue capaz de prevenir la hipertrofia en los riñones de ratones C57BL6/J con obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Por otra parte, en el estudio realizado por Lambert et al. [214] se observó un efecto positivo tras 9 semanas de ejercicio físico y/o la ingesta de polifenoles derivados de la uva, sobre el tamaño y la funcionalidad del corazón en ratas con obesidad inducida por la dieta de forma aislada. Efecto que no se vio potenciado cuando se realizaron las intervenciones de forma combinada.

En el desarrollo de la obesidad, el hígado juega un papel muy importante. En concreto, la acumulación de grasa en el hígado es de suma relevancia, ya que es la clave para el desarrollo de NAFLD asociada a la obesidad. Como era de esperar, nuestro modelo experimental de ratón obeso mostró un mayor peso en el hígado, asociado a un aumento del porcentaje de grasa. Este efecto ha sido ampliamente descrito en ratones [90,188] y otros modelos experimentales [97,204]. Se ha descrito que este aumento de la grasa hepática, así como en otros órganos, puede revertirse cuando se administran compuestos bioactivos sobre la dieta [23] o asociados a un programa de ejercicio [215] puesto que estos son capaces de inhibir la adipogénesis y regular el metabolismo lipídico, como se verá más adelante.

Por otra parte, el desarrollo de la obesidad no solo produjo un incremento en el peso de los animales, sino que también se produjeron distintas alteraciones metabólicas, inflamatorias, de estrés oxidativo y disbiosis intestinal. Esto se observó a través de los resultados obtenidos en relación con distintos parámetros plasmáticos y bioquímicos, a nivel de expresión génica y en el estudio del microbioma intestinal.

Estrés oxidativo e inflamación

El consumo de una dieta rica en grasas se asocia en gran medida a un aumento de la producción de ROS y de la inflamación en tejidos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo [90]. En consecuencia, se esperaría que el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes intracelulares redujera estos niveles. Bajo nuestras condiciones experimentales, los animales que desarrollaron obesidad a través de la dieta alta en grasa y la fructosa en el agua de bebida, presentaron un aumento en la actividad de enzima antioxidante SOD Cu-Zn, y detoxificante GST. Este efecto puede deberse probablemente a un intento de contrarrestar la producción de ROS relacionada con la obesidad [216]. En el resto de actividades enzimáticas analizadas no se observó una mayor actividad, debido probablemente a una menor capacidad protectora del hígado ya que la obesidad puede ejercer un efecto deletéreo sobre la efectividad de estas enzimas [90,217].

La inclusión del nutracéutico en la dieta y la práctica de ejercicio físico (NT+Ex) indujo una mayor actividad de las enzimas GPx y SOD-Mn. Además, se produjo una sobreexpresión en el hígado de los niveles ARNm de las enzimas antioxidantes mitocondriales CAT y SOD, así como de las enzimas detoxificantes GST y QR, lo que nos indicó una actividad beneficiosa sinérgica entre la actividad física y la ingesta de extractos vegetales. De la Fuente-Muñoz et al. [90] también encontraron mayor expresión de las enzimas antioxidantes Nox-4 y SOD en el hígado de ratones C57BL/6 que fueron alimentados con un extracto de té verde durante 20 semanas, atribuyeron este efecto a la presencia de compuestos funcionales como catequinas y teaflavinas con una actividad antioxidante demostrada.

En relación con los marcadores proinflamatorios analizados, nuestros resultados indicaron que los marcadores *tnfa* y resistina en plasma están elevados en los animales que desarrollaron la obesidad en comparación con sus controles delgados SD. Además, se encontró una correlación positiva con los niveles de ARNm de *tnfa* en el hígado de los ratones obesos, ya que este parámetro también se encontraba elevado. Como hemos mencionado anteriormente, la sobrenutrición desencadena una hipertrofia de los adipocitos que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias como *tnfa* y resistina que inhiben la señalización del receptor de insulina, e incrementan por tanto la RI [218]. De hecho, en ratones los niveles elevados de resistina se han relacionado con un incremento del daño mitocondrial, agravando la esteatosis hepática y la RI [219].

Tanto la suplementación de la dieta con el nutracéutico y el ejercicio físico de forma aislada o bien combinando ambas intervenciones, mostraron un efecto positivo disminuyendo los niveles de *tnfa*, IL-6 y resistina en plasma y produjeron de forma aislada, una regulación a la baja de los niveles de ARNm en hígado del *tnfa*. Estos resultados también fueron descritos por otros autores como De la Fuente-Muñoz et al. [90] o Diniz et al. [102] quienes encontraron niveles significativamente elevados en la expresión de *tnfa*, *IL-1β* e *IL-6* en el hígado de ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa y alta en azúcares. Todos estos parámetros mostraron

niveles de expresión inferiores cuando se suplementó la dieta con un 1.6% de extracto de té verde [90] o cuando se aplicó un protocolo de ejercicio físico [102]. Estos resultados demostraron el efecto positivo de la suplementación con nutraceuticos en el estado oxidativo de los animales. La menor concentración de marcadores proinflamatorios se relacionó con la ingesta del nutraceutico, ya que contienen extractos de plantas con compuestos bioactivos que ejercen un efecto beneficioso sobre diferentes parámetros inflamatorios [220,221] y del metabolismo oxidativo [83], concretamente la apigenina y la luteonina identificadas en el nutraceutico han demostrado un efecto antiinflamatorio al inhibir la liberación de citoquinas TNF α e IL-6 en ratones Balb a los que se les había inducido dermatitis de contacto [222]. La inclusión de la pulpa de argán en la dieta de ratones C57BL/6J provocó una disminución de marcadores de oxidación o inflamación como los TBARs en el hígado o la expresión génica hepática de las interleucinas IL-6 e IL- β 1 [176].

Además, cuando el nutraceutico se incluyó en la dieta y se combinó con un programa de ejercicio, se logró una regulación al alza de los niveles ARNm de enzimas antioxidantes o detoxificantes como *cat*, *sod2*, *qr* y *gst* en el hígado de los ratones. En estudios previos, la ingesta durante 90 días de pulpa de argán en ratones C57BL/6J incrementó expresión hepática de la enzima CAT y GST [176], además la inclusión (100 y 200mg·kg⁻¹) en dieta de un extracto etanólico de *Psoralea corylifolia* incrementó los niveles de actividad de *sod2* en el hígado de ratones C57BL/6J con obesidad inducida por la dieta. Además, combinado con actividad física constituyen un potente modulador del estado oxidativo e inflamatorio del organismo [223].

Metabolismo glucídico y lipídico

Dos de las principales alteraciones que se producen o que más se asocian con el desarrollo de la obesidad corresponden a alteraciones del metabolismo glucídico y lipídico, así como marcadores específicos para detectar daño a nivel cardíaco o hepático. Las alteraciones del metabolismo lipídico pueden observarse a nivel de un diverso número de marcadores plasmáticos y hepáticos, mientras que en el

metabolismo glucídico un aumento de la glucemia basal, así como la aparición de resistencia a la insulina, con hiperinsulinemia asociada o no, son las alteraciones que con más frecuencia se relacionan con el desarrollo de la obesidad. Es importante remarcar, que, debido a la interrelación entre estos dos metabolismos, como se ha descrito en la revisión bibliográfica de este trabajo, es difícil discutir estos resultados de manera independiente.

La inducción de la obesidad tras el consumo de una dieta alta en grasa durante 16 semanas dio lugar al desarrollo de la RI, mostrando valores de glucemia mayores durante el desarrollo de la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Este efecto está ampliamente descrito y es debido principalmente a que un exceso de tejido adiposo produce un incremento en la secreción de citoquinas proinflamatorias desencadenando un estado inflamatorio en el individuo, que interfiere en la señalización celular de la insulina. Además, esto conlleva a un aumento de ROS y RNS por el sistema NADPH (Nox), que induce la oxidación de los ácidos grasos e interviene en el correcto funcionamiento de las mitocondrias. Todo esto resulta en una menor respuesta fisiológica a la insulina y por consiguiente una menor captación de glucosa [224,225].

Otro de los parámetros relacionados con el metabolismo glucídico es el índice HOMA. Este índice es un indicador homeostático con el que se puede evaluar la RI ya que cuando se encuentra elevado, se relaciona clínicamente con baja sensibilidad a la insulina, mayores niveles de AUC y mayor riesgo de desarrollar NAFLD [226]. Bajo nuestras condiciones experimentales el índice HOMA-RI de los animales obesos se encontró incrementado con respecto al resto de grupos experimentales. Los grupos que fueron sometidos a las intervenciones nutricionales o de ejercicio físico mostraron niveles de este índice inferiores incluso al grupo SD, lo que se correlacionaba con los resultados obtenidos en el AUC en la prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa. Resultados similares han sido descritos por Zheng et al. [227] quienes observaron que un extracto procedente del fruto de *Phellinus baumii* fue capaz de reducir el índice HOMA en ratones ICE diabéticos y reducir

consecuentemente la RI al incrementar la expresión de irs-1, pi3k y akt en el hígado de estos ratones, mejorando la señal de transducción de la insulina. En relación con la ingesta del nutraceutico, Tsykalo & Trzhetsynskyi, [228] demostraron que la administración durante dos semanas de 200mg/ kg de un extracto proveniente de semillas de *C. sativa* fue capaz de inhibir la RI en un modelo experimental de MetS en ratas. Además, la administración oral durante las últimas 6 semanas de 100mg/kg y 200mg/kg de un extracto de semillas de *P. corylifolia* en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL6, fue capaz de revertir el AUC en un 24% y 28% en comparación con el grupo que solo consumió la dieta alta en grasa [229]. El mecanismo de acción no ha sido elucidado por estos autores, pero la capacidad de los extractos vegetales para captar ROS o reducir el estado inflamatorio del organismo ejercen un efecto clave para reducir la RI [45,230]. Bajo nuestras condiciones experimentales también se encontraron valores de Glut4 significativamente superiores en el músculo plantaris de los animales que habían ingerido el nutraceutico en la dieta y en los que además realizaron el protocolo de ejercicio físico. El efecto beneficioso del ejercicio sobre la RI ha sido ampliamente estudiado [231,232]. En el músculo los ácidos grasos libres, que pueden incrementarse durante el desarrollo de la obesidad, afectan a la actividad PI3K asociada al sustrato del receptor de insulina (IRS-1), lo que conduce a una menor translocación de Glut4 a la superficie y, por tanto, a una menor captación de glucosa [39]. Autores como Han et al., [233] han descrito en sus trabajos que la realización de ejercicio consiguió incrementar la sensibilidad a la insulina mediante un incremento en la expresión de Glut4 y la proteína quinasa B (AKT) que conllevó la activación de la vía PI3K/ AKT en el cuádriceps de ratones (SENSSxC57BL/6J). Estos efectos positivos se consiguieron tras la ingesta de una dieta alta en grasa durante 6 semanas, realizando un protocolo de ejercicio físico de alta intensidad (75% VO₂ máx) durante seis semanas más.

En relación con los parámetros plasmáticos analizados, el desarrollo de la obesidad produjo un aumento en los niveles de la enzima creatina quinasa MB, hallada principalmente en el músculo cardíaco (CK-MB), el colesterol LDL, la insulina, la

leptina y la resistina. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores como Lang et al [234] dónde el desarrollo de la obesidad, mediante una dieta alta en grasa, en ratones C57BL/6J produjo un incremento en los niveles plasmáticos de CK-MB y LDL. Además incrementaron los niveles de insulina y leptina relacionados con alteraciones del metabolismo glucídico como aumento de la concentración de glucosa en sangre y un menor control del apetito [235]. Se ha descrito que existe una relación directa entre la obesidad y los niveles de Ck en plasma [236] debido posiblemente a un incremento en la masa cardíaca. Bajo nuestras condiciones experimentales, estos parámetros fueron revertidos en todas las intervenciones que se realizaron, concretamente la ingesta de compuestos bioactivos derivados del nutraceutico, así como la combinación con un protocolo de ejercicio físico mostraron el mayor beneficio disminuyendo sus valores. Similares resultados fueron reportados por Zhang et al. [207] en un modelo experimental de obesidad inducida por la dieta en ratones C57BL6, dónde la suplementación de la dieta al 5% con un extracto de té combinado con un protocolo de ejercicio físico redujo tanto los niveles de colesterol total, como los niveles de TG e insulina con respecto al grupo de animales obesos que consumieron la dieta hipercalórica. En un mismo modelo experimental, un extracto de té negro (al 1.6%) consiguió disminuir los niveles plasmáticos de insulina y leptina [90]. La concentración de resistina en los ratones obesos fue más elevada en comparación con los animales que consumieron una dieta estándar. Se ha descrito que el aumento de la resistina induce RI y esteatosis hepática cuando esta se encuentra elevada en el suero [219]. Nuestros resultados mostraron que la ingesta del nutraceutico condujo a una disminución de los niveles plasmáticos de resistina, por debajo incluso de los valores obtenidos en el grupo normocalórico (SD). Estos resultados coinciden con los resultados descritos por Wen et al. [219] dónde un compuesto aislado de las hojas de *Morus alba* fue capaz de revertir los efectos metabólicos inducidos por seis dosis de 400 ng/kg de resistina en ratones C57BL6J como la esteatosis hepática y la resistencia a la insulina. Este efecto pudo deberse al incremento de la concentración de mitocondrias, promoviendo la captación de glucosa y la sensibilidad a la insulina. En nuestro

estudio, la disminución de la resistina podría deberse a la presencia del extracto de *Psoralea corylifolia* ya que ha sido descrito por otros autores que la *psoralidina*, un compuesto natural aislado de esta planta disminuye la expresión de resistina en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1, previamente estimulada con medio de diferenciación adipogénica durante 6 días [237].

Además, se han descrito otros efectos beneficiosos sobre el metabolismo glucídico y lipídico de los distintos extractos usados para la formulación del nutracéutico. Con respecto a la pulpa de argán, ensayos realizados *in vivo* describieron que la ingesta de la pulpa de argán incluida en la dieta al 5 y al 10% durante 12 semanas en un modelo experimental de ratón C57BL/6 disminuyó el porcentaje de grasa corporal de los animales, disminuyó la glucemia aumentando la sensibilidad a la insulina y disminuyó los niveles de colesterol total en plasma [176]. En relación a la Brásica, *Camelina sativa*, autores como Tsykalo & Trzhetsynskyi [228] demostraron que una dosis de 200 mg/kg de extracto etanólico (70:30) de *Camelina sativa* mejoró la sensibilidad a la glucosa, redujo la RI y mostró un efecto hipolipemiante en ratas Wistar con MetS inducido por sobrecarga de fructosa (20%) en el agua de bebida durante 8 semanas. Finalmente, se ha descrito que la administración de 50mg/kg de *corylin*, una isoflavona aislada del extracto de *P.corylifolia*, redujo significativamente el peso corporal de ratones obesos por ingesta de dieta alta en grasa, y evitó las complicaciones metabólicas derivadas de esta al disminuir la concentración de WAT e incrementar la de BAT [77]. El extracto de semilla de *P. corylifolia* también se estudió como material funcional para prevenir o mejorar la enfermedad del hígado graso no alcohólico en ratones C57BL/6 mediante la inhibición de la acumulación de lípidos en el hígado [229].

En relación con la homeostasis lipídica, el desarrollo de la obesidad supuso un incremento en la expresión del transcripto *cd36* en el músculo y en el hígado en nuestro modelo experimental. *Cd36* es un sistema transportador de ácidos grasos al interior de las células epiteliales, aunque también se encuentra expresado en otros tejidos como hígado, tejido adiposo y músculo [238,239]. Se ha descrito que un

incremento en la expresión de *cd36* en modelos animales de obesidad está directamente relacionado con un incremento en el contenido de grasa en el hígado y la RI [239]. Sin embargo, este efecto parece estar relacionado con el tejido dónde se exprese, ya que Goudriaan et al. [238] han demostrado que una deficiencia en *cd36* incrementa la sensibilidad a la insulina en el músculo, mientras que la reduce en el hígado de ratones CD36^{-/-}.

En el hígado de ratones obesos se observó un incremento en la expresión de *ppara*. Este incremento fue incluso mayor cuando los animales consumieron el nutraceutico y lo combinaron con la realización del protocolo de ejercicio físico (NT+Ex). *Ppara* ha demostrado en diversos modelos animales tener un efecto protector frente a la esteatosis hepática [230]. Su principal efecto es la inducción de la oxidación de ácidos grasos mitocondrial, peroxisomal y microsomal, reduciendo la acumulación de grasa hepática durante el desarrollo de la obesidad, y previniendo por tanto la esteatosis. Bajo nuestras condiciones experimentales, su expresión además estuvo fuertemente influenciada por la combinación de la ingesta del nutraceutico y la realización del protocolo de ejercicio físico. Otros autores, como Li et al. [240] describieron que la ingesta durante 8 semanas de una formulación en base a nueve péptidos procedentes de semillas de *Chenopodium quinoa* fue capaz de controlar el peso corporal de ratones C57BL/6J obesos y mejorar las alteraciones metabólicas derivadas al incrementar la expresión de *ppara* en el hígado. Por otra parte, la realización durante 8 semanas de un protocolo de ejercicio aeróbico incrementó la expresión *ppara* en el hígado de ratones C57BL/6J, contribuyendo a la regulación metabólica y aliviando la esteatosis hepática, la inflamación y la fibrosis [102]. Ha sido ampliamente descrito que diferentes compuestos bioactivos vegetales son capaces de inducir la expresión del *ppara* e inhibir la esteatosis hepática, actuando como ligandos directos o bien induciendo la oxidación de los ácidos grasos [241].

La combinación del consumo de nutraceutico y la práctica de ejercicio físico produjo además, una mayor expresión de *lpl*, lo que ha sido asociado a una menor acumulación de lípidos en el hígado y una mejora en el metabolismo glucídico [242].

Otros autores han mostrado resultados similares donde la ingesta de extractos vegetales, en concreto extracto de té verde al 1.6% durante 20 semanas o la administración intragástrica de 40mg/kg/día durante 4 semanas, fueron capaces de incrementar la expresión de *lpl* con respecto al grupo de ratones C57BL/6J que consumió la dieta alta en grasa durante todo el periodo experimental [90,219].

Otro de los parámetros analizados que se vio modificado fue la expresión de *scd1* que se vio incrementada en ambos grupos de animales que realizaron el protocolo de ejercicio físico (NT+Ex, Ex). Está descrito que la inhibición de *scd1* mejora el metabolismo energético, promoviendo la lipólisis y termogénesis, y previene la ganancia de peso inducido tras la ingesta de una dieta alta en grasa [243]. Sin embargo, autores como Diniz et al. [102] también han descrito un incremento en su expresión en ratones C57BL/6J con obesidad inducida por la dieta y realización de un protocolo de ejercicio físico durante 8 semanas, lo cual se asoció a una reducción en la habilidad del ejercicio físico para reducir la esteatosis hepática.

Con respecto a los resultados relacionados con la expresión génica en el músculo, se observó que el desarrollo de la obesidad disminuyó la expresión en el músculo *plantaris* del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Igf1*). Este factor se ha correlacionado con una menor síntesis proteica observada en individuos obesos y el riesgo de sufrir sarcopenia [244]. Bajo nuestras condiciones experimentales, la combinación de la ingesta del nutraceutico con la práctica de ejercicio físico, consiguió aumentar la expresión de *igf1*, esencial para el mantenimiento adecuado del metabolismo proteico del músculo esquelético, estimular la síntesis proteica, reducir el estrés oxidativo y la inflamación [244,245].

Otros dos marcadores que reflejan la situación en la que se encuentra el músculo en relación con el metabolismo glucídico y lipídico, son la expresión de los genes *lipin1* y *pten*. Estos dos genes se encontraron sobreexpresados en el músculo *plantaris* del grupo NT+Ex. Estas dos proteínas PTEN y LPIN1 son necesarios para la captación de glucosa o mantener la homeostasis lipídica [246,247]. *Lipin1* posee un papel esencial en la regeneración y desarrollo del músculo esquelético [248]. Además, se

ha observado que una sobreexpresión de *lipin1* en el tejido adiposo se ha correlacionado la prevención en el desarrollo del hígado graso y la RI y alteraciones metabólicas derivadas [249].

Muchos de estos efectos beneficiosos pueden deberse a la realización de actividad física que contribuye en la captación de glucosa, promoviendo una disminución en la acumulación excesiva de grasa [223]. La combinación con el consumo de compuestos bioactivos identificados en cada uno de los componentes del nutraceutico también ejerció un efecto beneficioso sobre estos parámetros. Entre ellos, el picosido II encontrado en el extracto etanólico de semillas de *Camelina sativa* ha sido reportado con efecto hepatoprotector en distintos modelos de experimentación animal [197]. En concreto la administración intravenosa de 20mg/kg en ratones C57BL/6 redujo los niveles de marcadores inflamatorios (*IL6*, *IL-1 β* y *tnf α*) y promovió la función del sistema inmune al inhibir la activación de la vía NF-KB [250]. Autores como Dhami-Shah et al. [251] le atribuyen el efecto hepatoprotector al promover una disminución en la acumulación de ácidos grasos al reducir su captación y la lipogénesis en la línea celular HepG2. El compuesto escoparona presente en el hidrolizado proteico de semillas de *Psoralea corylifolia* mejoró la esteatosis hepática en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina, por inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR involucrada en la acumulación lipídica y la inflamación [252–254]. En el hidrolizado proteico de *Spirodela polyrhiza* encontramos el compuesto avicularina cuya ingesta (5000 mg/kg de animal), fue capaz de revertir la RI inducida en un modelo experimental de rata Wistar mediante la estimulación de quinasas glucolíticas y moléculas de señalización de la insulina [255] y la vitexina que se ha asociado en multitud de estudios con la atenuación de las complicaciones diabéticas, como disfunción del tejido adiposo, disfunción de las células β pancreáticas, hiperglucemia, trastornos hepáticos, nefropatía diabética, enfermedad vascular e hipertensión [189].

En relación con el microbioma intestinal, está bien establecido que la dieta desempeña un papel clave en su composición. Una dieta basada en azúcar y/o grasa induce una disbiosis en la cantidad y diversidad microbiana intestinal [256,257]. Aunque en una amplia gama de trabajos esta disbiosis conduce a una disminución de la biodiversidad bacteriana intestinal, en nuestras condiciones experimentales, la obesidad inducida por la dieta produjo un aumento de la biodiversidad del microbioma intestinal. Al igual que en nuestro estudio, este efecto ha sido descrito por otros autores cuando la mayor cantidad de fibra incluida en la HFD en comparación con la SD puede haber conducido al aumento de la biodiversidad microbiana intestinal [257].

Además, la inclusión del nutraceutico a base de extractos de plantas en la dieta también produjo un aumento de la diversidad bacteriana. Este efecto se asoció a cambios beneficiosos en la microbiota intestinal a través de la ingesta de compuestos bioactivos. Se ha descrito que la ingesta de polifenoles tiene un efecto "similar al de los prebióticos" y puede modificar la α -diversidad de la microbiota intestinal (aumentándola o disminuyéndola) en función de la dosis y la duración del tratamiento [258]. En relación con la β - diversidad, el análisis de componentes principales (PCA) por el método de Bray-Curtis mostró grandes diferencias en la composición de la microbiota entre los grupos SD y HFHF y las diferentes intervenciones realizadas consiguieron disminuir la brecha con el grupo SD como ha sido descrito por otros autores [259]. En el caso de los ratones obesos inducidos por una dieta rica en grasa (HFD), la microbiota intestinal disbiótica parece disminuir la biosíntesis de ácidos biliares secundarios y, a continuación, provoca un sobrecrecimiento bacteriano [257]. Al igual que ocurre con la diversidad alfa, la ingesta de polifenoles puede modificar, aumentar o disminuir la diversidad microbiana en función del tipo de compuesto bioactivo administrado, así como del momento o la dosis de administración [258]. Bajo nuestras condiciones experimentales, se produjo una modificación del microbioma intestinal, y los grupos

que consumieron el nutraceutico se acercaron más al grupo SD. Se sabe que en los sujetos obesos y en los modelos experimentales con roedores, el filo de los Firmicutes aumenta en relación con el filo de los Bacteroidetes y, por lo tanto, la proporción Firmicutes/Bacteroidetes es mayor en comparación con los sujetos delgados [260,261]. Las bacterias del filo Firmicutes son capaces de descomponer polisacáridos complejos, lo que resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) [262], además de incrementar la eficiencia energética y la lipogénesis [263], mientras que se ha sugerido que el filo Bacteroidetes es menos eficiente en la extracción de energía de los alimentos que Firmicutes, promoviendo así una menor absorción de calorías y el consiguiente menor peso corporal [264]. Además, en este trabajo, el cambio de una dieta alta en grasa - alta en fructosa a una dieta estándar disminuyó este ratio, alcanzando el grupo que ha ingerido el nutraceutico los valores más bajos, mejorando el metabolismo de la glucosa a través del aumento de la liberación de GLP-1 como ha sido descrito por otros autores [265].

A nivel de familia, algunas OTU pertenecientes al filo Firmicutes como Oscillospiraceae o Lachnospiraceae se han descrito como microorganismos beneficiosos que pueden aumentar tras el tratamiento con diferentes compuestos bioactivos y fibra [266]. En este trabajo, ambas familias estaban aumentadas en el grupo HFHF, posiblemente debido al mayor contenido de fibra en la dieta. Además, la ingesta de nutraceuticos (con alta composición de compuestos bioactivos) y el programa de ejercicio aumentaron la abundancia de estas familias en comparación con el grupo alimentado con la dieta estándar. Butyricocccaceae estaba más regulada en los ratones obesos que en los delgados. Esta familia se ha descrito como una bacteria productora de butirato [267] y estaba regulada al alza en los ratones obesos, aunque la intervención con el nutraceutico y ejercicio físico aumentó aún más la presencia de esta bacteria en el contenido del ciego. Entre otros efectos beneficiosos, se ha descrito que el butirato derivado de la microbiota reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias mediante la regulación de la actividad de los receptores acoplados a proteínas G, como hemos observado en el plasma de los ratones [268].

El desarrollo de la obesidad provoca una regulación a la baja de las bacterias pertenecientes a los filos Actinobacteria (Bifidobacteriaceae), Verrucomicrobia (Akkermansiaceae), Proteobacteria (Enterobacteriaceae) y Firmicutes (Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Staphylococcaceae). Se ha observado que la familia Lactobacillaceae está aumentada en individuos obesos [269] pero disminuida en individuos delgados-NAFLD [270]. En nuestro modelo experimental se obtuvo un resultado inverso; con disminución de la abundancia de la familia Lactobacillaceae en ratones obesos, y aumento de estos parámetros por las intervenciones de ejercicio y compuestos bioactivos.

Las familias Akkermansiaceae y Bifidobacteriaceae están inversamente correlacionadas con la obesidad. La administración de extractos de plantas se ha descrito en varios estudios como una estrategia exitosa para normalizar la presencia de estas familias en el microbioma intestinal [271], como ocurrió en nuestro estudio cuando se administró el nutracéutico de origen vegetal. Además, se ha reportado que los individuos con obesidad que realizan un programa de ejercicio modulan la diversidad del microbioma intestinal y la abundancia de algunas bacterias, principalmente se ven aumentadas las familias Bifidobacteriaceae y Akkermansia [272]. Este efecto se observó en nuestro modelo experimental en relación con la familia Akkermansiaceae, donde el programa de ejercicio produjo un ligero aumento en la abundancia de esta OTU.

5.2 ENSAYO EN MODELO DE CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer, en general, posee una elevada incidencia en la población mundial y requiere del desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad en los que los pacientes presentan un muy pobre pronóstico. A pesar de que el tratamiento y la prevención del CCR han sufrido grandes avances en los últimos años, los resultados, en términos de curación o de reducción de la incidencia, están muy lejos de ser satisfactorios. Por tanto, la mejora del pronóstico de estos pacientes y la mejora de su supervivencia, precisa del desarrollo de nuevas estrategias tanto preventivas como terapéuticas. Los productos naturales suponen una nueva herramienta en el tratamiento o prevención del CCR, casi el 50% de los tratamientos actualmente disponibles contra el CCR han sido desarrollados, directa o indirectamente a partir de ingredientes naturales [108,138]. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar diferentes estrategias para paliar o ralentizar el desarrollo del CCR. Esta estrategia se basó en una intervención nutricional (dieta combinada con un nutracéutico desarrollado a partir de diferentes extractos vegetales), sola o en combinación con un protocolo de ejercicio físico. Estos cambios consiguieron disminuir el desarrollo del CCR al reducir el número de pólipos y el área tumoral. Además, consiguieron mantener una mayor organización estructural en los pólipos desarrollados.

Nuestro estudio se centró en la familia Brassicaceae, la cual ha demostrado ser una fuente excelente de compuestos bioactivos con capacidad antitumoral [144]. La mayoría de los estudios que analizan esta familia se centran en un grupo de moléculas azufradas conocidas como glucosinolatos (GSL). Existen más de 120 tipos que se encuentran en su forma biológicamente inactiva en el interior de la planta. En respuesta a estrés o un daño en los tejidos del vegetal se libera la enzima mirosinasa, que catalizará la hidrólisis de GSL en isotiocianatos (ITC) [273]. Los ITC más estudiados son el sulforrafano (SFN), el isotiocianato de fenilo (PEITC) y el indol-3-carbinol (I3C), a los cuales se les ha atribuido la capacidad antiproliferativa debido a efectos epigenéticos como la metilación del ADN, la acetilación de histonas y la

expresión de miARN [112]. De hecho, varios estudios clínicos han estudiado la biodisponibilidad y el efecto quimiopreventivo del SFN en pacientes con cáncer de mama [274] o cáncer de próstata [275]. Bajo nuestras condiciones experimentales no hemos potenciado la búsqueda de este tipo de moléculas, sino que hemos centrado nuestro estudio en la extracción de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y detoxificante. Para este fin se utilizó el etanol como solvente ya autores como Rahman et al. [276] estudiaron el efecto del tipo de solvente utilizado en la extracción de compuestos fenólicos de tres especies de Brasicáceas, concluyendo que para la coliflor y el brócoli el mayor contenido en fenoles fue encontrado cuando se usó etanol para la extracción mientras que para la col no se encontraron diferencias. Además, el etanol es un solvente que se ha utilizado ampliamente en el ámbito clínico para la administración de principios activos [277,278]. De hecho, el consumo de diversos extractos etanólicos de Brasicáceas se han descrito como inocuos. En concreto, hasta 2000 mg de extracto etanólico de col roja por kg de peso de animal no mostró toxicidad ni alteraciones metabólicas en un modelo experimental animal de ratones [279] ni el extracto etanólico de *Brassica carinata* en un modelo experimental de rata [280].

De todos los extractos de las distintas especies de Brasicáceas estudiadas en esta tesis doctoral, se obtuvo un mayor rendimiento de extracción, así como una mayor concentración de polifenoles totales en el extracto etanólico de las semillas de *Sinapis alba* sin germinar (cruda). En el resto de pruebas de capacidad antioxidante analizadas (ABTS, capacidad quelante y reductora del hierro y capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica) los mejores resultados se obtuvieron con el extracto de semillas de *Eruca sativa* sin germinar. Estos resultados coinciden con los realizados por Khalil et al. [281] donde la semilla de *Eruca sativa* mostró una capacidad significativamente mayor para captar radicales libres de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) que el resto de Brásicas estudiadas. Además, una dosis de 200mg/kg del extracto etanólico de semillas de *Eruca sativa* incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en el testículo de ratas Wistar que habían sido tratadas con acrilamida para generar estrés oxidativo [282]. La capacidad

antioxidante del extracto etanólico de semillas de *Eruca sativa* disminuyó por el efecto de la germinación. Este efecto ha sido descrito también en especies como *Brassica oleracea var.italica* [283]. Sin embargo, autores como Lv et al. [284] observaron que un mayor contenido de SFN, polifenoles y flavonoides en el tercer día de germinación. Estos mismos autores descubrieron que el efecto de la germinación es muy variable entre especies e incluso en la misma especie, al encontrar diferencias en el efecto de la germinación en seis variedades de la especie *B.olerace var. italica*, tal y como hemos encontrado en nuestro estudio donde la germinación afecta de forma distinta la capacidad antioxidante de cada extracto vegetal.

Bajo nuestras condiciones experimentales, el extracto etanólico de semillas de *Eruca sativa* y *Sinapis alba* fueron también las que mayor capacidad para inhibir el efecto oxidante del paraquat mostraron. El paraquat es un compuesto orgánico que presenta toxicidad en sistemas biológicos debido a que interfiere en la cadena de transporte de electrones mediante dos mecanismos: i) generación de iones superóxido, peróxido de hidrógeno o radical hidroxil, y/o ii) reducción del número de donadores de electrones como NADPH en la mitocondria [285,286]. Este efecto ha sido estudiado en un ensayo de experimental animal con *Drosophila*, dónde el consumo de extracto etanólico de Brásicas fue capaz de proteger frente al daño por paraquat en el tracto digestivo de los animales al activar el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (Nrf2), produciendo un incremento en la respuesta de enzimas antioxidante y detoxificantes del organismo frente al estrés oxidativo generado [287].

Además de poseer una buena capacidad antioxidante en todas las pruebas realizadas, los extractos desarrollados son capaces de incrementar la actividad de enzimas detoxificantes como la GST y la QR. Encontramos nuevamente una mayor inducción en la actividad de estas enzimas en los extractos etanólicos de semillas de *Eruca sativa* y *Sinapis alba* sin germinar. Este efecto ha sido demostrado por otros autores dónde la administración de extracto de *Eruca sativa* consiguió una mayor inducción de la actividad de la enzima GST en un modelo experimental animal de rata Sprague-Dawley, incluso más que el grupo tratado con el paclitaxel (Taxol)

[288]. La actividad de la GST también se ha visto incrementada con respecto al grupo control en un ensayo experimental de peces (*Oncorhynchus mykiss*) que habían sido alimentados con aceite de *Sinapis alba* durante nueve semanas [289]

Los nutraceuticos desarrollados a partir de estas dos semillas consiguen mantener una buena actividad antioxidante y la capacidad para inducir la actividad de enzimas detoxificantes. Este sistema de enzimas detoxificantes juegan un papel fundamental en la quimioprevención al estar implicadas en la eliminación de un amplio rango de sustancias tóxicas o carcinógenos del interior celular, previniendo el daño en el ADN y las proteínas de la célula [290–292]. El ensayo clínico desarrollado por Wark et al. [293] mostró una asociación positiva entre el consumo de brasicáceas con un incremento en la actividad de GST en el recto, lo que correlacionan con un efecto beneficioso en la prevención del cáncer, y el estudio desarrollado por Panda et al. [294] demostró que la ingesta durante 4 semanas de una formulación que combinaba distintos vegetales, entre ellos el brócoli y el rábano pertenecientes a la familia Brassicaceae, fue capaz de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y detoxificantes en el plasma de pacientes sanos.

El nutraceutico desarrollado también mostró un efecto protector frente a la respuesta inflamatoria de los macrófagos al incubarlos con el LPS. Efecto que ha sido demostrado también por otros autores como García-Ibáñez et al. [295], quienes pusieron de manifiesto el efecto antiinflamatorio de un extracto de semillas de Brasicáceas (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* y *Raphanus sativus* L.) en la línea celular de macrófagos humana HL-60, así como una reducción dosis dependiente en la producción de citoquinas proinflamatorias. El extracto etanólico de semillas de *Eruca sativa* desarrollado por Gugliandolo et al. [296] fue capaz de inducir efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en neuronas motoras NSC-34 expuestas al medio de cultivo de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. El extracto ejerció estas acciones inhibiendo las vías del inflamasoma *COX2*, *TLR4*, *NLRP3* y, en consecuencia, limitando la producción de citoquinas proinflamatorias y la apoptosis. El extracto etanólico de semillas de *Sinapis alba* también demostró efectos

antiinflamatorios en un modelo experimental de ratón Balb/c dónde se indujo un edema epidermal en la oreja de ratón, y la administración de 250 mg/kg de extracto redujo la hiperplasia epidermal, el tamaño del edema y la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, en concreto TNF α e IL-6 [297]. Todos estos autores atribuyen este efecto a la variedad de compuestos bioactivos encontrados en los extractos (isotiocianatos y compuestos fenólicos) que actúan de forma sinérgica en la respuesta antiinflamatoria.

En nuestro modelo experimental animal se consiguió inducir el cáncer colorrectal *in situ* en ratones C57BL-6J mediante una administración intraperitoneal de AOM y tres administraciones de DSS en el agua de bebida. La inducción del CCR con esta metodología ya había sido probada con éxito en estudios previos de este grupo experimental [137]. Este modelo es ampliamente utilizado en el estudio del CCR ya que consigue inducir la formación de un proceso completo de oncogénesis de colon desde la proliferación inicial de criptas hasta el desarrollo final del carcinoma [298]. El AOM es un potente carcinógeno que una vez administrado se hidroliza en el hígado de los ratones en metilazoxymetanol (MAM) el cual llega al intestino a través de la circulación y se descompone espontáneamente dando lugar a un fuerte agente alcalinizante que provoca la metilación de la guanina en el ADN, la cual se combinará con timina en lugar de citosina, produciendo un desemparejamiento en el ADN y mutagénesis [299]. El DSS produce inflamación en el colon, por lo que administrarlos conjuntamente incrementa el desarrollo de lesiones debido al daño causado en la barrera epitelial del colon [300]. En nuestro estudio no se encontraron alteraciones metabólicas, ni rasgos de toxicidad a nivel macro y/o microscópico en el resto de órganos analizados, por lo que se consiguió establecer con éxito el desarrollo del tumor sólo en el colon. Sin embargo, lesiones histopatológicas han sido descritas por otros autores en hígado y riñones [301].

Tampoco se han encontrado alteraciones derivadas de la ingesta del nutraceutico. De hecho, la nula toxicidad de extractos etanolicos de semillas de *Eruca sativa* y *Sinapis alba* ha sido analizada por otros autores, los cuales han observado que la ingesta de

hasta 2500mg/ kg (máxima dosis testada) de un extracto etanólico de semillas de *Sinapis alba* demostró ser inocuo en un modelo experimental animal de ratón Balb/c, al no mostrar ningún signo de toxicidad, deterioro ni muerte en los animales [302]. Además, el consumo de este extracto redujo la expresión de ARNm de TNF α , IL-1 β e IL-6. La administración nasogástrica de hasta 200 mg/kg de un extracto etanólico de semillas de *Eruca sativa* tampoco mostró signos de toxicidad en un modelo experimental de rata Wistar [282].

La intervención nutricional realizada, sola o en combinación con el protocolo de ejercicio físico, consiguió disminuir el número de pólipos desarrollados en el colon con respecto al grupo control positivo en el cual sólo se indujo el tumor mediante el modelo AOM/DSS. Este efecto puede ser atribuido a los compuestos bioactivos identificados en los distintos extractos utilizados en para la formulación del nutraceutico, ya que hemos podido comprobar que tras el proceso de digestibilidad *in vitro* los dializados y retenidos de las dietas que incluían el nutraceutico mostraron una mayor actividad antioxidante que los dializados y retenidos de la dieta de control. Esto indica que alguno de los compuestos antioxidantes del nutraceutico fueron potencialmente absorbibles y pudieron ejercer efectos beneficiosos a nivel sistémico [194]. El efecto preventivo del consumo de Brasicáceas frente al desarrollo de tumores ha sido demostrado por otros autores como Baenas et al. [303] dónde el consumo de 100mg/kg de extracto acuoso de germinados de brócoli 30 días antes de la inducción del tumor supuso una reducción en el tamaño y progresión del tumor cerebral en un modelo experimental de rata. Estos autores atribuyen este efecto al conjunto de compuestos fenólicos, isotiocianatos, vitaminas y nutrientes presentes en esta especie, que actúan como una matriz efectiva y favorable en la estimulación de enzimas detoxificantes y activadores del proceso de defensa antioxidante celular [303]. Diversos estudios poblacionales se han llevado a cabo tratando de establecer la relación entre el consumo de Brasicáceas y la disminución sobre el riesgo de desarrollar CCR [304]. En el estudio de Mori et al., [140] no se encontró una asociación significativa entre el consumo de brasicáceas y el riesgo de desarrollar CCR en la población japonesa. Sin embargo, estos mismos autores establecen, al

igual que nosotros, una asociación positiva entre el consumo de polifenoles derivados de plantas con la prevención en el desarrollo del cáncer colorrectal [140]. En concreto, entre las moléculas bioactivas encontradas en el nutracéutico varias han sido ya estudiadas por su potencial uso frente al desarrollo del CCR. El flavonoide pectolinarigenin ha demostrado un efecto anticancerígeno *in vitro* e *in vivo* al inhibir el crecimiento celular, migración e invasión de células de cáncer de colon (HCT116 y CT26) reduciendo el tamaño y el número de nódulos tumorales en un modelo de cáncer subcutáneo en ratones Balb/c inducido con células cancerígenas de colon, CT26 [305] o de vejiga, T24 [306]. Otros autores han reportado que el flavonoide epigallocatequina es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales mediante la vía PI3K y puede ser usado como un agente quimioterapéutico [307] o quimiopreventivo [308] frente al cáncer colorrectal. El flavonoide Dichamentin ha mostrado un efecto citotóxico frente a la línea celular de cáncer de colon HCT-116 mientras que no produjo citotoxicidad frente a la línea celular no cancerígena de pulmón MRC-5 [309]. La quercetina posee efecto quimiopreventivo ya que es capaz de inducir gran cantidad de factores de transcripción que regulan vías metabólicas como el ciclo celular, adhesión celular, transcripción de genes o la respuesta inmune [310]. Nobiletin es un flavonoide cuyo efecto en la prevención de la progresión del CCR es mediada por la modulación de la vía de señalización Akt, causando la supresión de la angiogénesis y la disminución de la progresión celular al reducir los niveles de VEGF [311].

El cáncer colorrectal está asociado con el estrés oxidativo y la inflamación crónica. Bajo nuestras condiciones experimentales, el desarrollo del tumor supuso una disminución en la expresión de las enzimas antioxidantes *gpx* y *sod2*, la enzima glutatión s-transferasa implicada en la detoxificación celular. Así como un incremento en la expresión de factores de transcripción relacionados con la actividad inflamatoria como *IL-1 β* . Todos estos parámetros fueron revertidos en los grupos que ingirieron el nutracéutico, además de incrementar la expresión de la enzima quinona reductasa (*nqo1*) implicada en la detoxificación celular, y disminuir la expresión de *IL-6*. Esto puede ser debido a que los compuestos fenólicos son potentes

antioxidantes capaces de neutralizar moléculas inestables como los radicales libres, que son los principales responsables del daño celular al promover un estado de estrés oxidativo, así como de la oxidación de los lípidos, proteínas y el ácido nucleico, además de causar inflamación en la membrana mucosa del colon. Por lo tanto, son capaces de reducir el riesgo de exposición y susceptibilidad a la carcinogénesis [120]. Además del efecto antiproliferativo *in vitro* e *in vivo* ya descrito, los flavonoides son moléculas que intervienen en la prevención del desarrollo del tumor al reducir el estado de estrés oxidativo e inflamación crónica en el organismo. Las ROS, como hemos comentado anteriormente, pueden activar factores de transcripción involucrados en la generación y progresión del tumor al incrementar la inestabilidad genómica, la proliferación celular y el riesgo de daño o mutación en el ADN. Además, el microambiente tumoral es altamente oxidante lo que produce una inhibición en la actividad de enzimas antioxidantes endógenas como la glutatión peroxidasa, por lo que la capacidad antioxidante que confieren este tipo de moléculas es un aspecto clave para prevenir estos factores [121,300].

El desarrollo del tumor incrementó la expresión de *pik3cd* y *slc20a1* con respecto al control sano, la sobreexpresión de *pik3cd* se traduce en un incremento en la señalización de la ruta Wnt/ β -catenin, implicada en la iniciación y progresión del cáncer colorrectal [312]. Aunque el *Slc20a1* no es un marcador de cáncer colorrectal, su sobreexpresión ha sido asociada a un peor pronóstico en el cáncer de próstata [313] o mama [314]. Sin embargo, este transcrito también interviene en la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenin [315]. La expresión de estos marcadores fue revertida con las distintas intervenciones realizadas, y de forma más pronunciada en el grupo que combina ambas intervenciones (NT+Ex). *Cdc42* desempeña un papel importante en la generación, invasión y la metástasis del tumor debido a su participación en funciones fisiológicas clave como la regulación del citoesqueleto y los microtúbulos, la transcripción, la progresión del ciclo celular, y la apoptosis [316]. Por tanto, su sobreexpresión está altamente relacionada con el desarrollo del cáncer colorrectal [317], no obstante en nuestro estudio la expresión de *cdc42* no mostró diferencias significativas con el desarrollo del tumor, sin embargo, su expresión fue

reducida en los animales a los que se administró la intervención nutricional, combinada o no, con el protocolo de ejercicio físico. Similares resultados fueron descritos por [318] los cuales observaron que el desarrollo del tumor produjo un incremento en la expresión de pik3cd y cdc42 en un modelo experimental de cáncer colorrectal en ratones C57BL/6 inducido mediante el modelo AOM/DSS, mientras que dicha expresión se redujo en el grupo de ratones que ingirió un 2% de curcumina en la dieta durante 12 semanas.

El nutracéutico posee un gran impacto sobre la modulación de la microbiota, ya que, tras la digestión, gran porcentaje de los flavonoides ingeridos no son absorbidos en el intestino delgado y llegan directamente al colon. Allí interaccionan con el microbioma promoviendo la producción de ácidos grasos de cadena corta y la proliferación de bacterias beneficiosas [319]. La composición del microbioma en los animales que han desarrollado el CCR reveló un incremento en la concentración del filo Verrucomicrobia mientras que la abundancia relativa del filo Firmicutes y Actinobacteria se vio reducida con respecto al grupo control sano (CT-). Esto coincide con lo descrito por otros autores como Hidalgo-García et al. [320] quienes, sin embargo, también encuentran un incremento en la abundancia del filo Bacteroidetes que nosotros no hemos visto reflejado. Estos cambios anormales en la composición del microbioma pueden suponer la destrucción de la barrera intestinal al incrementar la respuesta inflamatoria y el daño en la mucosa del intestino [320,321]. Al contrario que nuestros resultados, la mayoría de estudios que inducen el cáncer colorrectal con el modelo AOM/DSS encuentran una disminución en el ratio Firmicutes/ Bacteroidetes (F/B) en los ratones que han desarrollado el tumor [320,322,323]. Esto es debido a que filo Bacteroidetes se asocia con la susceptibilidad y la promoción del CCR, mientras que Firmicutes produce butirato que ha demostrado causar muerte celular por apoptosis en células de cáncer de colon, disminuir la inflamación y mantener la integridad de la mucosa intestinal [324].

Aunque en nuestro ensayo experimental aparece disminuido la ratio F/B, no aparece representación alguna del filo Bacteroidetes a nivel de género. Por lo que muy

probablemente no encontraríamos incrementada la presencia de bacterias dañinas como *Bacteroides fragilis* (ETBF), señalada como una de las bacterias más dominantes en el desarrollo del CCR ya que causa inflamación y promueve cambios potenciales en la ecología del intestino lo que favorece la colonización de otras bacterias perjudiciales como *E.coli* y *Fusobacterium nucleatum* [125]. De hecho, bajo nuestras condiciones experimentales se ha visto incrementada la presencia del género *Blautia* perteneciente a la familia Lachnospiraceae (Filo Bacillota), cuya presencia ayuda a controlar la progresión del CCR al promover la función de las células del sistema inmune CD8⁺ [325]. También se obtuvo un incremento en la presencia del género *Lactobacillus* (Filo Firmicutes, familia Lactobacillaceae) que ha sido descrita como bacteria beneficiosa frente al desarrollo del CCR al inhibir la activación de factores de expresión proinflamatorios y el daño en el tejido intestinal [323] y del género *Akkermansia* (Filo Verrucomicrobia, familia Verrucomicrobiaceae), la bacteria *A.muciniphila* ha demostrado protección frente al desarrollo del CCR en ratones al inhibir la vía de señalización AhR/ β -catenin [326], además de promover la liberación de vesículas extracelulares que poseen gran multitud de efectos regulatorios en la salud como mejorar la integridad de la mucosa, reducir la permeabilidad intestinal y promover la presencia de bacterias beneficiosas [327], por lo que este género está asociado con un microbioma saludable que puede proteger frente al desarrollo del CCR [320]. Sin embargo, para conseguir una prevención sobre el desarrollo del cáncer colorrectal a través del microbioma son necesarios más estudios que demuestren la abundancia y el tipo de microorganismos presentes en los tejidos precancerosos [125].

Estos resultados confirman los efectos beneficiosos de los extractos de Brasicáceas sobre la salud y alientan su uso como suplemento dietético en la prevención/tratamiento de aquellas condiciones patológicas donde la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental. El consumo de brasicáceas o los compuestos bioactivos derivados de esta familia pueden disminuir el riesgo y la incidencia del CCR al ser capaces de eliminar moléculas inestables como ROS que pueden iniciar el proceso de carcinogénesis [120].

6 CONCLUSIONES

1. Para optimizar el rendimiento y las propiedades biofuncionales de los distintos extractos estudiados es necesario ensayar diferentes modelos de extracción en base al componente mayoritario del extracto que se requiera para la acción preventiva o terapéutica. Los extractos etanólicos procedentes de semillas de *Eruca sativa*, *Sinapis alba*, *Camelina sativa*, *Argania spinosa*, y los hidrolizados proteicos de *Spirodella polyrhiza* y *Psoralea corylifolia* mostraron el mayor rendimiento de extracción y capacidad antioxidante y detoxificante.
2. El diseño de nutracéuticos por combinación nos ha permitido potenciar las sinergias entre los distintos componentes en base a su distinta constitución en principios bioactivos, principalmente flavonoides y péptidos bioactivos. Los nutracéuticos desarrollados tienen un marcado potencial para el tratamiento de distintas patologías como obesidad y síndrome metabólico y el cáncer colorrectal, al optimizarse su capacidad antioxidante y mostrar una alta biodisponibilidad de sus compuestos bioactivos.
3. El efecto beneficioso de los nutracéuticos diseñados se consiguió mediante distintos mecanismos de actuación como su efecto protector frente al estrés oxidativo, utilizando diversas rutas moleculares, su efecto antiinflamatorio y su efecto detoxificante de compuestos potencialmente involucrados en el desarrollo del cáncer.
4. Las intervenciones de administración de un nutracéutico de combinación, y/o un protocolo de ejercicio físico fueron una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de distintas alteraciones metabólicas y la disbiosis intestinal en un modelo experimental de obesidad inducida por la dieta. Los resultados fueron especialmente relevantes en el estado inflamatorio sistémico de los animales, y en el metabolismo glucídico y lipídico.
5. Las intervenciones de administración de un nutracéutico de combinación, y/o un protocolo de ejercicio físico fueron una estrategia preventiva eficaz para evitar la disbiosis intestinal, el desarrollo de pólipos y carcinogénesis en el

modelo experimental generado. Esta acción preventiva se asoció a un incremento de la expresión génica de enzimas antioxidantes y detoxificantes, así como a un menor estado proinflamatorio.

7 BIBLIOGRAFIA

1. OMS Noncommunicable diseases. Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (accessed on 8 September 2023).
2. UNDP Objetivo 3: Salud y Bienestar. Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo (UNDP) Available online: <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals/salud-bienestar> (accessed on 8 September 2023).
3. OMS Cancer Today Available online: <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed on 22 October 2023).
4. Ma, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Zhang, P.; Shi, C.; Zou, Y.; Qin, H. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PloS One* **2013**, *8*, e53916, doi:10.1371/journal.pone.0053916.
5. Jin, X.; Qiu, T.; Li, L.; Yu, R.; Chen, X.; Li, C.; Proud, C.G.; Jiang, T. Pathophysiology of Obesity and Its Associated Diseases. *Acta Pharm. Sin. B* **2023**, *13*, 2403–2424, doi:10.1016/j.apsb.2023.01.012.
6. Sergeeva, E.; Ruksha, T.; Fefelova, Y. Effects of Obesity and Calorie Restriction on Cancer Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9601, doi:10.3390/ijms24119601.
7. OMS Obesidad y sobrepeso Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 5 September 2023).
8. Vicente-Herrero, M.T.; Egea Sancho, M.; Ramírez Íñiguez de la Torre, M.V.; López González, Á.A. Relación de Los Índices de Adiposidad Visceral (VAI) y Disfuncional (DAI) Con Parámetros de Obesidad. *Med. Fam. SEMERGEN* **2023**, *49*, 101965, doi:10.1016/j.semerg.2023.101965.
9. Wu, Y.; Li, H.; Tao, X.; Fan, Y.; Gao, Q.; Yang, J. Optimised Anthropometric Indices as Predictive Screening Tools for Metabolic Syndrome in Adults: A Cross-Sectional Study. *BMJ Open* **2021**, *11*, e043952, doi:10.1136/bmjopen-2020-043952.
10. Novelli, E.L.B.; Diniz, Y.S.; Galhardi, C.M.; Ebaid, G.M.X.; Rodrigues, H.G.; Mani, F.; Fernandes, A.A.H.; Cicogna, A.C.; Novelli Filho, J.L.V.B. Anthropometrical Parameters and Markers of Obesity in Rats. *Lab. Anim.* **2007**, *41*, 111–119, doi:10.1258/002367707779399518.
11. Wallace, T.M.; Levy, J.C.; Matthews, D.R. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 1487–1495, doi:10.2337/diacare.27.6.1487.
12. Mutiso, S.K.; Rono, D.K.; Bukachi, F. Relationship between Anthropometric Measures and Early Electrocardiographic Changes in Obese Rats. *BMC Res. Notes* **2014**, *7*, 931, doi:10.1186/1756-0500-7-931.
13. Yáñez-Esquiros, P.; Olazarán, L.; Aguas-Ayesa, M.; Perdomo, C.M.; García-Goñi, M.; Silva, C.; Fernández-Formoso, J.A.; Escalada, J.; Montecucco, F.; Portincasa, P.; et al. 'Obesities': Position Statement on a Complex Disease Entity with Multifaceted Drivers. *Eur. J. Clin. Invest.* **2022**, *52*, e13811, doi:10.1111/eci.13811.
14. Wannamethee, S.G.; Atkins, J.L. Sarcopenic Obesity and Cardiometabolic Health and Mortality in Older Adults: A Growing Health Concern in an Ageing Population. *Curr. Diab. Rep.* **2023**, doi:10.1007/s11892-023-01522-2.

-
15. WOF World Obesity Day Atlases | Obesity Atlas 2023 Available online: <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19> (accessed on 31 March 2024).
 16. WOF *World Obesity Federation, World Obesity Atlas, 2023*; 2023;
 17. AESAN Estudio ENE-COVID: Situación ponderal de la población adulta en España. (Ministerio de Consumo). Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III). Available online: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/ENE_COVID_ADULTOS_FINAL.pdf (accessed on 20 May 2023).
 18. Junta de Andalucía Plan Integran de Obesidad Infantil de Andalucía; Informe PIOBIN 2021 Available online: <https://www.juntadeandalucia.es/buscar.html?busquedageneral=Plan+Integran+de+Obesidad+Infantil+de+Andaluc%C3%ADa%3B+2021&organismo=ja> (accessed on 31 March 2024).
 19. OMS European Regional Obesity Report. World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289057738> (accessed on 30 November 2023).
 20. Cai, Z.; Yang, Y.; Zhang, J. Obesity Is Associated with Severe Disease and Mortality in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-Analysis. *BMC Public Health* **2021**, *21*, 1505, doi:10.1186/s12889-021-11546-6.
 21. Ahmed, B.; Sultana, R.; Greene, M.W. Adipose Tissue and Insulin Resistance in Obese. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *137*, 111315, doi:10.1016/j.biopha.2021.111315.
 22. Barber, T.M.; Kabisch, S.; Pfeiffer, A.F.H.; Weickert, M.O. The Effects of the Mediterranean Diet on Health and Gut Microbiota. *Nutrients* **2023**, *15*, 2150, doi:10.3390/nu15092150.
 23. D'Antongiovanni, V.; Fornai, M.; Benvenuti, L.; Di Salvo, C.; Pellegrini, C.; Cappelli, F.; Masi, S.; Antonioli, L. Dietary Supplement, Containing the Dry Extract of Curcumin, Emblica and Cassia, Counteracts Intestinal Inflammation and Enteric Dysmotility Associated with Obesity. *Metabolites* **2023**, *13*, 410, doi:10.3390/metabo13030410.
 24. Curran, F.; Davis, M.E.; Murphy, K.; Tersigni, N.; King, A.; Ngo, N.; O'Donoghue, G. Correlates of Physical Activity and Sedentary Behavior in Adults Living with Overweight and Obesity: A Systematic Review. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2023**, e13615, doi:10.1111/obr.13615.
 25. Andersson, D.P.; Kerr, A.G.; Dahlman, I.; Rydén, M.; Arner, P. Relationship Between a Sedentary Lifestyle and Adipose Insulin Resistance. *Diabetes* **2022**, *72*, 316–325, doi:10.2337/db22-0612.
 26. Kerr, N.R.; Booth, F.W. Contributions of Physical Inactivity and Sedentary Behavior to Metabolic and Endocrine Diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **2022**, *33*, 817–827, doi:10.1016/j.tem.2022.09.002.
 27. Fontané, L.; Benaiges, D.; Goday, A.; Llauradó, G.; Pedro-Botet, J. Influencia de la microbiota y de los probióticos en la obesidad. *Clínica E Investig. En Arterioscler.* **2018**, *30*, 271–279, doi:10.1016/j.arteri.2018.03.004.
 28. Martos-Moreno, G.Á.; Serra-Juhé, C.; Pérez-Jurado, L.A.; Argente, J. Aspectos genéticos de la obesidad. *Rev. Esp. Endocrinol. Pedriatica* **2017**, *8*, 21;32.
 29. An, S.-M.; Cho, S.-H.; Yoon, J.C. Adipose Tissue and Metabolic Health. *Diabetes Metab. J.* **2023**, doi:10.4093/dmj.2023.0011.
-

30. Esteve Ràfols, M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol. Nutr.* **2014**, *61*, 100–112, doi:10.1016/j.endonu.2013.03.011.
31. Ghaben, A.L.; Scherer, P.E. Adipogenesis and Metabolic Health. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 242–258, doi:10.1038/s41580-018-0093-z.
32. Obregon, M.J. Adipose Tissues and Thyroid Hormones. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 1–12, doi:10.3389/fphys.2014.00479.
33. Gil, A.; Bretón-Lesmes, I.; Suárez-Llanos, J.P.; Pérez de la Cruz, A.J. Nutrición y Obesidad En El Adulto. In *Tratado de nutrición. Nutrición y enfermedad.*; Médica Panamericana, 2017; Vol. V ISBN 978-84-9110-194-9.
34. Jeon, Y.G.; Kim, Y.Y.; Lee, G.; Kim, J.B. Physiological and Pathological Roles of Lipogenesis. *Nat. Metab.* **2023**, *5*, 735–759, doi:10.1038/s42255-023-00786-y.
35. Grabner, G.F.; Xie, H.; Schweiger, M.; Zechner, R. Lipolysis: Cellular Mechanisms for Lipid Mobilization from Fat Stores. *Nat. Metab.* **2021**, *3*, 1445–1465, doi:10.1038/s42255-021-00493-6.
36. Yang, A.; Mottillo, E.P. Adipocyte Lipolysis: From Molecular Mechanisms of Regulation to Disease and Therapeutics. *Biochem. J.* **2020**, *477*, 985–1008, doi:10.1042/BCJ20190468.
37. Kwok, T.C.; Stimson, R.H. Human Brown Adipose Tissue Function: Insights from Current in Vivo Techniques. *J. Endocrinol.* **2023**, *259*, e230017, doi:10.1530/JOE-23-0017.
38. D’Anneo, A.; Lauricella, M. Natural and Synthetic Compounds for Management, Prevention and Treatment of Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2890, doi:10.3390/ijms23052890.
39. Fahed, G.; Aoun, L.; Bou Zerdan, M.; Allam, S.; Bou Zerdan, M.; Bouferraa, Y.; Assi, H.I. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 786, doi:10.3390/ijms23020786.
40. Saxton, S.N.; Toms, L.K.; Aldous, R.G.; Withers, S.B.; Ohanian, J.; Heagerty, A.M. Restoring Perivascular Adipose Tissue Function in Obesity Using Exercise. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2021**, *35*, 1291–1304, doi:10.1007/s10557-020-07136-0.
41. Mahboob, A.; Samuel, S.M.; Mohamed, A.; Wani, M.Y.; Ghorbel, S.; Miled, N.; Büsselberg, D.; Chaari, A. Role of Flavonoids in Controlling Obesity: Molecular Targets and Mechanisms. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1177897, doi:10.3389/fnut.2023.1177897.
42. Geto, Z.; Molla, M.D.; Challa, F.; Belay, Y.; Getahun, T. Mitochondrial Dynamic Dysfunction as a Main Triggering Factor for Inflammation Associated Chronic Non-Communicable Diseases. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 97–107, doi:10.2147/JIR.S232009.
43. Mancini, G.; Pirruccio, K.; Yang, X.; Blüher, M.; Rodeheffer, M.; Horvath, T.L. Mitofusin 2 in Mature Adipocytes Controls Adiposity and Body Weight. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2849–2858.e4, doi:10.1016/j.celrep.2019.02.039.
44. Rogge, M.M. The Role of Impaired Mitochondrial Lipid Oxidation in Obesity. *Biol. Res. Nurs.* **2009**, *10*, 356–373, doi:10.1177/1099800408329408.
45. Gjermeni, E.; Kirstein, A.S.; Kolbig, F.; Kirchof, M.; Bundalian, L.; Katzmann, J.L.; Laufs, U.; Blüher, M.; Garten, A.; Le Duc, D. Obesity—An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1426, doi:10.3390/biom11101426.

-
46. Mahadev, K.; Motoshima, H.; Wu, X.; Ruddy, J.M.; Arnold, R.S.; Cheng, G.; Lambeth, J.D.; Goldstein, B.J. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H₂O₂ and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 1844–1854, doi:10.1128/MCB.24.5.1844-1854.2004.
 47. Kahn, S.E.; Hull, R.L.; Utzschneider, K.M. Mechanisms Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Nature* **2006**, *444*, 840–846, doi:10.1038/nature05482.
 48. Radzik-Zajac, J.; Wytrychowski, K.; Wiśniewski, A.; Barg, W. The Role of the Novel Adipokines Vaspin and Omentin in Chronic Inflammatory Diseases. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **2023**, *29*, 48–52, doi:10.5114/pedm.2022.121371.
 49. Xu, J.; Li, M.; Jiang, X.; Wang, Y.; Ma, H.; Zhou, Y.; Tian, M.; Liu, Y. Omentin-1 and Diabetes: More Evidence but Far from Enough. *Arch. Physiol. Biochem.* **2023**, 1–7, doi:10.1080/13813455.2023.2230380.
 50. Grander, C.; Grabherr, F.; Tilg, H. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiological Concepts and Treatment Options. *Cardiovasc. Res.* **2023**, *119*, 1787–1798, doi:10.1093/cvr/cvad095.
 51. Tong, Y.; Xu, S.; Huang, L.; Chen, C. Obesity and Insulin Resistance: Pathophysiology and Treatment. *Drug Discov. Today* **2022**, *27*, 822–830, doi:10.1016/j.drudis.2021.11.001.
 52. Könnér, A.C.; Brüning, J.C. Selective Insulin and Leptin Resistance in Metabolic Disorders. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 144–152, doi:10.1016/j.cmet.2012.07.004.
 53. NIDDK What Is Diabetes? - NIDDK Available online: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes> (accessed on 22 February 2024).
 54. Janoutová, J.; Machaczka, O.; Zatloukalová, A.; Janout, V. Is Alzheimer's Disease a Type 3 Diabetes? A Review. *Cent. Eur. J. Public Health* **2022**, *30*, 139–143, doi:10.21101/cejph.a7238.
 55. OMS Diabetes Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed on 11 September 2023).
 56. Lempesis, I.G.; Georgakopoulou, V.E. Physiopathological Mechanisms Related to Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *World J. Exp. Med.* **2023**, *13*, 7–16, doi:10.5493/wjem.v13.i3.7.
 57. OMS Cardiovascular Diseases Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds> (accessed on 15 November 2023).
 58. INE INEbase / Sociedad /Salud /Estadística de defunciones según la causa de muerte / Últimos datos Available online: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175 (accessed on 26 February 2024).
 59. Stanek, A.; Brożyna-Tkaczyk, K.; Myśliński, W. The Role of Obesity-Induced Perivascular Adipose Tissue (PVAT) Dysfunction in Vascular Homeostasis. *Nutrients* **2021**, *13*, 3843, doi:10.3390/nu13113843.
 60. Hu, Q.; Zhang, H.; Gutiérrez Cortés, N.; Wu, D.; Wang, P.; Zhang, J.; Mattison, J.A.; Smith, E.; Bettcher, L.F.; Wang, M.; et al. Increased Drp1 Acetylation by
-

- Lipid Overload Induces Cardiomyocyte Death and Heart Dysfunction. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 456–470, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315252.
61. Ali Khan, A.; Hansson, J.; Weber, P.; Foehr, S.; Krijgsveld, J.; Herzig, S.; Scheideler, M. Comparative Secretome Analyses of Primary Murine White and Brown Adipocytes Reveal Novel Adipokines. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2018**, *17*, 2358–2370, doi:10.1074/mcp.RA118.000704.
62. de Kloet, A.D.; Krause, E.G.; Scott, K.A.; Foster, M.T.; Herman, J.P.; Sakai, R.R.; Seeley, R.J.; Woods, S.C. Central Angiotensin II Has Catabolic Action at White and Brown Adipose Tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2011**, *301*, E1081–1091, doi:10.1152/ajpendo.00307.2011.
63. Cobbina, E.; Akhlaghi, F. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) – Pathogenesis, Classification, and Effect on Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Drug Metab. Rev.* **2017**, *49*, 197–211, doi:10.1080/03602532.2017.1293683.
64. Fang, X.; Song, J.; Zhou, K.; Zi, X.; Sun, B.; Bao, H.; Li, L. Molecular Mechanism Pathways of Natural Compounds for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Molecules* **2023**, *28*, 5645, doi:10.3390/molecules28155645.
65. Friedman, S.L.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Rinella, M.; Sanyal, A.J. Mechanisms of NAFLD Development and Therapeutic Strategies. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 908–922, doi:10.1038/s41591-018-0104-9.
66. Riazi, K.; Azhari, H.; Charette, J.H.; Underwood, F.E.; King, J.A.; Afshar, E.E.; Swain, M.G.; Congly, S.E.; Kaplan, G.G.; Shaheen, A.-A. The Prevalence and Incidence of NAFLD Worldwide: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *7*, 851–861, doi:10.1016/S2468-1253(22)00165-0.
67. Teng, M.L.; Ng, C.H.; Huang, D.Q.; Chan, K.E.; Tan, D.J.; Lim, W.H.; Yang, J.D.; Tan, E.; Muthiah, M.D. Global Incidence and Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Mol. Hepatol.* **2023**, *29*, S32–S42, doi:10.3350/cmh.2022.0365.
68. Estes, C.; Anstee, Q.M.; Arias-Loste, M.T.; Bantel, H.; Bellentani, S.; Caballeria, J.; Colombo, M.; Craxi, A.; Crespo, J.; Day, C.P.; et al. Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the Period 2016-2030. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 896–904, doi:10.1016/j.jhep.2018.05.036.
69. Kurutas, E.B. The Importance of Antioxidants Which Play the Role in Cellular Response against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 71, doi:10.1186/s12937-016-0186-5.
70. Ambroselli, D.; Masciulli, F.; Romano, E.; Catanzaro, G.; Besharat, Z.M.; Massari, M.C.; Ferretti, E.; Migliaccio, S.; Izzo, L.; Ritieni, A.; et al. New Advances in Metabolic Syndrome, from Prevention to Treatment: The Role of Diet and Food. *Nutrients* **2023**, *15*, 640, doi:10.3390/nu15030640.
71. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*, 12, doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
72. Grundy, S.M. Metabolic Syndrome Update. *Trends Cardiovasc. Med.* **2016**, *26*, 364–373, doi:10.1016/j.tcm.2015.10.004.
73. Radu, F.; Potcovaru, C.-G.; Salmen, T.; Filip, P.V.; Pop, C.; Fierbințeanu-Braticievici, C. The Link between NAFLD and Metabolic Syndrome. *Diagnostics* **2023**, *13*, 614, doi:10.3390/diagnostics13040614.

-
74. Bekkouche, L.; Bouchenak, M.; Malaisse, W.J.; Yahia, D.A. The Mediterranean Diet Adoption Improves Metabolic, Oxidative, and Inflammatory Abnormalities in Algerian Metabolic Syndrome Patients. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **2014**, *46*, 274–282, doi:10.1055/s-0033-1363657.
 75. Čolak, E.; Pap, D. The Role of Oxidative Stress in the Development of Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders. *J. Med. Biochem.* **2021**, *40*, 1–9, doi:10.5937/jomb0-24652.
 76. Park, J.; Nurkolis, F.; Won, H.; Yang, J.; Oh, D.; Jo, H.; Choi, J.; Chung, S.; Kurniawan, R.; Kim, B. Could Natural Products Help in the Control of Obesity? Current Insights and Future Perspectives. *Mol. Basel Switz.* **2023**, *28*, 6604, doi:10.3390/molecules28186604.
 77. Chang, Y.-H.; Hung, H.-Y. Recent Advances in Natural Anti-Obesity Compounds and Derivatives Based on in Vivo Evidence: A Mini-Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *237*, 114405, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114405.
 78. Pereira, S.S.; Guimarães, M.; Monteiro, M.P. Towards Precision Medicine in Bariatric Surgery Prescription. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2023**, *24*, 961–977, doi:10.1007/s11154-023-09801-9.
 79. Tak, Y.J.; Lee, S.Y. Long-Term Efficacy and Safety of Anti-Obesity Treatment: Where Do We Stand? *Curr. Obes. Rep.* **2021**, *10*, 14–30, doi:10.1007/s13679-020-00422-w.
 80. Astrup, A.; Rössner, S.; Van Gaal, L.; Rissanen, A.; Niskanen, L.; Al Hakim, M.; Madsen, J.; Rasmussen, M.F.; Lean, M.E.J.; NN8022-1807 Study Group Effects of Liraglutide in the Treatment of Obesity: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Lancet Lond. Engl.* **2009**, *374*, 1606–1616, doi:10.1016/S0140-6736(09)61375-1.
 81. Wilding, J.P.H.; Batterham, R.L.; Calanna, S.; Davies, M.; Van Gaal, L.F.; Lingvay, I.; McGowan, B.M.; Rosenstock, J.; Tran, M.T.D.; Wadden, T.A.; et al. Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 989–1002, doi:10.1056/NEJMoa2032183.
 82. McDuffie, J.R.; Calis, K.A.; Booth, S.L.; Uwaifo, G.I.; Yanovski, J.A. Effects of Orlistat on Fat-Soluble Vitamins in Obese Adolescents. *Pharmacotherapy* **2002**, *22*, 814–822, doi:10.1592/phco.22.11.814.33627.
 83. Pérez-Torres, I.; Castrejón-Téllez, V.; Soto, M.E.; Rubio-Ruiz, M.E.; Manzano-Pech, L.; Guarner-Lans, V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1786, doi:10.3390/ijms22041786.
 84. Ross, R.; Soni, S.; Houle, S. Negative Energy Balance Induced by Exercise or Diet: Effects on Visceral Adipose Tissue and Liver Fat. *Nutrients* **2020**, *12*, 891, doi:10.3390/nu12040891.
 85. Myers, J.; Kokkinos, P.; Nyelin, E. Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* **2019**, *11*, 1652, doi:10.3390/nu11071652.
 86. Garza-Juárez, A.; Pérez-Carrillo, E.; Arredondo-Espinoza, E.U.; Islas, J.F.; Benítez-Chao, D.F.; Escamilla-García, E. Nutraceuticals and Their Contribution to Preventing Noncommunicable Diseases. *Foods* **2023**, *12*, 3262, doi:10.3390/foods12173262.
 87. Manna, P.; Jain, S.K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2015**, *13*, 423–444, doi:10.1089/met.2015.0095.
-

88. Ng, K.; Gu, C.; Zhang, H.; Putri, C.Y. Evaluation of α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Flavonoids. *Int. J. Food Nutr. Sci.* **2015**, *2*, 174–179, doi:http://www.dx.doi.org/10.15436/2377-0http://www.dx.doi.org/10.15436/2377-0619.15.042619.15.042.
89. Gauer, J.S.; Tumova, S.; Lippiat, J.D.; Kerimi, A.; Williamson, G. Differential Patterns of Inhibition of the Sugar Transporters GLUT2, GLUT5 and GLUT7 by Flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *152*, 11–20, doi:10.1016/j.bcp.2018.03.011.
90. De la Fuente-Muñoz, M.; De la Fuente-Fernández, M.; Román-Carmena, M.; Amor, S.; Iglesias-de la Cruz, M.C.; García-Laínez, G.; Llopis, S.; Martorell, P.; Verdú, D.; Serna, E.; et al. Supplementation with a New Standardized Extract of Green and Black Tea Exerts Antiadipogenic Effects and Prevents Insulin Resistance in Mice with Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8521, doi:10.3390/ijms24108521.
91. Chavanelle, V.; Langhi, C.; Michaux, A.; Ripoche, D.; Otero, Y.F.; Joubioux, F.L.; Maugard, T.; Guigas, B.; Giera, M.; Peltier, S.; et al. A Novel Polyphenol-Rich Combination of 5 Plant Extracts Prevents High-Fat Diet-Induced Body Weight Gain by Regulating Intestinal Macronutrient Absorption in Mice. *Nutr. Res. N. Y. N* **2023**, *118*, 70–84, doi:10.1016/j.nutres.2023.07.010.
92. Dirks, A.J.; Leeuwenburgh, C. Caloric Restriction in Humans: Potential Pitfalls and Health Concerns. *Mech. Ageing Dev.* **2006**, *127*, 1–7, doi:10.1016/j.mad.2005.09.001.
93. Zhang, X.; Shi, L.; Li, Q.; Song, C.; Han, N.; Yan, T.; Zhang, L.; Ren, D.; Zhao, Y.; Yang, X. Caloric Restriction, Friend or Foe: Effects on Metabolic Status in Association with the Intestinal Microbiome and Metabolome. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 14061–14072, doi:10.1021/acs.jafc.2c06162.
94. Martínez-Montoro, J.I.; Benítez-Porres, J.; Tinahones, F.J.; Ortega-Gómez, A.; Murri, M. Effects of Exercise Timing on Metabolic Health. *Obes. Rev.* **2023**, *24*, e13599, doi:10.1111/obr.13599.
95. Bergman, B.C.; Goodpaster, B.H. Exercise and Muscle Lipid Content, Composition, and Localization: Influence on Muscle Insulin Sensitivity. *Diabetes* **2020**, *69*, 848–858, doi:10.2337/dbi18-0042.
96. Chow, L.S.; Gerszten, R.E.; Taylor, J.M.; Pedersen, B.K.; Van Praag, H.; Trappe, S.; Febbraio, M.A.; Galis, Z.S.; Gao, Y.; Haus, J.M.; et al. Exerkines in Health, Resilience and Disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2022**, *18*, 273–289, doi:10.1038/s41574-022-00641-2.
97. Martínez, R.; López-Trinidad, L.M.; Kapravelou, G.; Arrebola, F.; Galisteo, M.; Aranda, P.; Porres, J.M.; López-Jurado, M. A Combined Healthy Strategy for Successful Weight Loss, Weight Maintenance and Improvement of Hepatic Lipid Metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *85*, 108456, doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108456.
98. Swift, D.L.; Johannsen, N.M.; Lavie, C.J.; Earnest, C.P.; Church, T.S. The Role of Exercise and Physical Activity in Weight Loss and Maintenance. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *56*, 441–447, doi:10.1016/j.pcad.2013.09.012.
99. Fu, P.; Zhu, R.; Jia, J.; Hu, Y.; Wu, C.; Cieszczyk, P.; Holmberg, H.-C.; Gong, L. Aerobic Exercise Promotes the Functions of Brown Adipose Tissue in Obese Mice via a Mechanism Involving COX2 in the VEGF Signaling Pathway. *Nutr. Metab.* **2021**, *18*, 56, doi:10.1186/s12986-021-00581-0.

-
100. Gálvez, I.; Hinchado, M.D.; Martín-Cordero, L.; Morán-Plata, F.J.; Graham, G.; Francisco-Morcillo, J.; Ortega, E. The Anti-Inflammatory and Bioregulatory Effects of Habitual Exercise in High-Fat Diet-Induced Obesity Involve Crown-like Structures and MCP-1 in White Adipose Tissue. **2023**.
 101. Verheggen, R.J.H.M.; Maessen, M.F.H.; Green, D.J.; Hermus, A.R.M.M.; Hopman, M.T.E.; Thijssen, D.H.T. A Systematic Review and Meta-Analysis on the Effects of Exercise Training versus Hypocaloric Diet: Distinct Effects on Body Weight and Visceral Adipose Tissue. *Obes. Rev.* **2016**, *17*, 664–690, doi:10.1111/obr.12406.
 102. Diniz, T.A.; de Lima Junior, E.A.; Teixeira, A.A.; Biondo, L.A.; da Rocha, L.A.F.; Valadão, I.C.; Silveira, L.S.; Cabral-Santos, C.; de Souza, C.O.; Rosa Neto, J.C. Aerobic Training Improves NAFLD Markers and Insulin Resistance through AMPK-PPAR- α Signaling in Obese Mice. *Life Sci.* **2021**, *266*, 118868, doi:10.1016/j.lfs.2020.118868.
 103. Sugimoto, T.; Uchitomi, R.; Onishi, T.; Kamei, Y. A Combination of Exercise and Calorie Restriction Improves the Development of Obesity-Related Type 2 Diabetes Mellitus in KKAy Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2023**, *87*, 108–113, doi:10.1093/bbb/zbac170.
 104. NCI ¿Qué es el cáncer? - NCI Available online: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> (accessed on 22 February 2024).
 105. OMS Cáncer Available online: <https://www.who.int/es/health-topics/cancer> (accessed on 22 February 2024).
 106. SEOM Cáncer de Colon y Recto - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 Available online: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?start=2> (accessed on 22 February 2024).
 107. ACS ¿Qué es el cáncer colorrectal?. ¿Cómo se origina el cáncer colorrectal?. Available online: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/acerca/que-es-cancer-de-colon-o-recto.html> (accessed on 22 February 2024).
 108. Hossain, Md.S.; Karuniawati, H.; Jairoun, A.A.; Urbi, Z.; Ooi, D.J.; John, A.; Lim, Y.C.; Kibria, K.M.K.; Mohiuddin, A.K.M.; Ming, L.C.; et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* **2022**, *14*, 1732, doi:10.3390/cancers14071732.
 109. Nguyen, L.H.; Goel, A.; Chung, D.C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 291–302, doi:10.1053/j.gastro.2019.08.059.
 110. Muzny, D.M.; Bainbridge, M.N.; Chang, K.; Dinh, H.H.; Drummond, J.A.; Fowler, G.; Kovar, C.L.; Lewis, L.R.; Morgan, M.B.; Newsham, I.F.; et al. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* **2012**, *487*, 330–337, doi:https://doi.org/10.1038/nature11252.
 111. NCI Estadificación del cáncer - NCI Available online: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion> (accessed on 22 February 2024).
 112. Anchimowicz, J.; Wyżewski, Z.; Świtlik, W. [Role of the glucosinolates in cancer epigenetics]. *Postepy Biochem.* **2023**, *69*, 96–103, doi:10.18388/pb.2023_478.
-

113. Guo, S.; Chen, M.; Li, S.; Geng, Z.; Jin, Y.; Liu, D. Natural Products Treat Colorectal Cancer by Regulating miRNA. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1122, doi:10.3390/ph16081122.
114. Huang, Z.; Yang, M. Molecular Network of Colorectal Cancer and Current Therapeutic Options. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 852927, doi:10.3389/fonc.2022.852927.
115. Sedlak, J.C.; Yilmaz, Ö.H.; Roper, J. Metabolism and Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **2023**, *18*, 467–492, doi:10.1146/annurev-pathmechdis-031521-041113.
116. Kim, J.C.; Bodmer, W.F. Genomic Landscape of Colorectal Carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2022**, *148*, 533–545, doi:10.1007/s00432-021-03888-w.
117. Cicio, A.; Serio, R.; Zizzo, M.G. Anti-Inflammatory Potential of Brassicaceae-Derived Phytochemicals: In Vitro and In Vivo Evidence for a Putative Role in the Prevention and Treatment of IBD. *Nutrients* **2022**, *15*, 31, doi:10.3390/nu15010031.
118. Hardt, L.; Mahamat-Saleh, Y.; Aune, D.; Schlesinger, S. Plant-Based Diets and Cancer Prognosis: A Review of Recent Research. *Curr. Nutr. Rep.* **2022**, *11*, 695–716, doi:10.1007/s13668-022-00440-1.
119. Vieira, A.R.; Abar, L.; Chan, D.S.M.; Vingeliene, S.; Polemiti, E.; Stevens, C.; Greenwood, D.; Norat, T. Foods and Beverages and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies, an Update of the Evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2017**, *28*, 1788–1802, doi:10.1093/annonc/mdx171.
120. Macharia, J.M.; Mwangi, R.W.; Rozmann, N.; Zsolt, K.; Varjas, T.; Uchechukwu, P.O.; Wagara, I.N.; Raposa, B.L. Medicinal Plants with Anti-Colorectal Cancer Bioactive Compounds: Potential Game-Changers in Colorectal Cancer Management. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *153*, 113383, doi:10.1016/j.biopha.2022.113383.
121. Marino, P.; Pepe, G.; Basilicata, M.; Vestuto, V.; Marzocco, S.; Autore, G.; Procino, A.; Gomez-Monterrey, I.; Manfra, M.; Campiglia, P. Potential Role of Natural Antioxidant Products in Oncological Diseases. *Antioxidants* **2023**, *12*, 704, doi:10.3390/antiox12030704.
122. Clapper, M.L.; Szarka, C.E. Glutathione S-Transferases--Biomarkers of Cancer Risk and Chemopreventive Response. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *111–112*, 377–388, doi:10.1016/s0009-2797(97)00174-9.
123. Fernández-Calderón, M.; Betés Ibáñez, M.T. La Aspirina En La Prevención Primaria Del Cáncer Colorrectal. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2012**, *35*, 261–267, doi:10.4321/S1137-66272012000200008.
124. Xu, Y.; Zhao, J.; Ma, Y.; Liu, J.; Cui, Y.; Yuan, Y.; Xiang, C.; Ma, D.; Liu, H. The Microbiome Types of Colorectal Tissue Are Potentially Associated with the Prognosis of Patients with Colorectal Cancer. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1100873, doi:10.3389/fmicb.2023.1100873.
125. Gong, D.; Adomako-Bonsu, A.G.; Wang, M.; Li, J. Three Specific Gut Bacteria in the Occurrence and Development of Colorectal Cancer: A Concerted Effort. *PeerJ* **2023**, *11*, e15777, doi:10.7717/peerj.15777.
126. Qu, R.; Zhang, Y.; Ma, Y.; Zhou, X.; Sun, L.; Jiang, C.; Zhang, Z.; Fu, W. Role of the Gut Microbiota and Its Metabolites in Tumorigenesis or Development of Colorectal Cancer. *Adv. Sci.* **2023**, *10*, 2205563, doi:10.1002/advs.202205563.

-
127. ACS Radioterapia contra el cáncer colorrectal | Radiación para tratar el cáncer colorrectal Available online: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/radioterapia.html> (accessed on 26 February 2024).
 128. AEMPS *Ficha Técnica Fluorouracilo Accord*; 2022;
 129. AEMPS *Ficha Técnica Capecitabina*; 2021;
 130. AEMPS *Ficha Técnica Oxaliplatino*; 2022;
 131. AEMPS *Ficha Técnica Irinotecán Fresenius*; 2022;
 132. NCI TAS-102 for Metastatic Colorectal Cancer Available online: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/research/tas-102-overall-survival> (accessed on 28 February 2024).
 133. AEMPS *Ficha Técnica Lonsurf*; 2020;
 134. AEMPS *Ficha Técnica Raltitrexed*; 2021;
 135. Choi, H.Y.; Chang, J.-E. Targeted Therapy for Cancers: From Ongoing Clinical Trials to FDA-Approved Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13618, doi:10.3390/ijms241713618.
 136. Fuel, M.; Mesas, C.; Martínez, R.; Ortiz, R.; Quiñonero, F.; Prados, J.; Porres, J.M.; Melguizo, C. Antioxidant and Antiproliferative Potential of Ethanolic Extracts from Moringa Oleifera, Tropaeolum Tuberosum and Annona Cherimola in Colorectal Cancer Cells. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *143*, 112248, doi:10.1016/j.biopha.2021.112248.
 137. Mesas, C.; Martínez, R.; Doello, K.; Ortiz, R.; López-Jurado, M.; Bermúdez, F.; Quiñonero, F.; Prados, J.; Porres, J.M.; Melguizo, C. In Vivo Antitumor Activity of Euphorbia Lathyris Ethanol Extract in Colon Cancer Models. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *149*, 112883, doi:10.1016/j.biopha.2022.112883.
 138. Huang, X.; Yang, Z.; Xie, Q.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Ma, J. Natural Products for Treating Colorectal Cancer: A Mechanistic Review. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109142, doi:10.1016/j.biopha.2019.109142.
 139. Esmeeta, A.; Adhikary, S.; Dharshnaa, V.; Swarnamughi, P.; Ummul Maqsummiya, Z.; Banerjee, A.; Pathak, S.; Duttaroy, A.K. Plant-Derived Bioactive Compounds in Colon Cancer Treatment: An Updated Review. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *153*, 113384, doi:10.1016/j.biopha.2022.113384.
 140. Mori, N.; Murphy, N.; Sawada, N.; Achaintre, D.; Yamaji, T.; Scalbert, A.; Iwasaki, M.; Inoue, M.; Gunter, M.J.; Tsugane, S. Prediagnostic Plasma Polyphenol Concentrations and Colon Cancer Risk: The JPHC Nested Case–Control Study. *Clin. Nutr.* **2022**, *41*, 1950–1960, doi:10.1016/j.clnu.2022.06.041.
 141. Kapusta-Duch, J.; Kopeć, A.; Piatkowska, E.; Borczak, B.; Leszczyńska, T. The Beneficial Effects of Brassica Vegetables on Human Health. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **2012**, *63*, 389–395.
 142. Favela-González, K.M.; Hernández-Almanza, A.Y.; De la Fuente-Salcido, N.M. The Value of Bioactive Compounds of Cruciferous Vegetables (Brassica) as Antimicrobials and Antioxidants: A Review. *J. Food Biochem.* **2020**, *44*, e13414, doi:10.1111/jfbc.13414.
 143. Ramirez, D.; Abellán-Victorio, A.; Beretta, V.; Camargo, A.; Moreno, D.A. Functional Ingredients From Brassicaceae Species: Overview and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1998, doi:10.3390/ijms21061998.
 144. Peña, M.; Guzmán, A.; Martínez, R.; Mesas, C.; Prados, J.; Porres, J.M.; Melguizo, C. Preventive Effects of Brassicaceae Family for Colon Cancer Prevention: A
-

- Focus on in Vitro Studies. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2022**, *151*, 113145, doi:10.1016/j.biopha.2022.113145.
145. Quintero, M.F.; Castillo, O.G.; Sánchez, P.D.; Marín-Sánchez, J.; Guzmán, A.I.; Sánchez, A.; Guzmán, J.M. Relieving Dormancy and Improving Germination of Piquín Chili Pepper (*Capsicum Annuum* Var. *Glabriusculum*) by Priming Techniques. *Cogent Food Agric.* **2018**, *4*, 1550275, doi:10.1080/23311932.2018.1550275.
146. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
147. Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.K.; Liu, R.H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3010–3014, doi:10.1021/jf0115589.
148. Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **1993**, *84*, 407–412, doi:10.1042/cs0840407.
149. Duh, P.-D.; Tu, Y.-Y.; Yen, G.-C. Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum Morifolium* Ramat). *LWT - Food Sci. Technol.* **1999**, *32*, 269–277, doi:10.1006/fstl.1999.0548.
150. Kapravelou, G.; Martínez, R.; Andrade, A.M.; López Chaves, C.; López-Jurado, M.; Aranda, P.; Arrebola, F.; Cañizares, F.J.; Galisteo, M.; Porres, J.M. Improvement of the Antioxidant and Hypolipidaemic Effects of Cowpea Flours (*Vigna Unguiculata*) by Fermentation: Results of *in Vitro* and *in Vivo* Experiments: Health Benefits of Raw and Fermented *V. Unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 1207–1216, doi:10.1002/jsfa.6809.
151. Decker, E.A.; Welch, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 674–677, doi:10.1021/jf00093a019.
152. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358, doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
153. Li, Y.; Zhang, F.; Daroch, M.; Tang, J. Positive Effects of Duckweed Polycultures on Starch and Protein Accumulation. *Biosci. Rep.* **2016**, *36*, e00380, doi:10.1042/BSR20160158.
154. Martínez, R.; Kapravelou, G.; Porres, J.M.; Melesio, A.M.; Heras, L.; Cantarero, S.; Gribble, F.M.; Parker, H.; Aranda, P.; López-Jurado, M. Medicago Sativa L., a Functional Food to Relieve Hypertension and Metabolic Disorders in a Spontaneously Hypertensive Rat Model. *J. Funct. Foods* **2016**, *26*, 470–484, doi:10.1016/j.jff.2016.08.013.
155. Porres, J.; Aranda, P.; Lopez-Jurado, M.; Urbano, G. Nutritional Evaluation of Protein, Phosphorus, Calcium, and Magnesium Bioavailability from Lupin (*Lupinus Albus* Var. *Multolupa*)-Based Diets in Growing Rats: Effect of α -Galactoside Oligosaccharide Extraction and Phytase Supplementation. *Br. J. Nutr.* **2006**, *95*, 1102–1111, doi:10.1079/BJN20061771.
156. Martínez, R.; García-Beltrán, A.; Kapravelou, G.; Mesas, C.; Cabeza, L.; Perazzoli, G.; Guarnizo, P.; Rodríguez-López, A.; Andrés Vallejo, R.; Galisteo, M.; et al. In Vivo Nutritional Assessment of the Microalga *Nannochloropsis Gaditana* and

-
- Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Capacity of Its Functional Extracts. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 318, doi:10.3390/md20050318.
157. Hubrecht, R.C.; Carter, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Anim. Open Access J. MDPI* **2019**, *9*, 754, doi:10.3390/ani9100754.
158. Yang, W.; Liu, Y.; Yang, G.; Meng, B.; Yi, Z.; Yang, G.; Chen, M.; Hou, P.; Wang, H.; Xu, X. Moderate-Intensity Physical Exercise Affects the Exercise Performance and Gut Microbiota of Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 712381, doi:10.3389/fcimb.2021.712381.
159. Prieto, P.G.; Cancelas, J.; Villanueva-Peñacarrillo, M.L.; Valverde, I.; Malaisse, W.J. 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.* **2004**, *23*, 414–419, doi:10.1080/07315724.2004.10719386.
160. Pruessner, J.C.; Kirschbaum, C.; Meinlschmid, G.; Hellhammer, D.H. Two Formulas for Computation of the Area under the Curve Represent Measures of Total Hormone Concentration versus Time-Dependent Change. *Psychoneuroendocrinology* **2003**, *28*, 916–931, doi:10.1016/s0306-4530(02)00108-7.
161. Kovner, I.; Taicher, G.Z.; Mitchell, A.D. Calibration and Validation of EchoMRI™ Whole Body Composition Analysis Based on Chemical Analysis of Piglets, in Comparison with the Same for DXA. *Int. J. Body Compos. Res.* **2010**, *8*, 17–29.
162. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509, doi:10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
163. Cohen, G.; Kim, M.; Ogwu, V. A Modified Catalase Assay Suitable for a Plate Reader and for the Analysis of Brain Cell Cultures. *J. Neurosci. Methods* **1996**, *67*, 53–56, doi:10.1016/0165-0270(96)00011-8.
164. Lawrence, R.A.; Sunde, R.A.; Schwartz, G.L.; Hoekstra, W.G. Glutathione Peroxidase Activity in Rat Lens and Other Tissues in Relation to Dietary Selenium Intake. *Exp. Eye Res.* **1974**, *18*, 563–569, doi:10.1016/0014-4835(74)90062-1.
165. Ukeda, H.; Maeda, S.; Ishii, T.; Sawamura, M. Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on Tetrazolium Salt 3'-{1-[(Phenylamino)-Carbonyl]-3,4-Tetrazolium}-Bis(4-Methoxy-6-Nitro)Benzenesulfonic Acid Hydrate Reduction by Xanthine–Xanthine Oxidase. *Anal. Biochem.* **1997**, *251*, 206–209, doi:10.1006/abio.1997.2273.
166. Terrón-Camero, L.C.; Gordillo-González, F.; Salas-Espejo, E.; Andrés-León, E. Comparison of Metagenomics and Metatranscriptomics Tools: A Guide to Making the Right Choice. *Genes* **2022**, *13*, 2280, doi:10.3390/genes13122280.
167. Andrews, S. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 5 September 2023).
168. Ewels, P.; Magnusson, M.; Lundin, S.; Käller, M. MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3047–3048, doi:10.1093/bioinformatics/btw354.
169. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible,
-

- Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
170. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
171. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596, doi:10.1093/nar/gks1219.
172. Paulson, J.N.; Stine, O.C.; Bravo, H.C.; Pop, M. Differential Abundance Analysis for Microbial Marker-Gene Surveys. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 1200–1202, doi:10.1038/nmeth.2658.
173. Bialkowska, A.B.; Ghaleb, A.M.; Nandan, M.O.; Yang, V.W. Improved Swiss-Rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses. *J. Vis. Exp. JoVE* **2016**, 54161, doi:10.3791/54161.
174. NCI Definición de tinción con hematoxilina y eosina - Diccionario de cáncer del NCI - NCI Available online:
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/tincion-con-hematoxilina-y-eosina> (accessed on 5 March 2024).
175. Doello, K. A New Pentachrome Method for the Simultaneous Staining of Collagen and Sulfated Mucopolysaccharides. *Yale J. Biol. Med.* **2014**, *87*, 341–347.
176. Martínez, R.; Guzmán, A.; Kapravelou, G.; Melguizo, C.; Bermúdez, F.; Prados, J.; López-Jurado, M.; Porres, J.M. Argan Pulp as a Novel Functional Ingredient with Beneficial Effects on Multiple Metabolism Biomarkers. *J. Funct. Foods* **2023**, *110*, 105864, doi:10.1016/j.jff.2023.105864.
177. Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O.; Dyatmiko, W. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea Blumei*. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1144–1152, doi:10.1002/hlca.19970800411.
178. Cuendet, M.; Potterat, O.; Hostettmann, K. Flavonoids and Phenylpropanoid Derivatives from *Campanula Barbata*. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 631–636, doi:10.1016/s0031-9422(00)00423-4.
179. Hoshino, T.; Matsuzawa, S.; Takahashi, R. 6-Deoxyjacareubin, a Natural Compound Preventing Hypoxia-Induced Cell Death, Ameliorates Neurodegeneration in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci. Res.* **2021**, *163*, 43–51, doi:10.1016/j.neures.2020.02.011.
180. Menezes, J.C.J.M.D.S.; Diederich, M.F. Bioactivity of Natural Biflavonoids in Metabolism-Related Disease and Cancer Therapies. *Pharmacol. Res.* **2021**, *167*, 105525, doi:10.1016/j.phrs.2021.105525.
181. Wang, F.; Zhang, Y.; Wu, S.; He, Y.; Dai, Z.; Ma, S.; Liu, B. Studies of the Structure-Antioxidant Activity Relationships and Antioxidant Activity Mechanism of Iridoid Valepotriates and Their Degradation Products. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0189198, doi:10.1371/journal.pone.0189198.
182. Choi, W.; Kim, J.H.; Kim, D.K.; Lee, Y.; Yoo, J.S.; Shin, D.H.; Lee, H.S. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid Isomers and Metabolites in Rat Plasma Using LC-MS/MS and Its Application to A Pharmacokinetic Study

-
- Following Oral Administration of Stauntonia Hexaphylla Leaf Extract (YRA-1909) to Rats. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 143, doi:10.3390/pharmaceutics10030143.
183. Hong, H.; Lou, S.; Zheng, F.; Gao, H.; Wang, N.; Tian, S.; Huang, G.; Zhao, H. Hydnocarpin D Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via MAPK/NF- κ B and Keap1/Nrf2/HO-1 Pathway. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2022**, *101*, 154143, doi:10.1016/j.phymed.2022.154143.
184. Hwang, S.-J.; Song, Y.-S.; Lee, H.-J. Phaseolin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW 264.7 Cells and Zebrafish. *Biomedicines* **2021**, *9*, 420, doi:10.3390/biomedicines9040420.
185. Quek, A.; Mohd Zaini, H.; Kassim, N.K.; Sulaiman, F.; Rukayadi, Y.; Ismail, A.; Zainal Abidin, Z.; Awang, K. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) and Antibacterial Properties of Melicope Glabra Bark Extracts and Isolated Compounds. *PloS One* **2021**, *16*, e0251534, doi:10.1371/journal.pone.0251534.
186. Vaya, J.; Belinky, P.A.; Aviram, M. Antioxidant Constituents from Licorice Roots: Isolation, Structure Elucidation and Antioxidative Capacity toward LDL Oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 302–313, doi:10.1016/s0891-5849(97)00089-0.
187. Zhou, Y.; Gao, C.; Vong, C.T.; Tao, H.; Li, H.; Wang, S.; Wang, Y. Rhein Regulates Redox-Mediated Activation of NLRP3 Inflammasomes in Intestinal Inflammation through Macrophage-Activated Crosstalk. *Br. J. Pharmacol.* **2022**, *179*, 1978–1997, doi:10.1111/bph.15773.
188. Chen, L.; Chen, S.; Sun, P.; Liu, X.; Zhan, Z.; Wang, J. Psoralea Corylifolia L.: A Comprehensive Review of Its Botany, Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, Toxicology, Quality Control and Pharmacokinetics. *Chin. Med.* **2023**, *18*, 4, doi:10.1186/s13020-022-00704-6.
189. Abdulai, I.L.; Kwofie, S.K.; Gbewonyo, W.S.; Boison, D.; Puplampu, J.B.; Adinortey, M.B. Multitargeted Effects of Vitexin and Isovitexin on Diabetes Mellitus and Its Complications. *Sci. World J.* **2021**, *2021*, 1–20, doi:10.1155/2021/6641128.
190. Yang, T.; Chen, W.; Gan, K.; Wang, C.; Xie, X.; Su, Y.; Lian, H.; Xu, J.; Zhao, J.; Liu, Q. Myrislignan Targets Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and Modulates Mitochondrial Function to Dampen Osteoclastogenesis and Ovariectomy-Induced Osteoporosis. *J. Transl. Med.* **2023**, *21*, 839, doi:10.1186/s12967-023-04706-2.
191. Pagliuso, D.; Palacios Jara, C.E.; Grandis, A.; Lam, E.; Pena Ferreira, M.J.; Buckeridge, M.S. Flavonoids from Duckweeds: Potential Applications in the Human Diet. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 44981–44988, doi:10.1039/d0ra06741e.
192. Martínez, R.; Kapravelou, G.; Donaire, A.; Lopez-Chaves, C.; Arrebola, F.; Galisteo, M.; Cantarero, S.; Aranda, P.; Porres, J.M.; López-Jurado, M. 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.* **2018**, *9*, 830–850, doi:10.1039/C7FO01790A.
193. Oseguera-Toledo, M.E.; de Mejia, E.G.; Dia, V.P.; Amaya-Llano, S.L. Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Hydrolysates Inhibit Inflammation in LPS-Induced Macrophages through Suppression of NF- κ B Pathways. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1175–1185, doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.121.
-

194. Di Lorenzo, C.; Colombo, F.; Biella, S.; Stockley, C.; Restani, P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* **2021**, *13*, 273, doi:10.3390/nu13010273.
195. Liu, R.H. Health Benefits of Fruit and Vegetables Are from Additive and Synergistic Combinations of Phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 517S-520S, doi:10.1093/ajcn/78.3.517S.
196. Zhang, L.; Virgous, C.; Si, H. Synergistic Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Combined Phytochemicals. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *69*, 19–30, doi:10.1016/j.jnutbio.2019.03.009.
197. Ma, S.; Wang, X.; Lai, F.; Lou, C. The Beneficial Pharmacological Effects and Potential Mechanisms of Picoside II: Evidence of Its Benefits from *in Vitro* and *in Vivo*. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110421, doi:10.1016/j.biopha.2020.110421.
198. Lai, C.-S.; Lee, J.H.; Ho, C.-T.; Liu, C.B.; Wang, J.-M.; Wang, Y.-J.; Pan, M.-H. Rosmanol Potently Inhibits Lipopolysaccharide-Induced iNOS and COX-2 Expression through Downregulating MAPK, NF-kappaB, STAT3 and C/EBP Signaling Pathways. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10990–10998, doi:10.1021/jf9025713.
199. Li, Y.; Goto, T.; Ikutani, R.; Lin, S.; Takahashi, N.; Takahashi, H.; Jheng, H.-F.; Yu, R.; Taniguchi, M.; Baba, K.; et al. Xanthoangelol and 4-Hydroxyderricin Suppress Obesity-Induced Inflammatory Responses. *Obesity* **2016**, *24*, 2351–2360, doi:10.1002/oby.21611.
200. Yuan, S.; Gao, P.; Shi, Y.; Tu, P.; Jiang, Y. Rapid Screening and Identification of Metabolites of Murpanicin in Rats by UHPLC/Q-TOF-MS/MS Combined with Diagnostic Fragment Ions (DFIs) and Multiple Mass Defect Filter. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2022**, *213*, 114679, doi:10.1016/j.jpba.2022.114679.
201. Heiker, J.T.; Kunath, A.; Kosacka, J.; Flehmig, G.; Knigge, A.; Kern, M.; Stumvoll, M.; Kovacs, P.; Blüher, M.; Klötting, N. Identification of Genetic Loci Associated with Different Responses to High-Fat Diet-Induced Obesity in C57BL/6N and C57BL/6J Substrains. *Physiol. Genomics* **2014**, *46*, 377–384, doi:10.1152/physiolgenomics.00014.2014.
202. Siersbæk, M.S.; Ditzel, N.; Hejbøl, E.K.; Præstholm, S.M.; Markussen, L.K.; Avolio, F.; Li, L.; Lehtonen, L.; Hansen, A.K.; Schrøder, H.D.; et al. C57BL/6J Substrain Differences in Response to High-Fat Diet Intervention. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14052, doi:10.1038/s41598-020-70765-w.
203. Shen, L.; Yang, Y.; Zhang, J.; Feng, L.; Zhou, Q. Diacylated Anthocyanins from Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Attenuate Hyperglycemia and Hyperuricemia in Mice Induced by a High-Fructose/High-Fat Diet. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2023**, *24*, 587–601, doi:10.1631/jzus.B2200587.
204. García-Beltrán, A.; Martínez, R.; Porres, J.M.; Arrebola, F.; Ruiz Artero, I.; Galisteo, M.; Aranda, P.; Kapravelou, G.; Lopez-Jurado, M. Novel Insights and Mechanisms of Diet-Induced Obesity: Mid-Term versus Long-Term Effects on Hepatic Transcriptome and Antioxidant Capacity in Sprague-Dawley Rats | Elsevier Enhanced Reader (accessed on 15 May 2023).
205. Ferrara, P.J.; Lang, M.J.; Johnson, J.M.; Watanabe, S.; McLaughlin, K.L.; Maschek, J.A.; Verkerke, A.R.P.; Siripoksup, P.; Chaix, A.; Cox, J.E.; et al. Weight Loss Increases Skeletal Muscle Mitochondrial Energy Efficiency in Obese Mice. *Life Metab.* **2023**, *2*, load014, doi:10.1093/lifemeta/load014.

-
206. Allerton, T.D.; Kowalski, G.M.; Stampley, J.; Irving, B.A.; Lighton, J.R.B.; Floyd, Z.E.; Stephens, J.M. An Ethanolic Extract of *Artemisia Dracunculus* L. Enhances the Metabolic Benefits of Exercise in Diet-Induced Obese Mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2021**, *53*, 712–723, doi:10.1249/MSS.0000000000002516.
207. Zhang, Y.; Gu, M.; Wang, R.; Li, M.; Li, D.; Xie, Z. Dietary Supplement of Yunkang 10 Green Tea and Treadmill Exercise Ameliorate High Fat Diet Induced Metabolic Syndrome of C57BL/6 J Mice. *Nutr. Metab.* **2020**, *17*, 14, doi:10.1186/s12986-020-0433-9.
208. Lopez Trinidad, L.M.; Martinez, R.; Kapravelou, G.; Galisteo, M.; Aranda, P.; Porres, J.M.; Lopez-Jurado, M. Caloric Restriction, Physical Exercise, and CB1 Receptor Blockade as an Efficient Combined Strategy for Bodyweight Control and Cardiometabolic Status Improvement in Male Rats. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4286, doi:10.1038/s41598-021-83709-9.
209. Pan, X.; Zhang, X.; Ban, J.; Yue, L.; Ren, L.; Chen, S. Effects of High-Fat Diet on Cardiovascular Protein Expression in Mice Based on Proteomics. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2023**, *16*, 873–882, doi:10.2147/DMSO.S405327.
210. Porres, J.M.; Constantino, J.; Kapravelou, G.; Lopez-Chaves, C.; Galisteo, M.; Aranda, P.; López-Jurado, M.; Martínez, R. The Combined Treatment with Lentil Protein Hydrolysate and a Mixed Training Protocol Is an Efficient Lifestyle Intervention to Manage Cardiovascular and Renal Alterations in Obese Zucker Rats. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 3473–3490, doi:10.1007/s00394-020-02181-9.
211. Tarantino, G.; Citro, V.; Conforti, P.; Balsano, C.; Capone, D. Is There a Link between Basal Metabolic Rate, Spleen Volume and Hepatic Growth Factor Levels in Patients with Obesity-Related NAFLD? *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1510, doi:10.3390/jcm8101510.
212. Nebot, E.; Martínez, R.; Kapravelou, G.; Sánchez, C.; Llopis, J.; Aranda, P.; Porres, J.M.; López-Jurado, M.; Pietschmann, P. Combination of Caloric Restriction and a Mixed Training Protocol as an Effective Strategy to Counteract the Deleterious Effects in Trabecular Bone Microarchitecture Caused by a Diet-Induced Obesity in Sprague Dawley Rats. *Nutrients* **2022**, *14*, 3672, doi:10.3390/nu14183672.
213. Costa, M.C.; Lima, T.F.O.; Arcaro, C.A.; Inacio, M.D.; Batista-Duharte, A.; Carlos, I.Z.; Spolidorio, L.C.; Assis, R.P.; Brunetti, I.L.; Baviera, A.M. Trigonelline and Curcumin Alone, but Not in Combination, Counteract Oxidative Stress and Inflammation and Increase Glycation Product Detoxification in the Liver and Kidney of Mice with High-Fat Diet-Induced Obesity. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *76*, 108303, doi:10.1016/j.jnutbio.2019.108303.
214. Lambert, K.; Demion, M.; Lagacé, J.-C.; Hokayem, M.; Dass, M.; Virsolvy, A.; Jover, B.; Bourret, A.; Bisbal, C. Grape Polyphenols and Exercise Training Have Distinct Molecular Effects on Cardiac Hypertrophy in a Model of Obese Insulin-Resistant Rats. *J. Nutr. Biochem.* **2021**, *87*, 108522, doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108522.
215. Geng, L.; Liao, B.; Jin, L.; Huang, Z.; Triggle, C.R.; Ding, H.; Zhang, J.; Huang, Y.; Lin, Z.; Xu, A. Exercise Alleviates Obesity-Induced Metabolic Dysfunction via Enhancing FGF21 Sensitivity in Adipose Tissues. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2738-2752.e4, doi:10.1016/j.celrep.2019.02.014.
-

216. Benard, O.; Lim, J.; Apontes, P.; Jing, X.; Angeletti, R.H.; Chi, Y. Impact of High-Fat Diet on the Proteome of Mouse Liver. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *31*, 10–19, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.012.
217. Lasker, S.; Rahman, M.M.; Parvez, F.; Zamila, M.; Miah, P.; Nahar, K.; Kabir, F.; Sharmin, S.B.; Subhan, N.; Ahsan, G.U.; et al. High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome and Oxidative Stress in Obese Rats Are Ameliorated by Yogurt Supplementation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20026, doi:10.1038/s41598-019-56538-0.
218. Xu, L.; Kitade, H.; Ni, Y.; Ota, T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules* **2015**, *5*, 1563–1579, doi:10.3390/biom5031563.
219. Wen, F.; Dai, P.; Song, Z.; Jin, C.; Ji, X.; Hou, J.; Liu, N. Alleviating Effect of Mulberry Leaf 1-Deoxynojirimycin on Resistin-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **2022**, *73*, doi:10.26402/jpp.2022.6.07.
220. Kandilarov, I.; Gardjeva, P.; Georgieva-Kotetarova, M.; Zlatanova, H.; Vilmosh, N.; Kostadinova, I.; Katsarova, M.; Atliev, K.; Dimitrova, S. Effect of Plant Extracts Combinations on TNF- α , IL-6 and IL-10 Levels in Serum of Rats Exposed to Acute and Chronic Stress. *Plants* **2023**, *12*, 3049, doi:10.3390/plants12173049.
221. Liu, J.; Zhang, W.; Li, Y.; Li, X.; Li, Y.; Guo, F. Flavonoids Extract from the Seeds of *Psoralea Corylifolia* L. (PFE) Alleviates Atherosclerosis in High-Fat Diet-Induced LDLR^{-/-} Mice. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2022**, *98*, 153983, doi:10.1016/j.phymed.2022.153983.
222. Kim, K.; Lee, D.; Kim, H.-Y.; Kim, S.; Lyu, J.-H.; Park, S.; Park, Y.-C.; Kim, H. Anti-Inflammatory Effects of *Spirodela Polyrhiza* (L.) SCHLEID. Extract on Contact Dermatitis in Mice—Its Active Compounds and Molecular Targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13271, doi:10.3390/ijms241713271.
223. Kirwan, J.P.; Heintz, E.C.; Rebello, C.J.; Axelrod, C.L. Exercise in the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes. In *Comprehensive Physiology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2023; pp. 4559–4585 ISBN 978-0-470-65071-4.
224. Bishop, N.C.; Wadley, A.J.; Hamrouni, M.; Roberts, M.J. Inactivity and Obesity: Consequences for Macrophage-Mediated Inflammation and the Development of Cardiometabolic Disease. *Proc. Nutr. Soc.* **2023**, *82*, 13–21, doi:10.1017/S0029665122002671.
225. Pieri, B.L. da S.; Rodrigues, M.S.; Farias, H.R.; Silveira, G. de B.; Ribeiro, V. de S.G. da C.; Silveira, P.C.L.; De Souza, C.T. Role of Oxidative Stress on Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12088, doi:10.3390/ijms241512088.
226. Xue, Y.; Xu, J.; Li, M.; Gao, Y. Potential Screening Indicators for Early Diagnosis of NAFLD/MAFLD and Liver Fibrosis: Triglyceride Glucose Index-Related Parameters. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 951689, doi:10.3389/fendo.2022.951689.
227. Zheng, M.; Wang, L.; Sun, Y.; Pi, X.; Zhang, W.; Gao, P.; Lu, S.; Liu, W. Hypoglycemic Effect of the *Phellinus Baumii* Extract with α -Glucosidase-Inhibited Activity and Its Modulation to Gut Microbiota in Diabetic Patients. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2023**, *158*, 114130, doi:10.1016/j.biopha.2022.114130.

-
228. Tsykalo, T.O.; Trzhetsynskyi, S.D. The Study of Hypoglycemic and Hypolipidemic Activity of *Camelina Sativa* (L.) Crantz Extracts in Rats under Conditions of High-Fructose Diet. *Ceska Slov. Farm. Cas. Ceske Farm. Spolecnosti Slov. Farm. Spolecnosti* **2020**, *69*, 137–142.
229. Hong, Y.; Choi, S.-I.; Hong, E.; Kim, G.-H. Psoralea Corylifolia L. Extract Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Free-Fatty-Acid-Incubated HEPG2 Cells and in High-Fat Diet-Fed Mice. *J. Food Sci.* **2020**, *85*, 2216–2226, doi:10.1111/1750-3841.15166.
230. Vitulo, M.; Gnodi, E.; Rosini, G.; Meneveri, R.; Giovannoni, R.; Barisani, D. Current Therapeutical Approaches Targeting Lipid Metabolism in NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12748, doi:10.3390/ijms241612748.
231. Roberts, C.K.; Hevener, A.L.; Barnard, R.J. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. In *Comprehensive Physiology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2013; pp. 1–58 ISBN 978-0-470-65071-4.
232. Vieira-Lara, M.A.; Reijne, A.C.; Koshian, S.; Ciapaite, J.; Abegaz, F.; Talarovicova, A.; van Dijk, T.H.; Versloot, C.J.; Bandsma, R.H.J.; Wolters, J.C.; et al. Age and Diet Modulate the Insulin-Sensitizing Effects of Exercise: A Tracer-Based Oral Glucose Tolerance Test. *Diabetes* **2023**, *72*, 872–883, doi:10.2337/db22-0746.
233. Han, X.; Yang, Y.; Liu, S.; Niu, Y.; Shao, H.; Fu, L. Aerobic Exercise Ameliorates Insulin Resistance in C57BL/6 J Mice via Activating Sestrin3. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2023**, *1869*, 166568, doi:10.1016/j.bbadis.2022.166568.
234. Lang, Y.-Y.; Xu, X.-Y.; Liu, Y.-L.; Ye, C.-F.; Hu, N.; Yao, Q.; Cheng, W.-S.; Cheng, Z.-G.; Liu, Y. Ghrelin Relieves Obesity-Induced Myocardial Injury by Regulating the Epigenetic Suppression of miR-196b Mediated by lncRNA HOTAIR. *Obes. Facts* **2022**, *15*, 540–549, doi:10.1159/000523870.
235. Li, Z.; Zhang, B.; Wang, N.; Zuo, Z.; Wei, H.; Zhao, F. A Novel Peptide Protects against Diet-Induced Obesity by Suppressing Appetite and Modulating the Gut Microbiota. *Gut* **2023**, *72*, 686–698, doi:10.1136/gutjnl-2022-328035.
236. Haan, Y.C.; Oudman, I.; Diemer, F.S.; Karamat, F.A.; van Valkengoed, I.G.; van Montfrans, G.A.; Brewster, L.M. Creatine Kinase as a Marker of Obesity in a Multi-Ethnic Population. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, *442*, 24–31, doi:10.1016/j.mce.2016.11.022.
237. Cao, H.; Li, C.; Wang, L.; Ziadlou, R.; Grad, S.; Zhang, Y.; Cheng, Y.; Lai, Y.; Yao, X.; Alini, M.; et al. Effect and Mechanism of Psoralidin on Promoting Osteogenesis and Inhibiting Adipogenesis. *Phytomedicine* **2019**, *61*, 152860, doi:10.1016/j.phymed.2019.152860.
238. Goudriaan, J.R.; Dahlmans, V.E.H.; Teusink, B.; Ouwens, D.M.; Febbraio, M.; Maassen, J.A.; Romijn, J.A.; Havekes, L.M.; Voshol, P.J. CD36 Deficiency Increases Insulin Sensitivity in Muscle, but Induces Insulin Resistance in the Liver in Mice. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 2270–2277, doi:10.1194/jlr.M300143-JLR200.
239. Li, Y.; Huang, X.; Yang, G.; Xu, K.; Yin, Y.; Brechia, G.; Yin, J. CD36 Favours Fat Sensing and Transport to Govern Lipid Metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2022**, *88*, 101193, doi:10.1016/j.plipres.2022.101193.
240. Li, Y.; Feng, Z.; Wu, T.; You, H.; Wang, W.; Liu, X.; Ding, L. Quinoa Peptides Alleviate Obesity in Mice Induced by a High-Fat Diet via Regulating of the
-

- PPAR- α/γ Signaling Pathway and Gut Microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2023**, *n/a*, 2300258, doi:10.1002/mnfr.202300258.
241. Rigano, D.; Sirignano, C.; Tagliatalata-Scafati, O. The Potential of Natural Products for Targeting PPAR α . *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, *7*, 427–438, doi:10.1016/j.apsb.2017.05.005.
242. Shimizu, K.; Nishimuta, S.; Fukumura, Y.; Michinaga, S.; Egusa, Y.; Hase, T.; Terada, T.; Sakurai, F.; Mizuguchi, H.; Tomita, K.; et al. Liver-Specific Overexpression of Lipoprotein Lipase Improves Glucose Metabolism in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0274297, doi:10.1371/journal.pone.0274297.
243. Sun, Q.; Xing, X.; Wang, H.; Wan, K.; Fan, R.; Liu, C.; Wang, Y.; Wu, W.; Wang, Y.; Wang, R. SCD1 Is the Critical Signaling Hub to Mediate Metabolic Diseases: Mechanism and the Development of Its Inhibitors. *Biomed. Pharmacother.* **2024**, *170*, 115586, doi:10.1016/j.biopha.2023.115586.
244. Freitas, E.D.S.; Kras, K.A.; Roust, L.R.; De Filippis, E.A.; Kimball, S.R.; Buras, M.; Katsanos, C.S. Lower Muscle Protein Synthesis in Humans with Obesity Concurrent with Lower Expression of Muscle IGF1 Splice Variants. *Obesity* **2023**, *31*, 2689–2698, doi:10.1002/oby.23896.
245. He, Y.; Wang, Q.; Wu, H.; Dong, Y.; Peng, Z.; Guo, X.; Jiang, N. The Role of IGF-1 in Exercise to Improve Obesity-Related Cognitive Dysfunction. *Front. Neurosci.* **2023**, *17*, 1229165, doi:10.3389/fnins.2023.1229165.
246. Peterson, T.R.; Sengupta, S.S.; Harris, T.E.; Carmack, A.E.; Kang, S.A.; Balderas, E.; Guertin, D.A.; Madden, K.L.; Carpenter, A.E.; Finck, B.N.; et al. mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* **2011**, *146*, 408–420, doi:10.1016/j.cell.2011.06.034.
247. Renard, P.; Caccavelli, L.; Legendre, A.; Tuchmann-Durand, C.; Balakirouchenane, D.; Blanchet, B.; Narjoz, C.; Straube, M.; Hubas, A.; Garros, A.; et al. Hydroxychloroquine Sulfate: A Novel Treatment for Lipin-1 Deficiency? *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *163*, 114813, doi:10.1016/j.biopha.2023.114813.
248. Jama, A.; Huang, D.; Alshudukhi, A.A.; Chrast, R.; Ren, H. Lipin1 Is Required for Skeletal Muscle Development by Regulating MEF2c and MyoD Expression. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 889–901, doi:10.1113/JP276919.
249. LaPoint, A.; Singer, J.M.; Ferguson, D.; Shew, T.M.; Renkemeyer, M.K.; Palacios, H.; Field, R.; Shankaran, M.; Smith, G.I.; Yoshino, J.; et al. *Adipocyte Lipin 1 Is Positively Associated with Metabolic Health in Humans and Regulates Systemic Metabolism in Mice*; Physiology, 2023;
250. Huang, Y.; Zhou, M.; Li, C.; Chen, Y.; Fang, W.; Xu, G.; Shi, X. Picroside II Protects against Sepsis via Suppressing Inflammation in Mice. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 5519–5531.
251. Dhami-Shah, H.; Vaidya, R.; Udipi, S.; Raghavan, S.; Abhijit, S.; Mohan, V.; Balasubramanyam, M.; Vaidya, A. Picroside II Attenuates Fatty Acid Accumulation in HepG2 Cells via Modulation of Fatty Acid Uptake and Synthesis. *Clin. Mol. Hepatol.* **2018**, *24*, 77–87, doi:10.3350/cmh.2017.0039.
252. Hui, Y.; Wang, X.; Yu, Z.; Fan, X.; Cui, B.; Zhao, T.; Mao, L.; Feng, H.; Lin, L.; Yu, Q.; et al. Scoparone as a Therapeutic Drug in Liver Diseases: Pharmacology,

-
- Pharmacokinetics and Molecular Mechanisms of Action. *Pharmacol. Res.* **2020**, *160*, 105170, doi:10.1016/j.phrs.2020.105170.
253. Liu, B.; Deng, X.; Jiang, Q.; Li, G.; Zhang, J.; Zhang, N.; Xin, S.; Xu, K. Scoparone Improves Hepatic Inflammation and Autophagy in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis by Regulating the ROS/P38/Nrf2 Axis and PI3K/AKT/mTOR Pathway in Macrophages. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *125*, 109895, doi:10.1016/j.biopha.2020.109895.
254. Sun, C.; Zhang, J.; Hou, J.; Hui, M.; Qi, H.; Lei, T.; Zhang, X.; Zhao, L.; Du, H. Induction of Autophagy via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway by Pueraria Flavonoids Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Mice. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *157*, 114005, doi:10.1016/j.biopha.2022.114005.
255. Amadi, J.A.; Amadi, P.U.; Njoku, U.C.; Onitchi, C.L. Lettuce-Avicularin Treatment Reverses Insulin Resistance through Stimulation of Glycolytic Kinases and Insulin Signaling Molecules. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2021**, *24*, 232–239, doi:10.22038/ijbms.2020.49770.11368.
256. Hasegawa, Y.; Pei, R.; Raghuvanshi, R.; Liu, Z.; Bolling, B.W. Yogurt Supplementation Attenuates Insulin Resistance in Obese Mice by Reducing Metabolic Endotoxemia and Inflammation. *J. Nutr.* **2023**, *153*, 703–712, doi:10.1016/j.tjnut.2023.01.021.
257. Wang, T.-Y.; Tao, S.-Y.; Wu, Y.-X.; An, T.; Lv, B.-H.; Liu, J.-X.; Liu, Y.-T.; Jiang, G.-J. Quinoa Reduces High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Potential Microbiota-Gut-Brain-Liver Interaction Mechanisms. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e00329-22, doi:10.1128/spectrum.00329-22.
258. Cheng, H.; Zhang, D.; Wu, J.; Liu, J.; Zhou, Y.; Tan, Y.; Feng, W.; Peng, C. Interactions between Gut Microbiota and Polyphenols: A Mechanistic and Metabolomic Review. *Phytomedicine* **2023**, *119*, 154979, doi:10.1016/j.phymed.2023.154979.
259. Kendig, M.D.; Leigh, S.-J.; Hasebe, K.; Kaakoush, N.O.; Westbrook, R.F.; Morris, M.J. Obesogenic Diet Cycling Produces Graded Effects on Cognition and Microbiota Composition in Rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2023**, *67*, 2200809, doi:10.1002/mnfr.202200809.
260. Chen, J.; Xiao, Y.; Li, D.; Zhang, S.; Wu, Y.; Zhang, Q.; Bai, W. New Insights into the Mechanisms of High-Fat Diet Mediated Gut Microbiota in Chronic Diseases. *iMeta* **2023**, *2*, e69, doi:10.1002/imt2.69.
261. Masenga, S.K.; Kabwe, L.S.; Chakulya, M.; Kirabo, A. Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7898, doi:10.3390/ijms24097898.
262. Fusco, W.; Lorenzo, M.B.; Cintoni, M.; Porcari, S.; Rinninella, E.; Kaitsas, F.; Lener, E.; Mele, M.C.; Gasbarrini, A.; Collado, M.C.; et al. Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients* **2023**, *15*, 2211, doi:10.3390/nu15092211.
263. Martínez-Cuesta, M.C.; del Campo, R.; Garriga-García, M.; Peláez, C.; Requena, T. Taxonomic Characterization and Short-Chain Fatty Acids Production of the Obese Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*.
264. Krajmalnik-Brown, R.; Ilhan, Z.-E.; Kang, D.-W.; DiBaise, J.K. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutr. Clin. Pract.* **2012**, *27*, 201–214, doi:10.1177/0884533611436116.
-

265. Caricilli, A.M.; Saad, M.J.A. The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. *Nutrients* **2013**, *5*, 829–851, doi:10.3390/nu5030829.
266. Ruan, S.; Gao, X.; Li, B.; Tian, J. The Synergic Effects and Mechanism of KGM–DMY Complex in the Prevention of Obesity and Enhancement of Fatigue Resistance in Mice. *Food Funct.* **2023**, *14*, 2607–2620, doi:10.1039/D2FO03677K.
267. Yu, Q.; Yu, F.; Li, Q.; Zhang, J.; Peng, Y.; Wang, X.; Li, T.; Yin, N.; Sun, G.; Ouyang, H.; et al. Anthocyanin-Rich Butterfly Pea Flower Extract Ameliorating Low-Grade Inflammation in a High-Fat-Diet and Lipopolysaccharide-Induced Mouse Model. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 11941–11956, doi:10.1021/acs.jafc.3c02696.
268. Wang, X.; Duan, C.; Li, Y.; Lu, H.; Guo, K.; Ge, X.; Chen, T.; Shang, Y.; Liu, H.; Zhang, D. Sodium Butyrate Reduces Overnutrition-Induced Microglial Activation and Hypothalamic Inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **2022**, *111*, 109083, doi:10.1016/j.intimp.2022.109083.
269. Peters, B.A.; Shapiro, J.A.; Church, T.R.; Miller, G.; Trinh-Shevrin, C.; Yuen, E.; Friedlander, C.; Hayes, R.B.; Ahn, J. A Taxonomic Signature of Obesity in a Large Study of American Adults. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9749, doi:10.1038/s41598-018-28126-1.
270. Wang, B.; Jiang, X.; Cao, M.; Ge, J.; Bao, Q.; Tang, L.; Chen, Y.; Li, L. Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32002, doi:10.1038/srep32002.
271. Cheng, L.; Wei, Y.; Xu, L.; Peng, L.; Wang, Y.; Wei, X. Gut Microbiota Differentially Mediated by Qingmao Tea and Qingzhuan Tea Alleviated High-Fat-Induced Obesity and Associated Metabolic Disorders: The Impact of Microbial Fermentation. *Foods* **2022**, *11*, 3210, doi:10.3390/foods11203210.
272. Silva, J.S.C.; Seguro, C.S.; Naves, M.M.V. Gut Microbiota and Physical Exercise in Obesity and Diabetes – A Systematic Review. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2022**, *32*, 863–877, doi:10.1016/j.numecd.2022.01.023.
273. Palliyaguru, D.L.; Yuan, J.-M.; Kensler, T.W.; Fahey, J.W. Isothiocyanates: Translating the Power of Plants to People. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1700965, doi:10.1002/mnfr.201700965.
274. Atwell, L.L.; Zhang, Z.; Mori, M.; Farris, P.E.; Vetto, J.T.; Naik, A.M.; Oh, K.Y.; Thuillier, P.; Ho, E.; Shannon, J. Sulforaphane Bioavailability and Chemopreventive Activity in Women Scheduled for Breast Biopsy. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **2015**, *8*, 1184–1191, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0119.
275. Zhang, Z.; Garzotto, M.; Davis, E.W.; Mori, M.; Stoller, W.A.; Farris, P.E.; Wong, C.P.; Beaver, L.M.; Thomas, G.V.; Williams, D.E.; et al. Sulforaphane Bioavailability and Chemopreventive Activity in Men Presenting for Biopsy of the Prostate Gland: A Randomized Controlled Trial. *Nutr. Cancer* **2020**, *72*, 74–87, doi:10.1080/01635581.2019.1619783.
276. Rahman, M.M.; Abdullah, A.T.M.; Sharif, M.; Jahan, S.; Kabir, M.A.; Motalab, M.; Khan, T.A. Relative Evaluation of In-Vitro Antioxidant Potential and Phenolic Constituents by HPLC-DAD of Brassica Vegetables Extracted in Different Solvents. *Heliyon* **2022**, *8*, e10838, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10838.
277. Chirumbolo, S.; Bjørklund, G. Homeopathic Dilutions, Hahnemann Principles, and the Solvent Issue: Must We Address Ethanol as a “Homeopathic” or a “Chemical” Issue? *Homeopathy J. Fac. Homeopathy* **2018**, *107*, 40–44, doi:10.1055/s-0037-1608898.

-
278. Rivers-Auty, J.; Ashton, J.C. Vehicles for Lipophilic Drugs: Implications for Experimental Design, Neuroprotection, and Drug Discovery. *Curr. Neurovasc. Res.* **2013**, *10*, 356–360, doi:10.2174/15672026113109990021.
279. Thounaojam, M.C.; Jadeja, R.N.; Sankhari, J.M.; Devkar, R.V.; Ramachandran, A.V. Safety Evaluations on Ethanolic Extract of Red Cabbage (*Brassica Oleracea* L.) in Mice. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, T35-39, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01962.x.
280. Nakakaawa, L.; Gbala, I.D.; Cheseto, X.; Bargul, J.L.; Wesonga, J.M. Oral Acute, Sub-Acute Toxicity and Phytochemical Profile of *Brassica Carinata* A. Braun Microgreens Ethanolic Extract in Wistar Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2023**, *305*, 116121, doi:10.1016/j.jep.2022.116121.
281. Khalil, N.; Gad, H.A.; Al Musayeib, N.M.; Bishr, M.; Ashour, M.L. Correlation of Glucosinolates and Volatile Constituents of Six Brassicaceae Seeds with Their Antioxidant Activities Based on Partial Least Squares Regression. *Plants* **2022**, *11*, 1116, doi:10.3390/plants11091116.
282. Abd-Elsalam, R.M.; El Badawy, S.A.; Ogaly, H.A.; Ibrahim, F.M.; Farag, O.M.; Ahmed, K.A. *Eruca Sativa* Seed Extract Modulates Oxidative Stress and Apoptosis and Up-Regulates the Expression of Bcl-2 and Bax Genes in Acrylamide-Induced Testicular Dysfunction in Rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2021**, *28*, 53249–53266, doi:10.1007/s11356-021-14532-y.
283. Chen, L.; Tan, G.J.T.; Pang, X.; Yuan, W.; Lai, S.; Yang, H. Energy Regulated Nutritive and Antioxidant Properties during the Germination and Sprouting of Broccoli Sprouts (*Brassica Oleracea* Var. *Italica*). *J. Agric. Food Chem.* **2018**, doi:10.1021/acs.jafc.8b00466.
284. Lv, X.; Meng, G.; Li, W.; Fan, D.; Wang, X.; Espinoza-Pinochet, C.A.; Cespedes-Acuña, C.L. Sulforaphane and Its Antioxidative Effects in Broccoli Seeds and Sprouts of Different Cultivars. *Food Chem.* **2020**, *316*, 126216, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126216.
285. Azzolin, V.F.; Cadoná, F.C.; Machado, A.K.; Berto, M.D.; Barbisan, F.; Dornelles, E.B.; Glanzner, W.G.; Gonçalves, P.B.; Bica, C.G.; Da Cruz, I.B.M. Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance Interferes with Colorectal Cancer Cells Viability, Proliferation and Oxaliplatin Response. *Toxicol. In Vitro* **2016**, *32*, 8–15, doi:10.1016/j.tiv.2015.12.001.
286. Bus, J.S.; Gibson, J.E. Paraquat: Model for Oxidant-Initiated Toxicity. *Environ. Health Perspect.* **1984**, *55*, 37–46, doi:10.1289/ehp.845537.
287. Lyles, J.T.; Luo, L.; Liu, K.; Jones, D.P.; Jones, R.M.; Quave, C.L. Cruciferous Vegetables (*Brassica Oleracea*) Confer Cytoprotective Effects in *Drosophila* Intestines. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1921926, doi:10.1080/19490976.2021.1921926.
288. Shaban, N.; Abdel-Rahman, S.; Haggag, A.; Awad, D.; Bassiouny, A.; Talaat, I. Combination between Taxol-Encapsulated Liposomes and *Eruca Sativa* Seed Extract Suppresses Mammary Tumors in Female Rats Induced by 7,12 Dimethylbenz(α)Anthracene. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2016**, *17*, 117–123, doi:10.7314/APJCP.2016.17.1.117.
289. Salem, M.O.A.; Taştan, Y.; Bilen, S.; Terzi, E.; Sönmez, A.Y. Effects of White Mustard (*Sinapis Alba*) Oil on Growth Performance, Immune Response, Blood Parameters, Digestive and Antioxidant Enzyme Activities in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **2022**, *131*, 283–299, doi:10.1016/j.fsi.2022.10.006.
-

290. Jeffery, E.H.; Stewart, K.E. Upregulation of Quinone Reductase by Glucosinolate Hydrolysis Products From Dietary Broccoli. In *Methods in Enzymology; Quinones and Quinone Enzymes, Part B*; Academic Press, 2004; Vol. 382, pp. 457–469.
291. Cuendet, M.; Oteham, C.P.; Moon, R.C.; Pezzuto, J.M. Quinone Reductase Induction as a Biomarker for Cancer Chemoprevention. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 460–463, doi:10.1021/np050362q.
292. Chatterjee, A.; Gupta, S. The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Cancer. *Cancer Lett.* **2018**, *433*, 33–42, doi:10.1016/j.canlet.2018.06.028.
293. Wark, P.A.; Grubben, M.J.A.L.; Peters, W.H.M.; Nagengast, F.M.; Kampman, E.; Kok, F.J.; van 't Veer, P. Habitual Consumption of Fruits and Vegetables: Associations with Human Rectal Glutathione S-Transferase. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 2135–2142, doi:10.1093/carcin/bgh238.
294. Panda, C.; Komarnytsky, S.; Fleming, M.N.; Marsh, C.; Barron, K.; Le Brun-Blashka, S.; Metzger, B. Guided Metabolic Detoxification Program Supports Phase II Detoxification Enzymes and Antioxidant Balance in Healthy Participants. *Nutrients* **2023**, *15*, 2209, doi:10.3390/nu15092209.
295. Garcia-Ibañez, P.; Núñez-Sánchez, M.A.; Oliva-Bolarín, A.; Martínez-Sánchez, M.A.; Ramos-Molina, B.; Ruiz-Alcaraz, A.J.; Moreno, D.A. Anti-Inflammatory Potential of Digested *Brassica* Sprout Extracts in Human Macrophage-like HL-60 Cells. *Food Funct.* **2023**, *14*, 112–121, doi:10.1039/D2FO02914F.
296. Gugliandolo, A.; Giacoppo, S.; Ficicchia, M.; Aliquò, A.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Eruca Sativa Seed Extract: A Novel Natural Product Able to Counteract Neuroinflammation. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 6235–6244, doi:10.3892/mmr.2018.8695.
297. Xian, Y.-F.; Hu, Z.; Ip, S.-P.; Chen, J.-N.; Su, Z.-R.; Lai, X.-P.; Lin, Z.-X. Comparison of the Anti-Inflammatory Effects of *Sinapis Alba* and *Brassica Juncea* in Mouse Models of Inflammation. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2018**, *50*, 196–204, doi:10.1016/j.phymed.2018.05.010.
298. Dzhililova, D.; Zolotova, N.; Fokichev, N.; Makarova, O. Murine Models of Colorectal Cancer: The Azoxymethane (AOM)/Dextran Sulfate Sodium (DSS) Model of Colitis-Associated Cancer. *PeerJ* **2023**, *11*, e16159, doi:10.7717/peerj.16159.
299. Venkatachalam, K.; Vinayagam, R.; Arokia Vijaya Anand, M.; Isa, N.M.; Ponnaiyan, R. Biochemical and Molecular Aspects of 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Carcinogenesis: A Review. *Toxicol. Res.* **2020**, *9*, 2–18, doi:10.1093/toxres/tfaa004.
300. Cid-Gallegos, M.S.; Sánchez-Chino, X.M.; Álvarez-González, I.; Madrigal-Bujaidar, E.; Vásquez-Garzón, V.R.; Baltiérrez-Hoyos, R.; Villa-Treviño, S.; Dávila-Ortíz, G.; Jiménez-Martínez, C. Modification of In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity by Consumption of Cooked Chickpea in a Colon Cancer Model. *Nutrients* **2020**, *12*, 2572, doi:10.3390/nu12092572.
301. Kuri-García, A.; González-Reyes, A.; Aranda-Vargas, P.J.; Moreno Celis, U.; Mejía, C.; García-Gasca, T.; Ferríz-Martínez, R.A.; de la Torre-Carbot, K.; Saldaña Gutiérrez, C.; Chávez-Servín, J.L. Effect on Nutritional Markers of a Model of Aberrant Crypt Foci Induced by Azoxymethane and Sodium Dextran Sulfate in Sprague Dawley Rats. *Nutr. Hosp.* **2019**, *36*, 1163–1170, doi:10.20960/nh.02600.

-
302. Xian, Y.-F.; Hu, Z.; Ip, S.-P.; Chen, J.-N.; Su, Z.-R.; Lai, X.-P.; Lin, Z.-X. Comparison of the Anti-Inflammatory Effects of *Sinapis Alba* and *Brassica Juncea* in Mouse Models of Inflammation. *Phytomedicine* **2018**, *50*, 196–204, doi:10.1016/j.phymed.2018.05.010.
303. Baenas, N.; Vega-García, A.; Manjarrez-Marmolejo, J.; Moreno, D.A.; Feria-Romero, I.A. The Preventive Effects of Broccoli Bioactives against Cancer: Evidence from a Validated Rat Glioma Model. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *168*, 115720, doi:10.1016/j.biopha.2023.115720.
304. Tse, G.; Eslick, G.D. Cruciferous Vegetables and Risk of Colorectal Neoplasms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr. Cancer* **2014**, *66*, 128–139, doi:10.1080/01635581.2014.852686.
305. Gan, C.; Li, Y.; Yu, Y.; Yu, X.; Liu, H.; Zhang, Q.; Yin, W.; Yu, L.; Ye, T. Natural Product Pectolarigenin Exhibits Potent Anti-Metastatic Activity in Colorectal Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 115089, doi:10.1016/j.bmc.2019.115089.
306. Deng, Z.; Shen, D.; Yu, M.; Zhou, F.; Shan, D.; Fang, Y.; Jin, W.; Qian, K.; Li, S.; Wang, G.; et al. Pectolarigenin Inhibits Bladder Urothelial Carcinoma Cell Proliferation by Regulating DNA Damage/Autophagy Pathways. *Cell Death Discov.* **2023**, *9*, 214, doi:10.1038/s41420-023-01508-9.
307. Ding, F.; Yang, S. Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Proliferation and Triggers Apoptosis in Colon Cancer via the Hedgehog/Phosphoinositide 3-Kinase Pathways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2021**, *99*, 910–920, doi:10.1139/cjpp-2020-0588.
308. Wubetu, G.Y.; Shimada, M.; Morine, Y.; Ikemoto, T.; Ishikawa, D.; Iwahashi, S.; Yamada, S.; Saito, Y.; Arakawa, Y.; Imura, S. Epigallocatechin Gallate Hinders Human Hepatoma and Colon Cancer Sphere Formation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *31*, 256–264, doi:10.1111/jgh.13069.
309. Costa, E.V.; Soares, L. do N.; Chaar, J. da S.; Silva, V.R.; Santos, L. de S.; Koolen, H.H.F.; Silva, F.M.A. da; Tavares, J.F.; Zengin, G.; Soares, M.B.P.; et al. Benzylated Dihydroflavones and Isoquinoline-Derived Alkaloids from the Bark of *Diclinanona Calycina* (Annonaceae) and Their Cytotoxicities. *Mol. Basel Switz.* **2021**, *26*, 3714, doi:10.3390/molecules26123714.
310. Huminiecki, L. Evidence for Multilevel Chemopreventive Activities of Natural Phenols from Functional Genomic Studies of Curcumin, Resveratrol, Genistein, Quercetin, and Luteolin. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14957, doi:10.3390/ijms232314957.
311. Kisacam, M.A. Nobiletin Is Capable of Regulating Certain Anti-Cancer Pathways in a Colon Cancer Cell Line. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2023**, *396*, 547–555, doi:10.1007/s00210-022-02354-9.
312. Chen, J.; Huang, J.; Luo, B.; Dong, S.; Wang, R.; Jiang, Z.; Xie, Y.; Yi, W.; Wen, G.; Zhong, J. PIK3CD Induces Cell Growth and Invasion by Activating AKT/GSK-3 β /B-catenin Signaling in Colorectal Cancer. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 997–1011, doi:10.1111/cas.13931.
313. Okamoto, T.; Onaga, C.; Matsuoka, I.; Ozaki, A.; Matsuda, C.; Kasai, T.; Xiong, Y.; Harada, Y.; Sato, T.; Nakano, Y.; et al. High SLC20A1 Expression Indicates Poor Prognosis in Prostate Cancer. *Cancer Diagn. Progn.* **2023**, *3*, 439–448, doi:10.21873/cdp.10237.
-

314. Onaga, C.; Tamori, S.; Matsuoka, I.; Ozaki, A.; Motomura, H.; Nagashima, Y.; Sato, T.; Sato, K.; Tahata, K.; Xiong, Y.; et al. High SLC20A1 Expression Is Associated With Poor Prognosis for Radiotherapy of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Diagn. Progn.* **2022**, *2*, 429–442, doi:10.21873/cdp.10126.
315. Li, J.; Dong, W.; Li, Z.; Wang, H.; Gao, H.; Zhang, Y. Impact of SLC20A1 on the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Somatotroph Adenomas. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 3276–3284, doi:10.3892/mmr.2019.10555.
316. Murphy, N.P.; Binti Ahmad Mokhtar, A.M.; Mott, H.R.; Owen, D. Molecular Subversion of Cdc42 Signalling in Cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2021**, *49*, 1425–1442, doi:10.1042/BST20200557.
317. Cai, J.W.; Huang, X.M.; Li, X.L.; Qin, S.; Rong, Y.-M.; Chen, X.; Weng, J.R.; Zou, Y.F.; Lin, X.T. An 11-Gene Signature for the Prediction of Systemic Recurrences in Colon Adenocarcinoma. *Gastroenterol. Rep.* **2021**, *9*, 451–460, doi:10.1093/gastro/goab023.
318. Guo, Y.; Wu, R.; Gaspar, J.M.; Sargsyan, D.; Su, Z.-Y.; Zhang, C.; Gao, L.; Cheng, D.; Li, W.; Wang, C.; et al. DNA Methylome and Transcriptome Alterations and Cancer Prevention by Curcumin in Colitis-Accelerated Colon Cancer in Mice. *Carcinogenesis* **2018**, *39*, 669–680, doi:10.1093/carcin/bgy043.
319. Wang, L.; Li, M.; Gu, Y.; Shi, J.; Yan, J.; Wang, X.; Li, B.; Wang, B.; Zhong, W.; Cao, H. Dietary Flavonoids-Microbiota Crosstalk in Intestinal Inflammation and Carcinogenesis. *J. Nutr. Biochem.* **2023**, *125*, 109494, doi:10.1016/j.jnutbio.2023.109494.
320. Hidalgo-García, L.; Ruiz-Malagon, A.J.; Huertas, F.; Rodríguez-Sojo, M.J.; Molina-Tijeras, J.A.; Diez-Echave, P.; Becerra, P.; Mirón, B.; Morón, R.; Rodríguez-Nogales, A.; et al. Administration of Intestinal Mesenchymal Stromal Cells Reduces Colitis-Associated Cancer in C57BL/6J Mice Modulating the Immune Response and Gut Dysbiosis. *Pharmacol. Res.* **2023**, *195*, 106891, doi:10.1016/j.phrs.2023.106891.
321. Zhang, M.-M.; Yin, D.-K.; Rui, X.-L.; Shao, F.-P.; Li, J.-C.; Xu, L.; Yang, Y. Protective Effect of Pai-Nong-San against AOM/DSS-Induced CAC in Mice through Inhibiting the Wnt Signaling Pathway. *Chin. J. Nat. Med.* **2021**, *19*, 912–920, doi:10.1016/S1875-5364(22)60143-2.
322. Deng, Y.; Huang, X.; Chen, X.; Wang, M.; Tian, L.; Zhou, H.; Yang, W.; He, F.; Yin, W. Chemopreventive Effects of Polysaccharides and Flavonoids from Okra Flowers in Azomethane/Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis-Associated Cancer. *Nutrients* **2023**, *15*, 4820, doi:10.3390/nu15224820.
323. Zhu, J.; Liu, W.; Bian, Z.; Ma, Y.; Kang, Z.; Jin, J.; Li, X.; Ge, S.; Hao, Y.; Zhang, H.; et al. Lactobacillus Plantarum Zhang-LL Inhibits Colitis-Related Tumorigenesis by Regulating Arachidonic Acid Metabolism and CD22-Mediated B-Cell Receptor Regulation. *Nutrients* **2023**, *15*, 4512, doi:10.3390/nu15214512.
324. Pal, P.; Shastry, R.P. Exploring the Complex Role of Gut Microbiome in the Development of Precision Medicine Strategies for Targeting Microbial Imbalance-Induced Colon Cancer. *Folia Microbiol. (Praha)* **2023**, doi:10.1007/s12223-023-01085-5.
325. Zhang, X.; Yu, D.; Wu, D.; Gao, X.; Shao, F.; Zhao, M.; Wang, J.; Ma, J.; Wang, W.; Qin, X.; et al. Tissue-Resident Lachnospiraceae Family Bacteria Protect against

-
- Colorectal Carcinogenesis by Promoting Tumor Immune Surveillance. *Cell Host Microbe* **2023**, *31*, 418-432.e8, doi:10.1016/j.chom.2023.01.013.
326. Zhang, L.; Ji, Q.; Chen, Q.; Wei, Z.; Liu, S.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Li, Z.; Liu, H.; Sui, H. Akkermansia Muciniphila Inhibits Tryptophan Metabolism via the AhR/ β -Catenin Signaling Pathway to Counter the Progression of Colorectal Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2023**, *19*, 4393–4410, doi:10.7150/ijbs.85712.
327. Zheng, T.; Hao, H.; Liu, Q.; Li, J.; Yao, Y.; Liu, Y.; Zhang, T.; Zhang, Z.; Yi, H. Effect of Extracellular Vesicles Derived from Akkermansia Muciniphila on Intestinal Barrier in Colitis Mice. *Nutrients* **2023**, *15*, 4722, doi:10.3390/nu15224722.

8 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las principales moléculas secretadas por el tejido adiposo.....	16
Tabla 2. Valores de referencia de glucosa en sangre para el diagnóstico de diabetes [52].....	22
Tabla 3. Factores para diagnosticar el MetS, definidos por la asociación IDF y AHA/NHLBI [72].	31
Tabla 4. Medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad [5,44].	34
Tabla 5. Listado de especies estudiadas en el ensayo experimental del CCR.....	73
Tabla 6. Listado de especies estudiadas en el ensayo experimental de obesidad.....	74
Tabla 7. Formulación y composición nutricional de las distintas dietas utilizadas.....	94
Tabla 8. Prueba incremental.....	97
Tabla 9. Programa de ejercicio físico.....	98
Tabla 10. Concentración en $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de las soluciones estándar Milliplex MMHE-44K.....	102
Tabla 11. Composición nutricional de las dietas usadas en el ensayo experimental para el CCR.....	112
Tabla 12. Programa de ejercicio físico usado en la experimentación in vivo para el cáncer de colon.....	115
Tabla 13. Rendimiento y capacidad antioxidante de los extractos etanólicos realizados a partir del material vegetal estudiado en el estudio de la obesidad.....	122
Tabla 14. Capacidad antioxidante del nutraceutico desarrollado, y de los distintos extractos usados para la formulación del mismo.....	124
Tabla 15. Digestibilidad y capacidad antioxidante del nutraceutico tras un proceso de digestión in vitro.	125
Tabla 16. Compuestos bioactivos identificados en los distintos extractos usados en el NT.....	129
Tabla 17. Test incremental al inicio del ensayo experimental.....	138
Tabla 18. Test incremental al final del ensayo experimental.....	139
Tabla 19. Efecto de la obesidad y las distintas intervenciones nutricionales y de ejercicio físico sobre los parámetros hemáticos.....	140
Tabla 20. Efecto sobre parámetros bioquímicos de la obesidad, así como de las distintas intervenciones nutricionales y de ejercicio físico.....	142
Tabla 21. Efecto del desarrollo de obesidad y de distintas intervenciones para revertirla sobre la concentración de citoquinas y hormonas.....	144
Tabla 22. Efecto de la obesidad y de las intervenciones nutricionales o de ejercicio físico sobre índices antropométricos, aterogénicos e índice de Lee.....	146
Tabla 23. Valores de glucemia basal y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min del TTOG.....	149
Tabla 24. Composición corporal de los distintos grupos experimentales.....	150
Tabla 25. Efecto del desarrollo de la obesidad, así como de las distintas intervenciones realizadas, sobre el peso de los órganos analizados.....	151
Tabla 26. Efecto del desarrollo de la obesidad y de las distintas intervenciones realizadas sobre la actividad antioxidante del hígado.....	153

Tabla 27. Expresión génica de enzimas relacionados con la actividad antioxidante, detoxificante y biomarcadores inflamatorios en el hígado y el músculo plantaris.....	155
Tabla 28. Expresión génica de transcritos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico en el hígado y músculo plantaris, al final del período experimental	156
Tabla 29. Efecto del desarrollo de la obesidad sobre el microbioma, a nivel de familia y género.....	164
Tabla 30. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos etanólicos realizados a partir de semillas de Brásicas.....	166
Tabla 31. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos etanólicos realizados a partir de semillas de Brásicas germinadas.....	167
Tabla 32. Rendimiento y capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de semillas crudas y semillas germinadas	169
Tabla 33. Rendimiento y capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de semillas de Brásicas crudas.....	170
Tabla 34. Rendimiento y capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de semillas de Brásicas germinadas.....	171
Tabla 35. Efecto sobre el crecimiento celular de la línea T84 de los distintos extractos de semillas de Brásicas.....	173
Tabla 36. Supervivencia frente al agente oxidante paraquat de la línea celular HT-29, sola o preincubada con los extractos etanólicos	174
Tabla 37. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de <i>Eruca sativa</i>	180
Tabla 38. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de <i>Sinapis alba</i>	181
Tabla 39. Identificación de moléculas en el hidrolizado proteico de semillas de <i>Eruca sativa</i>	182
Tabla 40. Identificación de moléculas en el hidrolizado proteico de semillas de <i>Sinapis alba</i>	184
Tabla 41. Composición porcentual de los distintos nutraceuticos desarrollados para el estudio del cáncer colorrectal.....	185
Tabla 42. Capacidad antioxidante de los distintos nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR.....	186
Tabla 43. Porcentaje de digestibilidad y capacidad antioxidante de los nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR, tras un proceso de digestión in vitro	187
Tabla 44. Grado de protección que confieren los nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR, frente al agente oxidante paraquat.....	189
Tabla 45. Compuestos identificados en el nutraceutico utilizado en el ensayo experimental del CCR	192
Tabla 46. Comparación de moléculas identificadas en el nutraceutico y en cada uno de los extractos usados para su formulación	194
Tabla 47. Efecto de del desarrollo del tumor, y de la intervención nutricional o de ejercicio físico, sobre los parámetros hemáticos.....	197
Tabla 48. Efecto del desarrollo del tumor y de las intervenciones nutricionales o de ejercicio físico sobre el peso, en gramos, de los órganos analizados	198

Tabla 49. <i>Expresión génica en el colon</i>	211
Tabla 50. <i>Expresión génica músculo plantaris</i>	211
Tabla 51. <i>Identificación del microbioma fecal presenten en los distintos grupos experimentales</i>	213

9 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la obesidad (IMC > 30 kg/m ²) en adultos [15].....	5
Figura 2. Prevalencia (%) de obesidad según características sociodemográficas en el estudio de situación ponderal ENE-COVID [16].....	6
Figura 3. Fases de maduración de preadipocito a adipocito	11
Figura 4. Tipos de adipocitos.....	13
Figura 5. Efecto de la obesidad sobre el desarrollo de la RI y DMT2 [5].....	23
Figura 6. Efecto de la obesidad en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [5].....	26
Figura 7. Esquema del daño inducido por una sobrecarga energética en el hígado [64].....	29
Figura 8. Mecanismos implicados en el desarrollo del SMet Fahed et al., (2022).....	32
Figura 9. Desarrollo del cáncer colorrectal creada con BioRender por Hossain et al., (2022).....	47
Figura 10. Incidencia del cáncer en la población mundial según la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer [3].....	53
Figura 11. Incidencia del CCR según datos de la OMS [3].	54
Figura 12. Incidencia y mortalidad del cáncer [3].....	55
Figura 13. Mecanismos de acción de inducción de apoptosis en extractos vegetales procedentes de Brassicáceas [143].....	69
Figura 14. Modulación del ciclo celular en células de cáncer de colon mediante extractos naturales de la familia Brassicáceas [143].	70
Figura 15. Composición de los distintos nutraceuticos desarrollados para el estudio in vivo del cáncer de colon.....	84
Figura 16. Ensayo de capacidad antioxidante en la línea celular HT-29.....	89
Figura 17. Grupos experimentales para el ensayo in vivo del estudio de la obesidad.....	95
Figura 18. Esquema del período experimental para el ensayo de obesidad.....	96
Figura 19. Esquema del período experimental para el ensayo in vivo del CCR.....	113
Figura 20. Esquema representativo del protocolo utilizado para la inducción del cáncer colorrectal.....	114
Figura 21. Análisis del área total del colon con la herramienta Roi Manager de Image J.....	116
Figura 22. Análisis en Image J del área ocupada por cada pólipo desarrollado	117
Figura 23. Esquema de los procesos de fijación, deshidratación e inclusión seguidos en el análisis histológico.....	118
Figura 24. Capacidad de inhibir el crecimiento celular ensayado en la línea celular T-84 para el nutraceutico y los extractos usados en su formulación.....	126
Figura 25. Capacidad antioxidante y antiinflamatoria del nutraceutico	127
Figura 26. Evolución del peso de los animales durante todo el período experimental.....	134
Figura 27. Evolución de la ingesta de alimento y agua de bebida durante el periodo experimental.....	136
Figura 28. Evolución de la ingesta total de kilocalorías	137

Figura 29. Evolución de los niveles de glucemia basal y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min de una sobrecarga oral de glucosa	148
Figura 30. Efecto de la obesidad e intervenciones sobre los valores del área bajo la curva (AUC) después de realizar un test de tolerancia oral a la glucosa.....	149
Figura 31. Efecto del desarrollo de la obesidad, así como de las distintas intervenciones realizadas, sobre el porcentaje de grasa y humedad en el hígado	152
Figura 32. Riqueza o número de especies diferentes en cada grupo experimental.....	158
Figura 33. Diversidad beta o diversidad entre las comunidades microbianas entre los distintos grupos experimentales, calculado según el índice de Jaccard (α) o el método Bray-Curtis.....	159
Figura 34. Efecto de la obesidad y las intervenciones nutricionales y de ejercicio físico sobre la abundancia relativa del microbioma cecal a nivel de Filo	160
Figura 35. Relación Firmicutes/ Bacteroidetes (F/B) en el microbioma de los distintos grupos experimentales.....	161
Figura 36. Efecto del desarrollo de la obesidad sobre el microbioma, a nivel de familia y género	163
Figura 37. Heatmap representando la abundancia relativa de las familias más representativas	165
Figura 38. Efecto de la germinación sobre el rendimiento y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de Brásicas.....	168
Figura 39. Influencia de la germinación sobre el rendimiento de extracción de los hidrolizados proteicos de semillas de Brásicas.....	171
Figura 40. Influencia de la germinación sobre la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos procedentes de semillas de Brásicas.....	172
Figura 41. Influencia de los extractos etanólicos sobre la actividad de enzimas detoxificantes GST y QR. Sulforrafano (SFN)	176
Figura 42. Efecto de la germinación sobre la capacidad para inducir la actividad de la enzima detoxificante QR.....	177
Figura 43. Capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para inhibir el crecimiento celular de la línea T-84.	188
Figura 44. Capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para inhibir el crecimiento celular de la línea HT-29.....	188
Figura 45. Capacidad de los distintos nutraceuticos desarrollados para el ensayo experimental del CCR para inducir la enzima detoxificantes GST.....	190
Figura 46. Evolución del peso de los animales a lo largo de todo el período experimental	195
Figura 47. Evolución de la ingesta de alimento durante todo el período experimental.....	196
Figura 48. Evolución del consumo de agua de bebida durante todo el período experimental.....	196
Figura 49. Efecto del desarrollo del tumor y de la intervención nutricional, sola o en combinación con un programa de ejercicio, sobre la longitud del colon	199
Figura 50. Efecto de la intervención nutricional, sola o en combinación con el protocolo de ejercicio físico sobre el área y el número de pólipos	200

Figura 51. Identificación de las distintas capas encontradas en un corte histológico de colon	201
Figura 52. Corte histológico del colon de cada grupo experimental (2X)	202
Figura 53. Corte histológico del hígado de cada grupo experimental (10X).....	203
Figura 54. Corte histológico del corazón de cada grupo experimental (10X)	204
Figura 55. Corte histológico del riñón de los distintos grupos experimentales (10X).....	205
Figura 56. Corte histológico del bazo de los distintos animales experimentales (10X).....	206
Figura 57. Corte histológico de los pulmones de cada grupo experimental (10X)	207
Figura 58. Corte histológico del colon de cada grupo experimental a 4X (izquierda) y 10X (derecha), teñido con el método pentacrómico	209
Figura 59. Representación del microbioma fecal presenten en los distintos grupos experimentales.....	214